



Universität Hamburg

Fachbereich Biologie

**Genomweite Transkriptionsprofile zur
Charakterisierung und Vorhersage von Heterosis in
Zea mays L.**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von

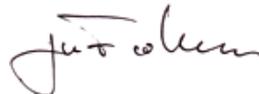
Markus Alexander Thiemann

aus Hamburg

Hamburg, Dezember 2011

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Priv.-Doz. Dr. S. SCHOLTEN
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Prof. Dr. M. FRISCH
Tag der Disputation: 14. Oktober 2011

Hamburg, den 29. September 2011



Professor Dr. J. Fromm
Vorsitzender des Promotionsausschusses
Biologie

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom April 2008 bis August 2011 an der Universität Hamburg am Biozentrum Klein Flottbek in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Erhard Kranz, Abteilung Entwicklungsbiologie und Biotechnologie, unter der Betreuung von Herrn PD Dr. Stefan Scholten angefertigt.

Erstgutachter: PD Dr. Stefan Scholten (Universität Hamburg)

Zweitgutachter: Prof. Dr. Matthias Frisch (Justus Liebig Universität, Giessen)

Tag der Disputation: 14.10.2011

Vorträge und Poster, in denen Bestandteile dieser Arbeit vorgestellt wurden:

51st Annual Maize Genetics Conference, 12.03.-15.03.2009, St. Charles, IL, USA: Posterpräsentation

10. GPZ Haupttagung „Innovations in Breeding Methodology“, 15.03.-17.03.2010, Freising-Weihenstephan, Vortrag

23. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, 23.2.-26.02.2010, Dabinghausen, Vortrag

Veröffentlichungen, die in der Zeit dieser Promotion angefertigt wurden (mit einem Stern sind die Arbeiten markiert, deren Inhalte in diese Dissertation vollständig bzw. teilweise eingeflossen sind).

***Thiemann A, Fu J, Schrag TA, Melchinger AE, Frisch M, Scholten S** (2010) Correlation between parental transcriptome and field data for the characterization of heterosis in *Zea mays* L. *Theor Appl Genet.* 120:401–413

***Fu J, Thiemann A, Schrag TA, Melchinger AE, Scholten S, Frisch M** (2010) Dissecting grain yield pathways and their interactions with grain dry matter content by a two-step correlation approach with maize seedling transcriptome. *BMC Plant Biol.* 12;10:63

***Frisch M, Thiemann A, Fu J, Schrag TA, Scholten S, Melchinger AE** (2010) Transcriptome-based distance measures for grouping of germplasm and prediction of hybrid performance in maize. *Theor Appl Genet.* 120: 441-450

Thiemann A., Meyer S., Scholten S. (2009) Heterosis in plants: Manifestation in early seed development and prediction approaches to assist hybrid breeding. *Chinese Science Bulletin* 54:2363-2375

Jahnke S., Sarholz B., Thiemann A., Kühr V., Gutiérrez-Marcos J.F., Geiger H.H., Piepho H.P., Scholten S. (2010) Heterosis in early seed development: a comparative study of F1 embryo and endosperm tissues 6 days after fertilization. *Theor Appl Genet.* 120(2):389-400

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	II
II Abkürzungsverzeichnis.....	IV
III Abbildungsverzeichnis.....	VI
IV Tabellenverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	1
1.2 Heterosis	1
1.2 Molekulare Basis von Heterosis	3
1.3 Vorhersage von Heterosis.....	7
1.4 Gene Silencing.....	10
1.5 Der virale Gene Silencing Suppressor P1/HC-Pro aus WSMV	12
1.6 Zielsetzung.....	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Pflanzen	15
2.1.1.1 Inzuchtlinien und Hybride von Mais aus einem Züchtungsprogramm der Universität Hohenheim	15
2.1.1.2 Transgene P1/HC-Pro Maispflanzen	16
2.1.2 Chemikalien, Puffer und Medien	17
2.1.3 Enzyme	18
2.1.4 Primer	18
2.1.5 Molekulargewichtsstandards	18
2.2 Methoden.....	19
2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	19
2.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	19
2.2.3 RNA-Isolierung	19
2.2.4 46k-Mikroarray.....	20
2.2.4.1 Annotation des 46k-Arrays (Blast2GO)	20
2.2.4.2 Anzucht der 21 Maisinzuchtlinien für das 46k-Mikroarray	21
2.2.4.3 Herstellung von RNA-Sonden und die 46k-Array-Hybridisierung.....	21
2.2.4.4 Identifizierung differentiell exprimierter und Hybridmerkmal korrelierter Gene	22
2.2.4.5 Quantitative Real-Time (RT)-PCR zur Validierung der 46k-Array Expressionsprofile	22
2.2.5 Herstellung des 1k-Mikroarrays	23
2.2.5.1 Anzucht der Maisinzuchtlinien für das 1k-Mikroarray	24
2.2.5.2 Herstellung von RNA-Sonden und die 1k-Array Hybridisierung	24
2.2.6 Gene Ontology (GO) Anreicherungsanalyse.....	25
2.2.7 In silico mapping Hybridleistung bzw. Heterosis von Kornertrag korrelierter Gene	26
2.2.7.1 Untersuchung der Verteilung in silico gemappter Gene im B73-Maisgenom.....	26
2.2.7.2 In silico QTL mapping.....	27
2.2.8 Untersuchung der putativen Rolle des Gene Silencings bei der Ausbildung von Heterosis	28
2.2.8.1 Anzucht der Maispflanzen im Gewächshaus.....	28
2.2.8.2 In vitro Kultur von Nucellus Gewebe einen Tag nach der Bestäubung	29
2.2.8.3 β -Glucuronidase (Gus)-Färbung.....	30
3 Ergebnisse	31

3.1 Das korrelative Verhältnis der drei Hybridmerkmale aus den Felddaten der 21 europäischen Elite-Maisinzuchtlinien	31
3.2 Genexpressionsanalysen der 21 Inzuchtlinien.....	32
3.2.1 Validierung der 46k-Array Expressionsprofile	33
3.2.2 Identifizierung differentiell exprimierter Gene	34
3.2.3 Identifikation Hybridmerkmal korrelierter Gene	34
3.3 Vergleichende Charakterisierung: Kornertrag vs. Korntrockenmasse	37
3.4 Neuannotation des 46k-Arrays	41
3.5 Charakterisierung von Heterosis für Kornertrag	42
3.6 <i>In silico</i> mapping der Hybridmerkmal korrelierten Gene	48
3.7 Vergleichende Expressionsanalysen von Inzuchteltern und ihren Hybriden	58
3.7.1 Identifizierung einer überwiegend additiven Expression der Hybridmerkmal korrelierten Gene	60
3.7.3 Korrelationsanalysen der 1k-Array Expressionsdaten	64
3.8 Untersuchung eines putativen Einflusses des Gene Silencings auf Heterosis.....	66
3.8.1 Nachweis der Expression von P1/HC-Pro.....	68
3.8.2 Messung der Wachstumsraten und Berechnung von Heterosis.....	70
4 Diskussion.....	73
4.1 Transkriptomdaten zur Entwicklung von Vorhersagemodellen	73
4.2 Funktionelle Charakterisierung der Hybridmerkmale	77
4.2.1 Vergleich der assoziierten Hybridmerkmale: Korntrockenmasse vs. Kornertrag.....	78
4.2.2 Charakterisierung von Heterosis für Kornertrag	82
4.3 <i>In silico</i> Lokalisierung Heterosis bzw. Hybridleistung von Kornertrag assoziierter Bereiche im Genom der Maislinie B73	87
4.4 Die Rolle additiv exprimierter Gene bei der Ausbildung von Heterosis.....	89
4.5 Gene Silencing hat einen Einfluss auf Heterosis von Kornertrag	93
5 Zusammenfassung	98
6 Literaturverzeichnis	100
7 Anhang.....	111
7.1 Neuannotaion der 46k-Arrays durch Blast2GO	111
7.2 Hybridmerkmal korrelierte Gene.....	111
7.3 <i>In silico</i> Lokalisierung im Genom der Linie B73.....	111
Danksagung.....	114

II Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5`-diphosphat
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
Ago	Argonaut-Protein
APC	Anaphase-promoting complex
aRNA	aminoallyl-RNA
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bar	bialaphos resistance
bp	Basenpaare
BP	Biological process
BPH	Best parent heterosis
ca.	circa
casiRNAs	cis-acting siRNAs
CC	Cellular component
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
Cy3/Cy5	Cyanin3/Cyanin5
dap	Tage nach Bestäubung (days after pollination)
DCL	Dicer-like protein
Dex	Dexamethason
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	Expressed sequence tag
et al.	und andere
Exp	Experiment
FDR	false discovery rate
Fw	Vorwärtsprimer
Fzr2	Fizzy-related 2
Gal	Galactosidase
GCA	Allgemeine Kombinationseignung (general combining ability)
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GO	Gene ontology
Gus	β -Glucuronidase
Ha	Hektar
HC-Pro	Helper-component Protease
HL	Hybridleistung
kb	Kilobasen
L.	Linnè
lmiRNAs	long microRNAs
Lsg.	Lösung
MF	Molecular function
Mio.	Millionen
MIPS	Munich Information Center for Protein Sequences
miRNA	micro-RNA
MPH	Mid-parent heterosis
mRNA	messenger-RNA

MS	Murashige-Skook
NCBI	National Center of Biotechnology Information
nt	Nukleotide
P1	Protease 1
PAT	Phosphinothricin-Acetyltransferase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFK	Phosphofruktokinase
PFP	Phosphotransferase
PPIase	Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase
qgyld	quantitativer Kornertrag
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
QTL	Quantitative trait loci
r	Korrelationsstärke
RdRps	RNA-abhängige RNA-Polymerasen
Rev	Rückwärtsprimer
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SCA	Spezifische Kombinationseigung (specific combining ability)
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	short interfering RNAs
SNP	Single nucleotide polymorphism
spec.	Spezies
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
T _m	Melting (Schmelz)-Temperatur
UTP	Uridin-5'-triphosphat
vs.	versus
WT	Wildtyp
x-Gluc	Cyclohexylammoniumsalz der 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-glucuronsäure
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Abkürzungen für Viren und Organismen

CVYV	<i>Cucumber vein yellowing virus</i>
MCMV	<i>Maize chlorotic mottle virus</i>
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i>
WSMV	<i>Wheat streak mosaic virus</i> (Weizenstrichelmosaikvirus)

III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Heterosis bei Mais	1
Abbildung 2: Genetische Modelle für Heterosis	2
Abbildung 3: Genexpressionslevel in Hybriden und assoziierte Genregulationen	5
Abbildung 4: Modell zum Beitrag additiver Genexpression zu Heterosis	7
Abbildung 5: Gene Silencing in Pflanzen	11
Abbildung 6: Schematische Darstellung des WSMV Polyproteins	13
Abbildung 7: Schematische Darstellung des P1/HC-Pro Konstruktes	17
Abbildung 8: Schematische Darstellung eines QTLs von Kornertrag mit flankierenden Markern	27
Abbildung 9: Korrelatives Verhältnis der Hybridmerkmale	31
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Hybridisierungsschemas des 46k-Arrays	32
Abbildung 11: Validierung der Expressionsdaten des 46k-Mikroarrays mittels qRT-PCR	34
Abbildung 12: Venn-Diagramm der parental differentiell exprimierten, Hybridmerkmal korrelierten Gene	35
Abbildung 13: Korrelationen der jeweils am stärksten Hybridmerkmal korrelierten Gene	36
Abbildung 14: Angereicherte GOs der Hybridleistung von Kornertrag korrelierten Gene	38
Abbildung 15: Angereicherte GOs der Hybridleistung der Korntrockenmasse korrelierten Gene	40
Abbildung 16: Ergebnisse der Neuannotation des 46k-Mikroarrays durch Blast2GO	41
Abbildung 17: Funktionelle Klassifizierung der allein MPH positiv korrelierten Gene mit einer Korrelationsstärke r über 0,5	45
Abbildung 18: Genverteilung Hybridleistung von Kornertrag korrelierter Gene auf dem Maisgenom	50
Abbildung 19: Genverteilung allein MPH korrelierter Gene auf dem Maisgenom	51
Abbildung 20: Funktionelle Klassifizierung der Hybridleistung von Kornertrag korrelierten Gene aus den genomischen Regionen mit erhöhter Gendichte	54
Abbildung 21: Funktionelle Klassifizierung der allein MPH von Kornertrag korrelierten Gene aus den genomischen Regionen mit erhöhter Gendichte	55
Abbildung 22: Regionen im Genom von Mais mit erhöhter Gendichte an Heterosis bzw. Hybridleistung von Kornertrag korrelierter Gene	57
Abbildung 23: Design und Hybridisierungsschema des 1k-Mikroarrays	59
Abbildung 24: Verteilung additiv und nicht-additiv exprimierter Gene in Hybriden	63
Abbildung 25: <i>In vitro</i> -Kultur der Nucellusgewebe	66
Abbildung 26: Auskeimende Embryonen und Maiskeimlinge der <i>in vitro</i> -Kultur	67
Abbildung 27: Gus-Färbung mit Blattmaterial von Pflanzen aus der <i>in vitro</i> -Kultur	68
Abbildung 28: Nachweis der stabilen Integration von P1/HC-Pro in das Genom von Mais	68
Abbildung 29: Gus-Färbung von Nucellus-Geweben aus der <i>in vitro</i> -Kultur	69
Abbildung 30: Nachweis der Dexamethason-induzierten Transkription von P1/HC-Pro (PCR 1)	70
Abbildung 31: Nachweis der Dexamethason-induzierten Transkription von P1/HC-Pro (PCR 2)	70
Abbildung 32: Wachstumsraten der transgenen P1/HC-Pro und nicht-transgenen Kreuzungen aus der <i>in-vitro</i> Kultur	71
Abbildung 33: Heterosiswerte der transgenen P1/HC-Pro und nicht-transgenen Kontrollpflanzen aus der <i>in-vitro</i> Kultur	72
Abbildung 34: Model zur Erklärung des Einflusses additiv exprimierter, linear Heterosis korrelierter Gene auf Heterosis	93

IV Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Primer mit ihrer jeweiligen Sequenz sowie der Schmelztemperatur T_m	18
Tabelle 2: Angereicherte biologische Prozesse von Genen, die zur gleichen Zeit mit der Hybridleistung von Kornertrag und der Korntrockenmasse korrelierten.....	41
Tabelle 3: Signifikant angereicherte biologische Prozesse von Genen, die mit der mittleren parentalen Heterosis (MPH) vom Kornertrag positiv korrelierten.....	43
Tabelle 4: Signifikant angereicherte biologische Prozesse von Genen, die mit der mittleren parentalen Heterosis (MPH) vom Kornertrag negativ korrelierten.....	46
Tabelle 5: Signifikant ($p < 0,03$) angereicherte zelluläre Komponenten (CC) von Genen, die allein mit MPH vom Kornertrag korrelierten.....	47
Tabelle 6: Genomische Fragmente mit statistisch erhöhter Gendichte an Hybridleistung bzw. MPH von Kornertrag korrelierten Genen.....	52
Tabelle 7: QTLs (Quantitative trait loci) vom quantitativen Merkmal Kornertrag, welche mit genomischen Fragmenten kolokalisieren, die eine erhöhte Anzahl an MPH bzw. Hybridleistung von Kornertrag korrelierten Genen aufweisen.....	53
Tabelle 8: Angereicherte biologische Prozesse (BP) von Hybridleistung von Kornertrag korrelierten Genen, die in Regionen mit signifikant erhöhter Anzahl korrelierter Gene, auf dem Genom von <i>Zea mays L.</i> kolokalisieren.....	54
Tabelle 9: Angereicherte biologische Prozesse (BP) von MPH korrelierten Genen, die in Regionen mit signifikant erhöhter Anzahl korrelierter Gene, auf dem Genom von <i>Zea mays L.</i> kolokalisieren.....	56
Tabelle 10: Anzahl der korrelierten Gene zwischen den Felddaten und der mittleren parentalen Genexpression bzw. der realen Hybridexpression.....	65
Tabelle 11: Hybridleistung von Kornertrag korrelierte Gene, die mit genomischen Fragmenten mit statistisch erhöhter Gendichte korrelierter Gene, auf dem B73-Genom kolokalisieren.....	111
Tabelle 12: MPH von Kornertrag korrelierte Gene, die mit genomischen Fragmenten mit statistisch erhöhter Gendichte korrelierter Gene, auf dem B73-Genom kolokalisieren.....	113

1 Einleitung

1.2 Heterosis

Anfang des 20. Jahrhunderts beobachteten Shull (1908) und East (1908) unabhängig voneinander eine erhöhte Vitalität bei Hybriden von Mais, die aus Kreuzungen unterschiedlicher Inzuchtlinien hervorgingen (Abb.1). Bereits zu diesem frühen Zeitpunkt hoben sie die mögliche Bedeutung dieses Phänomens für die landwirtschaftliche Nutzung hervor. Was Sie damals beschrieben war ein Hybrideffekt, den Darwin bereits im 19. Jahrhundert in seinen Kreuzungsversuchen beobachtet hatte (Darwin 1876). Der Begriff Heterosis wurde für die erhöhte Vitalität bei Hybriden in Mais zu einem späteren Zeitpunkt als Abkürzung für „stimulation of heterozygosis“ gewählt (Shull 1914). Heterosis zeichnet sich unter anderem durch eine erhöhte Biomasse und eine schnellere Entwicklung aus, sowie bei Pflanzen insbesondere durch eine Steigerung des Kornertrages und der Resistenz gegen abiotischen und biotischen Stress (Rood *et al.* 1988, Crow *et al.* 1998, Guo *et al.* 2006). Heterosis wurde seitdem nicht nur bei Mais sondern auch in vielen anderen Pflanzen, wie z.B. *Arabidopsis thaliana* und Reis und in bestimmten Tieren beobachtet. Seit der Entdeckung von Heterosis fanden Hybride immer stärker in Maiszuchtprogrammen Verwendung, was dazu führte, dass seit mehr als einem halben Jahrhundert auf 95% der Maisanbaufläche der USA Hybridmais angepflanzt wird (Crow 1998, Guo *et al.* 2006). Dies führte 1999 zu einem zusätzlichen Kornertrag von 55 Mio. Tonnen pro Jahr (Duvick 1999).

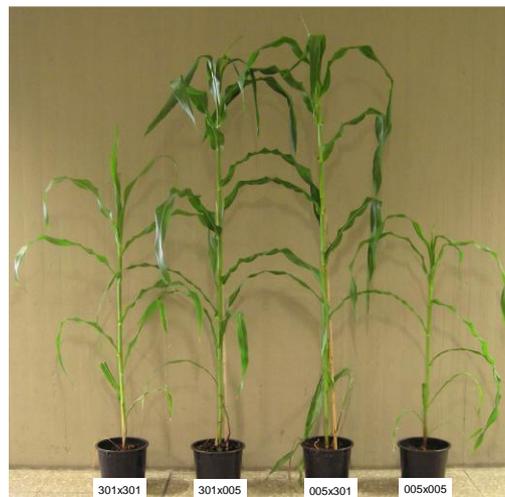


Abb.1: Heterosis bei Mais.

Darstellung von Heterosis mittels eines Größenvergleiches der Inzuchtlinien UH301 (301x301, links) und UH005 (005x005, rechts) und ihrer reziproken Hybride (301x005, 005x301). (Meyer *et al.* 2007)

Trotz der intensiven landwirtschaftlichen Nutzung von Heterosis ist dessen genetische Ursache noch weitestgehend unbekannt. Vier genetische Modelle sind im Laufe der Zeit aufgestellt worden, die Dominanzhypothese, die Überdominanzhypothese, die Pseudoüberdominanzhypothese und die Epistasishypothese (Abb.2). Gemäß der Dominanzhypothese werden rezessive Allele eines Inzuchtelters mit einem negativen Effekt auf die Vitalität durch positive dominante Allele im Hybriden komplementiert (Davenport 1908, Bruce 1910, Keeble und Pellew 1910, Jones 1917). Die Überdominanzhypothese hingegen besagt, dass eine Interaktion zweier Allele an bestimmten Schlüsselgenorten im Hybriden einen synergistischen, positiven Effekt zur Folge hat, der im homozygoten Zustand der Inzuchtelter nicht auftritt (Shull 1908, East 1936). Bei der Pseudoüberdominanz, die eigentlich einer Dominanz entspricht, wird durch eine enge Kopplung von Vitalität steigernden dominanten Allelen mit nachteiligen rezessiven Allelen in trans, eine Überdominanz vorgetäuscht (Gardner 1963, Moll *et al.* 1964). Bei der Epistasishypothese hingegen handelt es sich um eine mögliche positive Interaktion verschiedener Allele an unterschiedlichen Genorten im Hybrid (Stuber 1994, Goodnight 1999).

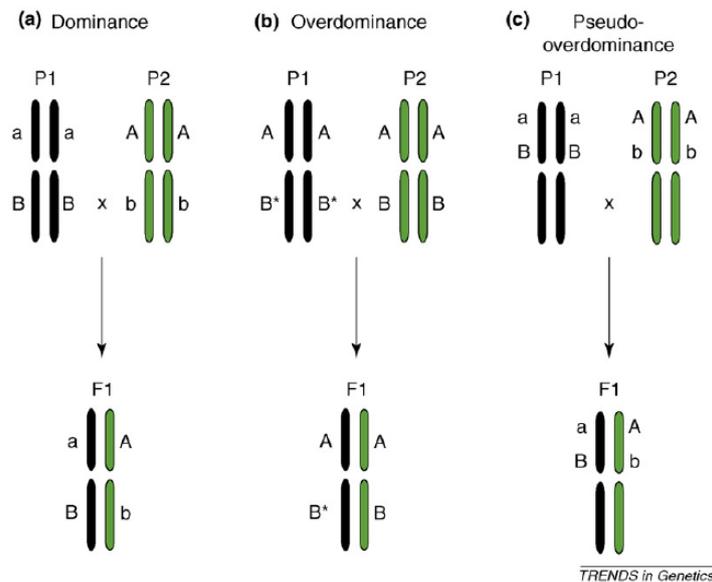


Abb.2: Genetische Modelle für Heterosis.

Das Diagramm erklärt die genetischen Modelle für Heterosis anhand zweier Beispieltene A und B.

- Das Dominanz-Modell geht davon aus, dass sich im Zuge der Züchtung der Inzuchtlinien schwach nachteilige Allele (a, b) im Genom anhäufen. Diese werden im heterozygoten Hybrid durch vorteilhafte Allele (A, B) komplementiert.
- Das Überdominanz-Modell vermutet, dass unterschiedliche Allele (B* x B) an einem Genort miteinander interagieren und einen synergetischen Effekt auf den Phänotyp ausüben, der dem homozygoten Zustand überlegen ist.
- Das Pseudoüberdominanz-Modell beschreibt eigentlich eine einfache Form der Dominanz bei der jedoch die rezessiven Allele (a von P1, b von P2) in trans gekoppelt sind. Durch diese enge Kopplung der beiden Gene entsteht so der Eindruck einer Pseudoüberdominanz. (Lippman und Zamir 2007)

Die Identifikation quantitativer Merkmal-assoziierter Genomabschnitte (QTL, quantitative trait loci) stellen eine sehr nützliche Methode dar, um die genetische Basis von Heterosis besser verstehen zu lernen. Die Ergebnisse dieser Arbeiten waren jedoch z.T. gegensätzlich. So wurde in manchen QTL Analysen vorwiegend ein dominanter Effekt nachgewiesen (Sprague und Russel 1956, Sprague 1983, Xiao *et al.* 1995, Cockerham und Zeng 1996), ein Ergebnis, dass durch die Beobachtung unterstützt wird, dass sich ein und dieselbe Region in zwei unterschiedlichen Maislinien von der Organisation und der Anzahl der Gene stark unterscheiden kann (Fu und Donner 2002). Jedoch ist eine alleinige Erklärung von Heterosis durch Dominanz eher unwahrscheinlich, da es ansonsten möglich sein müsste allein durch Züchtung Inzuchtlinien zu erhalten, die alle vorteilhaften Allele vereinen und somit den Hybriden entsprächen (East 1936, Swanson-Wagner *et al.* 2006). Dies ist jedoch bisher nicht erreicht worden. Andere Arbeiten favorisierten anstelle der Dominanzhypothese eher die Überdominanzhypothese (Stuber *et al.* 1992, Li *et al.* 2001, Luo *et al.* 2001, Song und Messing 2003, Semel *et al.* 2006) oder die Pseudoüberdominanz (Cockerham und Zeng 1996, Crow 2000, Lippman und Zamir 2007) oder ließen der Epistasie eine übergeordnete Rolle zukommen (Schnell und Cockerham 1992, Yu *et al.* 1997, Meyer *et al.* 2004). Am wahrscheinlichsten ist jedoch, aufgrund der Komplexität von Heterosis und der bisher gewonnenen, gegensätzlichen Ergebnisse eine Beteiligung aller genetischen Modelle an Heterosis (Birchler *et al.* 2003). Zur Analyse der molekularen Aspekte von Heterosis sind diese genetischen Modelle jedoch nicht geeignet, da sie zu einer Zeit aufgestellt wurden, in der die molekularen Aspekte der Genetik noch nicht bekannt waren (Birchler *et al.* 2003).

1.2 Molekulare Basis von Heterosis

Zur Untersuchung der molekularen Basis von Heterosis erscheint es sinnvoll, die Gene zu identifizieren die innerhalb der Heterosis-relevanten Genorte liegen und mit Heterosis assoziiert sind. Aber trotz der Identifikation bestimmter QTLs, wurden innerhalb dieser Regionen bisher nur sehr wenige Heterosis-assozierte Gene identifiziert. Das könnte zum Einen an den komplexen genetischen und phänotypischen Interaktionen liegen die Heterosis ausmachen und welche es schwer machen eine Aussage darüber zu treffen welche Gene innerhalb der QTLs für den Heterosis-Effekt mit verantwortlich sind. Ein anderer Grund liegt in der Schwierigkeit die QTLs zu klonieren (Lippmann und Zamir 2007).

Neben den klassischen QTL Analysen wurden Genexpressionsanalysen zwischen verschiedenen Inzuchtlinien und solche zwischen den Inzuchteltern und deren Hybriden durchgeführt. Die Überlegung dahinter war, dass durch das Zusammenbringen zweier unterschiedlicher elterlicher Genome eine veränderte Genexpression in Hybriden entsteht, die zur Entstehung von Heterosis führt. Das Ziel dabei ist die Identifikation möglicher Heterosis-assoziiertes genomweiter Expressionsmuster. Bestätigt wird die Annahme, dass eine differentielle Genexpression der Inzuchteltern in der Ausbildung von Heterosis eine Rolle spielt, durch genomische Untersuchungen, die zeigen dass Mais das Getreide mit den größten Sequenzunterschieden zwischen Linien der gleichen Art ist (Zhao *et al.* 2006). Solche Sequenzunterschiede in Mais könnten zu einer unterschiedlichen Genexpression beitragen und somit die Beobachtung erklären warum Mais im Vergleich zu anderen Getreidearten einen besonders starken Heterosis-Effekt zeigt (Meyer *et al.* 2004, Hochholdinger und Hoecker 2007). Diese genomische Variabilität in verschiedenen Linien von Mais konnte bei Vergleichen zwischen den Inzuchtlinien B73 und Mo17 gezeigt werden, wo durchschnittlich alle 79bp ein Einzel-nukleotid-Polymorphismus (SNP, single nucleotide polymorphism) und alle 309bp eine Insertion bzw. Deletion (Indel) beobachtet werden konnte (Vroh Bi *et al.* 2006). Zudem konnte eine Abweichung von der genetischen Kolinearität beobachtet werden. So zeigte eine vergleichende Analyse einer genomischen Region in den Inzuchtlinien B73 und Mo17 größere Unterschiede im Gengehalt. Von den insgesamt 72 untersuchten Genen waren 27 Gene in einem der beiden Linien nicht vorhanden (Brunner *et al.* 2005). In Mais kann jedoch das Fehlen von Genen in bestimmten Linien, aufgrund der Tatsache, dass viele Gene Mitglieder kleiner Genfamilien sind, durch andere Mitglieder derselben Genfamilie teilweise komplementiert werden (Fu und Donner 2002). Eine Komplementierung fehlender oder funktionsuntüchtiger Gene in Mais durch das Genom einer anderen Inzuchtlinie in Hybriden könnte zum Heterosis-Effekt beitragen und stände in Übereinstimmung mit der Dominanzhypothese (Fu und Donner 2002).

Jedoch ist eine Erklärung von Heterosis allein auf der Grundlage von Unterschieden zwischen den Inzuchteltern nicht sehr sinnvoll, da die Qualität und die verwandtschaftliche Distanz der Inzuchteltern nicht in allen Fällen das Ausmaß von Heterosis widerspiegelt (Birchler 2003). Daher wurden zahlreiche Expressionsanalysen zwischen den Inzuchteltern und den Hybriden durchgeführt, um die molekularen Mechanismen näher zu untersuchen, die die Hybride von den Inzuchtlinien unterscheiden. Anfängliche Vergleiche zwischen Inzuchtlinien und Hybriden in Weizen und Mais ergaben signifikante Expressionsunterschiede (Sun *et al.* 1999, Song und Messing 2003). Die Expression in Hybriden kann generell in zwei Formen unterteilt

werden (Abb.3). Zum Einen in eine Expression, die dem Level der mittleren parentalen Expression entspricht. In diesem Fall spricht man von einer additiven Expression, die durch eine cis regulierte Expression im Hybriden entsteht (Wittkopp *et al.* 2004). Eine cis-regulierte Expression bedeutet, dass allein physikalisch mit dem Gen assoziierte Kontrollelemente (z.B. Enhancer, Promotor) die Genaktivität regulieren. Die zweite mögliche Expressionsform in Hybriden entspricht einer Expression, die von der mittleren parentalen Expression abweicht. Diese Form der Expression wird als nicht-additiv bezeichnet und resultiert aus einer trans-Regulation bzw. einer Kombination aus einer cis- und trans-regulierten Expression. Eine trans-regulierte Expression beinhaltet die Regulation durch Faktoren wie z.B. Transkriptionsfaktoren die mit den cis-Elementen in trans interagieren und somit die Expression entweder positiv oder negativ beeinflussen (Abb.3).

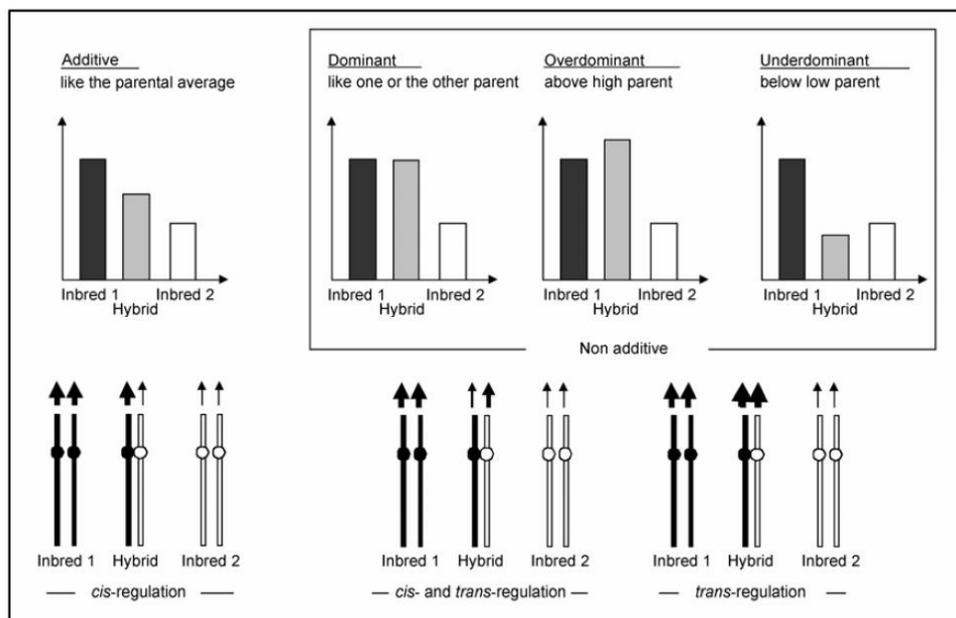


Abb.3: Genexpressionslevel in Hybriden und assoziierte Genregulationen.

Die Genexpression im Hybriden kann der mittleren Genexpression der Eltern entsprechen. In diesem Fall spricht man von einer additiven Genexpression. Weicht die Genexpression des Hybriden vom Mittel der Eltern ab, so spricht man von einer nicht-additiven Genexpression, die entweder der Expression einer der Eltern entsprechen (Dominant) kann oder über dem höher exprimierten Elter (Überdominant) bzw. unter dem schwächer exprimierten Elter (Unterdominant) liegen kann.

Eine additive Expression wird durch eine cis-regulierte Genexpression, also einer rein auf physikalisch verlinkten Kontrollelementen basierten Genregulation erzeugt. Eine nicht-additive Genexpression hingegen entsteht bei einer rein trans bzw. trans-cis kombinierten Genregulation. Eine trans-Regulation beruht auf einer auf trans-Faktoren (z.B. Transkriptionsfaktoren) basierenden Expression. (Thiemann *et al.* 2009)

Zahlreiche Untersuchungen, bezüglich der differentiellen Genexpression in Hybriden wurden bereits durchgeführt (Vuylsteke *et al.* 2005, Guo *et al.* 2006, Stupar und Springer 2006, Swanson-Wagner *et al.* 2006, Meyer *et al.* 2007, Uzarowska *et al.* 2007, Hoecker *et al.* 2008). Einige von ihnen ergaben eine vorwiegend nicht-additive Genexpression im Hybriden, wie z.B. bei Uzarowska *et al.* (2007), die eine Untersuchung an 434 ausgewählten differentiell

exprimierten Genen durchführten. Ebenfalls andere Studien wie die von Vuylsteke *et al.* (2000) in *Arabidopsis* und die von Huang *et al.* (2006) in Reis zeigten mittels Microarray-Analysen eine vorwiegend nicht-additive Genexpression in Hybriden auf. Zu einem gegenteiligen Ergebnis kamen, vor allem in Mais, eine Vielzahl anderer Studien, die deutlich eine überwiegend additive Genexpression aufzeigen konnten (Stupar und Springer 2006, Swanson-Wagner *et al.* 2006).

So waren in Keimlingen von Mais 78% der Gene und in einer vergleichenden Analyse von Keimlingen, unreifen Kolben und 19 Tage alten Embryos 61-81% der Gene additiv exprimiert (Stupar und Springer 2006, Swanson-Wagner *et al.* 2006). Die recht unterschiedlichen Ergebnisse sind wahrscheinlich auf die Untersuchung unterschiedlicher Arten, Gewebe und Entwicklungsstadien, sowohl unterschiedlicher Analysemethoden zurückzuführen (Hochholdinger und Hoecker 2007). Die unterschiedlichen Expressionsmuster in verschiedenen Spezies und Geweben bzw. Organen kann jedoch auch eine Erklärung für die Beobachtung sein, dass sich in verschiedenen Organen der Pflanze die Stärke von Heterosis stark voneinander unterscheiden kann (Hochholdinger und Hoecker 2007). So muss eine Pflanze mit starkem Heterosiseffekt in den vegetativen Organen, wie z.B. dem Keimling nicht automatisch zu einer Pflanze mit hohem Heterosiseffekt bezogen auf die reproduktiven Organe z.B. einem gesteigerten Ertrag führen (Chen 2010). Da an diesen Prozessen unterschiedliche Sets an Genen beteiligt sind, wäre für die Erstellung eines molekularen Modelles für Heterosis die Identifizierung individueller Gene sinnvoll (Chen 2010). Das ist jedoch bisher kaum geschehen. Ein Beispiel für ein einzelnes überdominantes Gen, welches im mutierten heterozygoten Zustand, eine Steigerung der Biomasse und des Ertrages bewirkt konnte in Tomate identifiziert werden (Krieger *et al.* 2010). Normalerweise, ist jedoch zu erwarten, dass mehr als nur ein Gen an der Ausbildung von Heterosis beteiligt ist.

Vielfach wird als Ursache von Heterosis eine unterschiedliche Expression im Hybriden im Vergleich zu den Eltern in Form dominanter, oder über-bzw. unterdominant exprimierter Gene angenommen. Ein davon abweichendes Model von Springer und Stupar (2007) steht mit der Beobachtung einer Vielzahl überwiegend additiv exprimierter Gene im Einklang. Das Model geht davon aus, dass bei der Züchtung der Inzuchtlinien häufig Genexpressionen bestimmter Gene fixiert werden können, die über bzw. unter dem optimalen Expressionsbereich liegen und einzeln betrachtet einen schwach, negativen Effekt auf den Phänotyp haben. Die Expression im Hybriden, die dem mittleren Expressionsniveau der Eltern entspricht sorgt für einen, über das gesamte Genom betrachteten Ausgleich dieser Über-bzw. Unterexpression bestimmter Gene, sodass die Expression im Hybriden in den optimalen Bereich fällt (Abb.4).

Eine von Guo *et al.* (2006) beobachtete positive Korrelation zwischen dem Anteil additiv exprimierter Gene und der Hybridleistung von Kornertag bzw. Heterosis und einer fehlenden Korrelation mit der Anzahl unter- bzw. überdominanter Gene stimmte mit dem Model von Springer und Stupar (2007) überein.

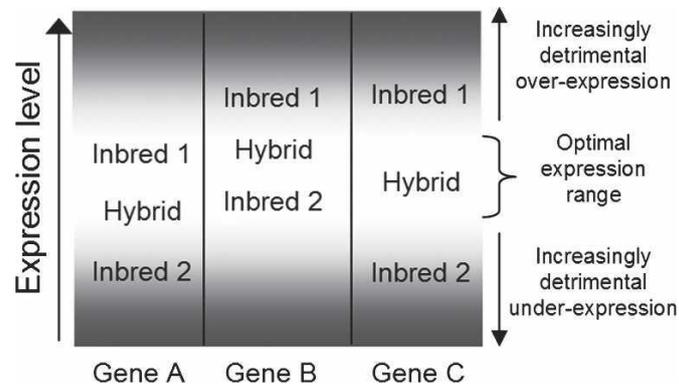


Abb.4: Modell zum Beitrag additiver Genexpression zu Heterosis.

Der Bereich optimaler Genexpression ist als weißer Bereich in der Mitte des Graphen dargestellt. Darüber und darunter befinden sich Bereiche mit zunehmender Graufärbung, die immer nachteiligere Bereiche der Expressionslevel der Gene A, B und C darstellen. (Springer und Stupar 2007).

1.3 Vorhersage von Heterosis

In einem kommerziellen Züchtungsprogramm von Mais ist die Auswahl geeigneter Inzuchtlinien zur Erzeugung neuer Hybride ein äußerst schwieriger Prozess. So müssen aufwendige zeit- und kostenintensive Feldversuche durchgeführt werden um für die Kreuzung geeignete Inzuchtlinien zu identifizieren. Hinzu kommt, dass aufgrund der großen Anzahl verfügbarer Inzuchtlinien innerhalb eines Züchtungsprogramms nicht alle möglichen Kreuzungen mittels Feldversuchen zwischen den Inzuchtlinien durchgeführt werden können. Vorhersagemodelle die dem Züchter verraten, welche Hybride auf dem Feld den größten Ertrag erzielen werden, sind somit von besonderem Interesse.

Eine Methode die Hybridleistung von Mais in Züchtungsprogrammen vorherzusagen, ist die Korrelation der Leistung der Eltern mit der der resultierenden Hybride. Die Vorhersagequalität schwankt jedoch stark in Abhängigkeit von dem untersuchten Hybridmerkmal und der Art des untersuchten Getreides (Duvick 1999). In Mais konnte gezeigt werden, dass insbesondere im Falle des Kornertags die Korrelation zwischen der Leistung der Eltern und der Hybridleistung nur sehr gering ausfiel (Hallauer und Miranda 1988). Gründe für die schlechte Korrelation sind vermutlich Effekte, wie die Komplementierung nachteiliger, rezessiver Allele im Hybriden sowie Epistasis- und Überdominanz-Effekte, die sich ebenfalls erst im Hybriden auswirken (Mihaljevic *et al.* 2005).

Die allgemeine Kombinationseignung („general combining ability“, GCA) und die spezifische Kombinationseignung („specific combining ability“, SCA) sind Begriffe aus der Züchtung mit deren Hilfe sich die Kombinationseignung einer Inzuchtlinie in einem Kreuzungssystem beschreiben lässt (Sprague und Tatum 1942). Die allgemeine Kombinationseignung einer Inzuchtlinie spiegelt die Abweichung eines Merkmals seiner Nachkommen vom Mittelwert aller gemessenen Nachkommen eines Kreuzungsschemas wider (Sprague und Tatum 1942). Mithilfe von GCA kann eine Vorhersage von Heterosis durchgeführt werden (Cockerham 1967, Melchinger *et al.* 1987), jedoch bedarf es dennoch einer Vielzahl von Feldversuchen um die GCA einer Inzuchtlinie zu bestimmen (Griffing 1956). Zudem ist eine Vorhersage der Hybridleistung mithilfe der GCA nur dann präzise solange der Wert von SCA gering ist. Die SCA beschreibt die Differenz zum erwarteten GCA Wert (Sprague und Tatum 1942). Dies bedeutet, dass bei einem hohen SCA Wert, die beobachtete Hybridleistung höher ausfällt als erwartet. Die genetischen Effekte die SCA bewirken, sind vermutlich Dominanz-, Überdominanz- oder Epistasis-Effekte, während GCA vermutlich durch additive Effekte erklärbar ist (Sprague und Tatum 1942).

In der kommerziellen Züchtung werden Inzuchtlinien in heterotische Gruppen eingeteilt. Die Inzuchtlinien innerhalb einer solchen Gruppe werden getrennt von den Inzuchtlinien anderer heterotischer Gruppen gezüchtet. Generell resultieren Kreuzungen zwischen Inzuchtlinien verschiedener heterotischer Gruppen in Hybriden mit einem hohen Heterosiseffekt, wohingegen Kreuzungen innerhalb einer heterotischen Gruppe zu Hybriden mit einem geringen Heterosiseffekt führen (Melchinger 1999). Jedoch ist die exakte Vorhersage der Hybridleistung durch die Nutzung heterotischer Gruppen nicht gegeben (Tracy und Chandler 2008). Das Prinzip der heterotischen Gruppen beruht auf der Beobachtung einer positiven Korrelation zwischen der verwandtschaftlichen, genetischen Distanz der Inzuchteltern und Heterosis (Lee *et al.* 1989). Zur Bestimmung der genetischen Distanz und somit zur Vorhersage von Heterosis wurden verschiedene genetische Marker verwendet, wie z.B. RFLP-Marker (restriction fragment length polymorphism) (Lee *et al.* 1989, Melchinger *et al.* 1990, 1992, Smith *et al.* 1990, Dudley *et al.* 1991, Boppenmaier *et al.* 1993, Burstin *et al.* 1995) oder AFLP-Marker (amplified fragment length polymorphism) (Ajimone Marsan *et al.* 1998). Eine Schwierigkeit bei der Vorhersage von Heterosis mittels der genetischen Distanz der Inzuchteltern ist die Beobachtung, dass mit zunehmender Distanz die Korrelation zu Heterosis ab einem bestimmten Punkt wieder abnimmt (Moll 1965, Melchinger 1999). Es scheint also, als ob die genetische Distanz nicht den alleinigen Faktor bei der Ausbildung von Heterosis ausmacht. Aktuellere Vorhersagemodelle versuchen daher z.B. genetische Marker zu

verwenden, die mit der Hybridleistung und SCA assoziiert sind (Vuylsteke *et al.* 2000, Schrag *et al.* 2006, Schrag *et al.* 2007, Schrag *et al.* 2009).

Neben der Verwendung genetischer Marker werden in Vorhersagemodellen seit kurzem auch Transkriptom- (Frisch *et al.* 2010, Stokes *et al.* 2010), Proteom- (Xie *et al.* 2006), oder Metabolom-Daten (Korn *et al.* 2010, Steinfath *et al.* 2010) immer stärker verwendet. Diese Daten geben Informationen über Heterosis, die in der Vorhersage verwendet werden können, da Heterosis nicht ein lokales, sondern mit größter Wahrscheinlichkeit ein genomweites Phänomen darstellt, welches zu Veränderungen in der Gen- und Proteinexpression und somit auch zu Veränderungen im Metabolom führt. Um die Relation zwischen der Genexpression und Heterosis zu zeigen wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl von Untersuchungen durchgeführt, die eine differentielle Expression zwischen den Inzuchteltern und den Hybriden zeigen konnten (Hochholdinger und Hoecker 2007). Zusätzlich konnte Guo *et al.* (2006) eine positive Korrelation zwischen der Anzahl differentiell zwischen den Inzuchteltern exprimierter Gene und Heterosis für Kornertrag in Mais zeigen.

Im Jahr 2010 veröffentlichten Stokes *et al.* (2010) und Frisch *et al.* (2010) Arbeiten in denen Transkriptomdaten zur Vorhersage von Heterosis bzw. der Hybridleistung verwendet wurden. Stokes *et al.* (2010) identifizierten erfolgreich Gene aus *Arabidopsis thaliana* bzw. aus Mais, deren paternale Genexpression mit der BPH der Biomasse bzw. des Kornertrages des Hybriden korrelierten. Dabei wurde im Falle von Mais das Transkriptom von Blattmaterial der Keimlinge verwendet, um Vorhersagen über den Kornertrag ausgewachsener Hybride zu treffen.

Frisch *et al.* (2010) hingegen verwendete die Transkriptomdaten nicht nur eines Elters sondern beider Inzuchteltern zur Identifizierung parental differentiell exprimierter Gene um auf der Basis einiger ausgewählter differentiell exprimierter Gene die Distanz zwischen den Inzuchteltern zu bestimmen. Die auf Basis einiger ausgewählter Gene berechnete Distanz war hoch korreliert mit Heterosis bzw. mit der Hybridleistung von Kornertrag und stellte den bestimmenden Faktor im Vorhersagemodell dar. Der Unterschied zu Stokes *et al.* (2010) ist, dass hierbei die umfangreichen Hybriddaten eines Züchtungsprogrammes, mit unterschiedlichen Anzuchtstandorten in Deutschland zur Identifikation korrelierter Gene verwendet wurden. Außerdem wurde eine größere Anzahl von Hybriden (insgesamt 98) in das Vorhersagemodell integriert. Die Genauigkeit der Transkriptom basierten Vorhersage wurde zudem mit der auf Felddaten beruhenden GCA und einer auf genetischen Markern basierten Vorhersagemethode von Schrag *et al.* (2007) verglichen und erzielte dabei bessere Ergebnisse. Die

Transkriptomdaten, die bei Frisch *et al.* (2010) verwendet wurden, stammten von sieben Tagen alten Inzuchtlinien, die im Zuge dieser Promotionsarbeit unter kontrollierten Bedingungen im Klimaschrank, zur Minimalisierung umweltbedingter Effekte, angezogen und auch zur Charakterisierung von Heterosis verwendet wurden (Thiemann *et al.* 2010).

1.4 Gene Silencing

Seit kurzem wird ebenfalls über die Beteiligung kurzer RNAs am Heterosiseffekt diskutiert. Der Begriff kurze RNAs umschreibt eine sehr diverse Gruppe kurzer 21-40 nt langer RNAs zu denen die sogenannten miRNAs (micro-RNAs) (Bartel 2004) und die siRNAs (small interfering RNAs) (Baulcombe 2004) gehören.

Hinweise darauf, dass kurze RNAs einen Einfluss auf den Heterosiseffekt haben könnten, stammen unter Anderem von DNA-Methylierungsanalysen, die einen Unterschied zwischen dem Hybrid und seinen Eltern in Reis nachweisen konnten. Solche Veränderungen in der DNA-Methylierung konnten nicht nur bei Transposons sondern auch in Sequenzen von Genen mit bekannter Funktion in Mais und Sorghum nachgewiesen werden (Zhang *et al.* 2007, Zhao *et al.* 2007). Ein weiterer Hinweis stammt aus Untersuchungen von Hybriden und dessen Inzuchteltern in *Arabidopsis*, in denen eine Reduktion der 24 nt langen kurzen RNAs im Hybriden nachgewiesen werden konnte (Groszmann *et al.* 2011). Die reduzierten kurzen RNAs waren größtenteils mit Genen und ihren flankierenden Regionen assoziiert, was auf eine Regulation der Genexpression deuten lässt. Diese durch epigenetische Regulation betroffenen Allele werden als Epi-Allele bezeichnet und sorgen eventuell für eine größere allelische Variabilität im Hybriden, was eventuell zu Heterosis beitragen könnte (Groszmann *et al.* 2011). Zusätzlich hierzu wurde in Mais eine positive Korrelation zwischen dem parentalen Unterschied in der CHG-Methylierung und Heterosis für Kornertrag beobachtet (Qi *et al.* 2010). All diese Ergebnisse machen eine Beteiligung kurzer RNAs an der Ausbildung von Heterosis sehr wahrscheinlich.

Gene Silencing ist ein Prozess, der in allen höheren Eukaryoten vorkommt und von kleinen doppelsträngigen 21-30 nt langen RNAs reguliert wird (Li 2006, Ding und Voinnet 2007). Zu diesen kurzen RNAs zählen die micro-RNAs (miRNAs) und die short interfering RNAs (siRNAs). Bei den miRNAs handelt es sich um endogene, einzelsträngige, nichtkodierende RNAs mit einer Länge von ca. 21 Nukleotiden (Jones-Rhoades *et al.* 2006). Sie werden

zunächst in Form eines längeren doppelsträngigen Precursors transkribiert und dann aus einer Stem-loop Region prozessiert (Hammond 2005).

Der generelle Ablauf des Gene Silencings, welcher in Abb.5 dargestellt ist, beinhaltet sowohl im Fall der miRNAs als auch der siRNAs die Bindung eines Proteins mit dem Namen Dicer an die doppelsträngigen RNA-Vorläufermoleküle in Form eines Heterodimers. In *Arabidopsis* existieren 4 verschiedene Dicer Proteine, DCL1-4 (Dicer-like Protein 1-4), die jeweils an der Prozessierung unterschiedlicher kurzer RNAs beteiligt sind. So ist DCL1 an der Prozessierung der miRNAs (Bartel 2004) und die restlichen DCL an der Prozessierung unterschiedlich langer siRNAs beteiligt (Brodersen und Voinnet 2006). Die reife kurze RNA wird zusammen mit Dicer und dem dsRNA-Bindeprotein R2D2 und einem Protein namens Argonaut (Ago) zum RNA induced silencing complex (RISC) zusammengefügt. Hier wird der sogenannte „passenger“ Strang der kurzen RNA von Ago entfernt (Matranga *et al.* 2005, Hall *et al.* 2006). Der übrig gebliebene „guide“ Strang leitet im Anschluss den RISC-Komplex zur komplementären Ziel-RNA, wo sie entweder von Ago geschnitten, einen Translationsstopp oder eine Chromatin bzw. DNA-Modifizierung bewirkt wird (Martinez *et al.* 2002, Ding und Voinnet 2007).

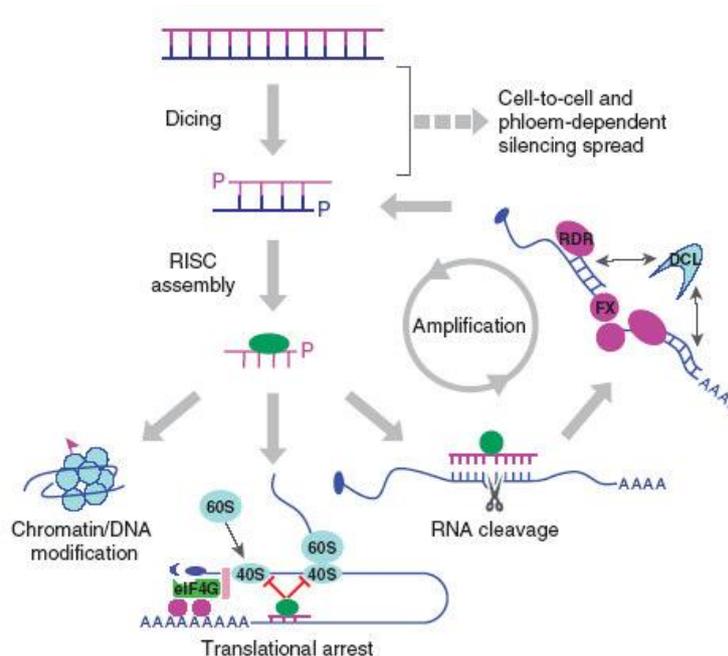


Abb.5: Gene Silencing in Pflanzen.

Doppelsträngige RNA oder pre-miRNA wird von Dicer erkannt und in kurze doppelsträngige RNAs (siRNAs oder miRNAs) prozessiert. Der RISC-Komplex schneidet den passenger-Strang und der verbliebende guide-Strang führt den RISC-Komplex an die komplementäre Zielsequenz wo entweder eine Chromatin/DNA-Modifikation, eine translationelle Inhibierung oder ein Schneiden der Ziel-RNA erfolgt. RNA-abhängige RNA-Polymerasen (RDRs) sorgen für eine Amplifikation des Gene Silencings durch eine Synthese sekundärer siRNAs (transitives Silencing). Eine Ausbreitung des Silencing Signals erfolgt durch die Plasmodesmata entweder durch ein „short-range-signaling“ von Zelle zu Zelle oder über das Phloem in andere Bereiche der Pflanze („long-range-signalling“). (Li und Ding 2006)

In Pilzen, Pflanzen und Würmern existiert ein Prozess der das Gene Silencing Signal noch verstärken kann. Dabei synthetisieren eukaryotische RNA-abhängige RNA-Polymerasen (RdRps) doppelsträngige RNA, die dann erneut von Dicer in kurze RNAs prozessiert werden und somit zu einer Verstärkung als auch einer Ausweitung der Spezifität sorgen (Sijen *et al.* 2001, Vaistij *et al.* 2002).

Gene Silencing dient in Pflanzen neben der endogenen Genregulation außerdem zur Abwehr von phytopathogenen Viren. Hierbei erkennt Dicer doppelsträngige virale RNAs, wie z.B. bei der Replikation des viralen Genoms oder beim Auftreten doppelsträngiger Bereiche viraler Transkripte. Das Gene Silencing der Pflanze bewirkt dann einen sequenzspezifischen Abbau der viralen RNA (Voinnet 2005).

1.5 Der virale Gene Silencing Suppressor P1/HC-Pro aus WSMV

In dieser Arbeit wurde in einem Versuch ein putativer Gene Silencing Suppressor mit dem Namen P1/HC-Pro aus Weizenstrichelmosaikvirus (WSMV) verwendet, um die Beteiligung kurzer RNAs am Heterosiseffekt zu untersuchen. Gene Silencing Suppressoren sind Proteine aus pflanzenpathogenen Viren, welche die virale pflanzliche Abwehr in Form des Gene Silencings inhibieren können (Moissiard und Voinnet 2004, Saumet und Lecellier 2006).

Das Weizenstrichelmosaikvirus gehört zur Familie der *Potyviridae* und zur Gattung der *Tritimoviren* (Stenger *et al.* 1998). Neben den *Tritimoviren* gehören noch fünf weitere Gattungen der Familie der *Potyviridae* an, die *Bymoviren*, die *Rymoviren*, die *Macluraviren*, die *Ipomaviren* und die Gattung der *Potyviren*. WSMV infiziert primär Weizen wo es schwere Symptome erzeugt, vermehrt sich jedoch ebenfalls in anderen Gräsern wie z.B. Mais oder Gerste. Einige Mais-Inzuchtlinien sind besonders anfällig für WSMV, wo sich das Virus stark vermehren jedoch keine schweren Symptome erzeugen konnte (Marcon *et al.* 1997). WSMV besitzt ein einzelsträngiges RNA-Genom mit einer Gesamtlänge von 9384 Nukleotiden (Stenger *et al.* 1998). Das Genom kodiert für ein einzelnes Polyprotein, welches im Anschluss an die Translation durch autokatalytische Spaltung in reife Proteine prozessiert wird (Abb.6). Die Proteine P1 und HC-Pro befinden sich am N-Terminus des Polyproteins und werden durch eine proteolytische Spaltung von P1 voneinander getrennt, während HC-Pro sich selbst an seinem C-Terminus vom restlichen Polyprotein abspaltet (Choi *et al.* 2000, Choi *et al.* 2002).

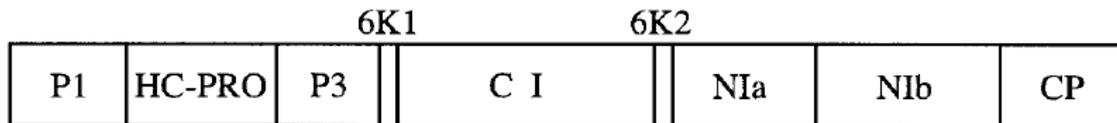


Abb.6: Schematische Darstellung des WSMV Polyproteins.

Die vertikalen Linien stellen die putativen proteolytischen Schnittstellen, abgeleitet von der genomischen Sequenz, dar. (Choi *et al.* 2000)

Überlegungen, die auf eine Suppressorwirkung des P1/HC-Pro Konstruktes aus WSMV schließen lassen, sind zum Einen die Verwandtschaft und der gleiche Genomaufbau mit den *Potyviren*, bei denen bereits eine Suppressorwirkung für HC-Pro erfolgreich nachgewiesen werden konnte (Anandalakshmi *et al.* 1998, Brigneti *et al.* 1998, Kasschau und Carrington 1998). Außerdem erzeugt WSMV, wie auch schon zuvor für TEV (*Tobacco etch virus*, *Potyvirus*) gezeigt, bei einer Co-Infiltration mit MCMV (*Maize chlorotic mottle virus*) in Mais einen Synergie-Effekt, der eine starke systemische Chlorose der Maispflanze verursacht und ein starkes Indiz für das Vorhandensein eines Suppressors darstellt (Stenger *et al.* 2007), der in Mais erfolgreich Gene Silencing inhibiert. Jedoch konnte durch Deletionsversuche und einem Agrobakterium-vermittelten Coinfiltrationsversuch gezeigt werden, dass HC-Pro im Fall von WSMV nicht der Gene Silencing Suppressor ist (Stenger *et al.* 2007). In einer Dissertation von Sentner (2008) konnte jedoch mittels transienter Expressionsversuche in Weizenembryos eine Suppressorwirkung für P1 nachgewiesen werden. P1 war im Gegensatz zu HC-Pro aus WSMV dazu in der Lage das Gene Silencing von GFP zu inhibieren.

1.6 Zielsetzung

Heterosis hat seit seiner Entdeckung, in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts zu einem stetigen Anstieg der Vitalität und des Ertrages im Getreideanbau beigetragen. Trotz dieser großen agrarwirtschaftlichen Bedeutung sind die genetischen und molekularbiologischen Mechanismen, welche zur Ausbildung von Heterosis führen, noch längst nicht vollständig verstanden.

Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Charakterisierung von Heterosis des Kornertrags und zwei weiterer Hybridmerkmale; der Hybridleistung von Kornertrag und der Korntrockenmasse. Hierfür sollten zunächst genomweite Expressionsanalysen parentaler Inzuchtlinien, welche aus einem umfangreichen Züchtungsprogramm der Universität Hohenheim stammten, durchgeführt werden. Mit Hilfe von Korrelationsanalysen und den verfügbaren Felddaten, von insgesamt 98 Hybriden, sollten im Anschluss Gene identifiziert werden, deren parentale

Expressionsniveaus mit den Werten der Hybridleistungen bzw. von Heterosis korrelierten. Diese Gene sollten dazu beitragen wichtige biologische Prozesse und genomische Bereiche von Heterosis und den anderen Hybridmerkmalen zu identifizieren und unser Verständnis über die Entstehung von Heterosis in Mais zu erweitern. Desweiteren sollte, mittels eines eigens hergestellten Mikroarrays, die Expression der Hybridmerkmal korrelierten Gene in den Hybriden und den Inzuchteltern miteinander verglichen werden, um weitere Erkenntnisse über die Regulierung der Genexpression in den Keimlingen der Hybride zu erlangen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Bereitstellung von genomweiten Expressionsprofilen 7 Tage alter Maiskeimlinge für die Etablierung eines Heterosis-Vorhersagemodells, denn neben der Charakterisierung von Heterosis ist für die Züchtung die exakte Vorhersage in Züchtungsprogrammen von besonders großem Interesse. Bisherige Vorhersagemodelle basieren z.T. auf genomischen Markern oder auf Methoden wie der Bestimmung der allgemeinen Kombinationseignung (GCA), die eine große Anzahl an Feldversuchen benötigt und dadurch den Züchtern Zeit und Geld kostet. Genomweite Expressionsprofile der Inzuchteltern könnten in Zukunft die Vorhersage präzisieren und effektiver gestalten.

In einem weiteren Versuch sollte die potentielle Beteiligung kurzer RNAs in Form des Gene Silencings am Heterosis-Effekt untersucht werden. Hierfür sollten transgene Maispflanzen mit einem viralen Gene Silencing Suppressor aus dem Weizenstrichelmosaikvirus in Kreuzungen von Mais verwendet und dessen Wirkung auf Heterosis in den Hybriden gemessen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzen

In dieser Arbeit wurden Inzuchtlinien und Hybride von Mais aus insgesamt drei faktoriellen Kreuzungsexperimenten (Exp1, Exp2, Exp3) der Universität Hohenheim (Schrag *et al.* 2006) zur Identifizierung Heterosis bzw. Hybridleistung von Kornertrag oder der Hybridleistung der Korntrockenmasse korrelierter Gene verwendet. Desweiteren wurden die Expressionslevel der am signifikantesten korrelierten Gene in einigen ausgewählten Hybriden untersucht. Weitere Maispflanzen in dieser Arbeit umfassten transgene Pflanzen, die den viralen Gene Silencing Suppressor P1/HC-Pro aus dem Weizenstrichelmosaikvirus (WSMV) exprimierten, sowie die Inzuchtlinien A188 und H99 zur Untersuchung der putativen Rolle kurzer RNAs bei der Ausbildung von Heterosis.

2.1.1.1 Inzuchtlinien und Hybride von Mais aus einem Züchtungsprogramm der Universität Hohenheim

Insgesamt 23 Maisinzuchtlinien und neun Hybride aus einem Züchtungsprogramm der Universität Hohenheim (Deutschland) wurden in dieser Arbeit verwendet. Diese wurden von Prof. Dr. A. E. Melchinger zur Verfügung gestellt. Die Inzuchtlinien lassen sich in acht Hartmaislinien (Flint) (F012, F037, F039, F043, F047, L024, L035, L043) und fünfzehn Zahnmaislinien (Dent) (P024, P033, P040, P046, P048, P063, P066, S028, S036, S044, S046, S049, S050, S058, S067) unterteilen. Fünf der insgesamt sieben Hartmaislinien besitzen einen europäischen Flint-Hintergrund (F012, F037, F039, F043, F047), die übrigen drei einen Flint/Lancaster Hintergrund (L024, L035, L043). Die Zahnmaislinien hingegen setzen sich aus acht Linien mit einem Iowa Stiff Stalk Synthetic Hintergrund (S028, S036, S044, S046, S049, S050, S058, S067) und sieben Linien mit einem Iodent Hintergrund (P024, P033, P040, P046, P048, P063, P066) zusammen. Die Hartmaislinien und Zahnmaislinien gehören unterschiedlichen heterotischen Gruppen an, die während ihrer Züchtung genetisch voneinander getrennt gehalten wurden. Bei der Kreuzung einer Hartmaislinie mit einer Zahnmaislinie, sprich der Kreuzung zweier Inzuchtlinien unterschiedlicher heterotischer Gruppen (interpool

Kreuzung), zeichnen sich die Hybride generell durch ein höheres Maß an Heterosis im Vergleich zu Kreuzungen innerhalb einer heterotischen Gruppe aus (intrapool Kreuzungen).

Von den insgesamt 23 Inzuchtlinien stammten 21 (F037, F039, F043, F047, L024, L035, L043, P033, P040, P046, P048, P063, P066, S028, S036, S044, S046, S049, S050, S058, S067) aus einem Zahnmaislinien vs. Hartmaislinien faktoriellen Kreuzungsexperiment (14 x 7), welches von Schrag *et al.* (2006) als Experiment 1 (Exp1) bezeichnet wurde. Zusätzlich zu den 21 Inzuchtlinien aus Exp1 wurden in dieser Arbeit noch 2 weitere Inzuchtlinien und ihre jeweiligen Hybride näher untersucht, die aus zwei weiteren faktoriellen Kreuzungsexperimenten (Exp2, Exp3) stammten (Schrag *et al.* 2006). So stammte F012 aus Exp2 und P024 aus Exp2 und Exp3.

Von den insgesamt neun Hybriden aus Kreuzungen zwischen Hartmais- und Zahnmaislinien stammten fünf aus Exp1 (S028xL024, S028xF039, S036xL024, F047xP033, F047xP048), zwei aus Exp2 (F012xP024, S028xF012) und einer aus Exp3 (P024xF039) sowie ein weiterer aus einer intrapool-Kreuzung zwischen zwei Hartmaislinien (F012xF039).

Alle faktoriellen Experimente wurden für die Dauer eines Jahres in 4-6 verschiedenen Standorten in Deutschland unter verschiedenen agrarökologischen Bedingungen von der Universität Hohenheim durchgeführt. Die faktoriellen Kreuzungen wurden mittels 2-Reihen Plot und benachbarten α -Design mit 2-3 Replikaten durchgeführt (Schrag *et al.* 2006). Sowohl bei den Hybriden, als auch bei den Inzuchtlinien wurde der Kornertrag (in Mg/ha, eingestellt auf 155 g/kg Kornfeuchtigkeit) und die Korntrockenmasse (in Prozent) gemessen und der Wert für die mittlere parentale Heterosis (MPH) berechnet. Die MPH beschreibt dabei den Zuwachs des Hybriden im Vergleich zum Mittel der beiden Inzuchteltern. Die gemessenen Werte für die Korntrockenmasse der 21 Inzuchtlinien aus Exp1 lagen zwischen 64,9 und 75,59% und die des Kornertrages zwischen 64,06 und 75,88 Mg/ha. Die Werte für die Hybride aus Exp1 lagen bei der Korntrockenmasse zwischen 67,42 und 72,63% und beim Kornertrag zwischen 97,01 und 117,75 Mg/ha. Für MPH vom Kornertrag lagen die Werte aus Exp1 zwischen 40,07 und 65,12 Mg/ha (Schrag *et al.* 2006).

2.1.1.2 Transgene P1/HC-Pro Maispflanzen

Die transgenen Maispflanzen mit dem P1/HC-Pro-Konstrukt wurden von Dr. Jose Gutierrez-Marcos von der Universität Warwick (UK) zur Verfügung gestellt und stammen aus einer Agrobakterium-Transformation mit Hi-II Mais. Vor Beginn dieser Promotionsarbeit wurden

die Pflanzen achtmal im Gewächshaus mit der Inzuchtlinie A188 zurückgekreuzt, zur Erzeugung transgener Inzuchtlinien. Das Konstrukt in den Pflanzen enthält eine Herbizidresistenz in Form des bar (bialaphos resistance) Gens, welches für eine Phosphinothricin-Acetyltransferase (PAT) kodiert und eine Resistenz gegen das Herbizid Basta® (Bayer CropScience AG, Lyon, Frankreich) bewirkt. Außerdem besitzt das Konstrukt einen Ubi3-Promotor, der durch Dexamethason aktiviert wird und die Transkription des Gal4-Transkriptionsfaktors bedingt. Dieser aktiviert wiederum einen bidirektionalen Promotor, der zum Einen den Gene Silencing Suppressor P1/HC-Pro aus dem Weizenstrichelmosaikvirus (WSMV) und zum Anderen das gus (β -Glucuronidase)-Gen transkribiert. Gus diente als Reporter für eine erfolgreiche Expression des Transgens in der Pflanze (Abb.7).

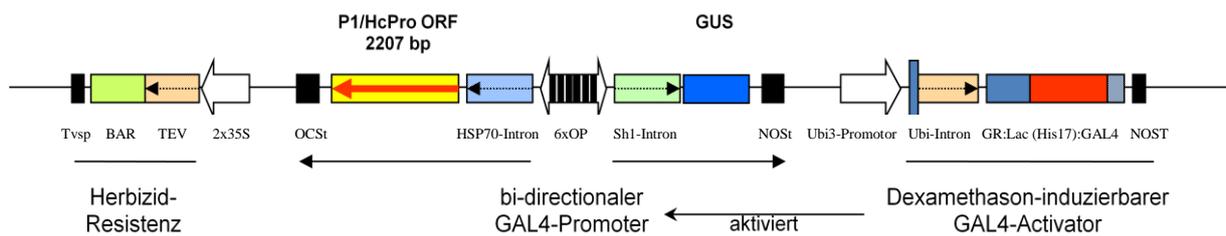


Abb.7: Schematische Darstellung des P1/HC-Pro Konstruktes.
Zur Erklärung siehe laufender Text.

2.1.2 Chemikalien, Puffer und Medien

Alle verwendeten Chemikalien stammten, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt) und Carl Roth (Karlsruhe). Die Agarose zur Herstellung von Gelen stammte von der Firma Invitrogen (Carlsbad, USA). Alle angesetzten Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser aus einer Deionisierungsanlage (MilliQ, Millipore) angesetzt. Bei Reaktionen, die Fluoreszenzfarbstoffe enthielten wurde hingegen bidestilliertes Wasser der Firma AppliChem (Darmstadt) verwendet.

Die Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 und Cy5 für die Mikroarray-Analysen stammten von der Firma GE Healthcare (Chalfont St Giles, UK). Allgemein gebräuchliche Puffer und Medien wurden, wenn nicht anders vermerkt, nach Protokollen von Sambrook *et al.* (1989) angesetzt.

2.1.3 Enzyme

Der Großteil der verwendeten Enzyme stammte, sofern nicht anders angegeben, von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot).

2.1.4 Primer

Die Primer wurden mit Hilfe der Software Lasergene (Version 4.0) der Firma DNASTAR Inc. (Madison, USA) am Computer entworfen und von der Firma Metabion (München) synthetisiert und anschließend Stocklösungen (100µM) und Arbeitslösungen (10µM) angesetzt. Die Tabelle 1 zeigt die Primersequenzen mit ihren Bezeichnungen und der jeweiligen Schmelztemperatur. Die Sequenz des T7polydT-Primers weist einen T7-Promotor auf, der für die *in vitro*-Transkription zur Herstellung der aminoallyl-RNA-Sonden benötigt wurde.

Tabelle 1: Verwendete Primer mit ihrer jeweiligen Sequenz sowie der Schmelztemperatur T_m .

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz (5´-3´)	T_m (Schmelztemperatur)
T7polydT	ggc cag tga att gta ata <u>cga ctc act ata ggg</u> agg cgg ttt ttt ttt ttt ttt ttt ttt	-
Q_actin ex2_fw	tcc tga cac tga agt acc cga ttg a	58°C
Q_actin ex2_rev	cgt tgt aga agg tgt gat gcc agt t	58°C
MZ00042747_fw	cag cag gag cag aag agg gaa aag	59°C
MZ00042747_rev	gaa acc ata aca gac gcg tca tca cat c	60°C
MZ00000855_fw	tag gct gct att tgg gca ctt agt ttt ac	59°C
MZ00000855_rev	cca gta cgg gag aca tgt aga gtt c	59°C
HC-Pro_fw	ggc gac caa gca gtg aac aaa g	57°C
HC-Pro_rev	cat aaa agg tcg cca tcc agt caa g	58°C
P1-fw	gcg gca agt gta ggt cca g	55°C
P1-rev	ggc aag gct tcc agg taa c	53°C

Die unterstrichene Sequenz ist die Promotor-Sequenz einer T7-RNA-Polymerase. fw: Vorwärtsprimer; rev: Rückwärtsprimer

2.1.5 Molekulargewichtsstandards

Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung von Nukleinsäuren wurde als Molekulargewichtsstandard der GeneRuler™ 1kb DNA Ladder der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Methoden, wie Fällungen und gelelektrophoretische Auftrennungen, wurden wenn nicht anders vermerkt, wie bei Sambrook *et al.* (1989) beschrieben durchgeführt. Alle verwendeten Kits und Enzyme wurden ebenfalls, wenn nicht anders beschrieben, nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCRs wurden nach Angaben des Herstellers DNA Cloning Service (Hamburg) durchgeführt. Die eingesetzte Templatemenge entsprach bei genomischer DNA (gDNA) 100ng, bei copy-DNA (cDNA) 50ng und bei Plasmid-DNA einer Menge von 10ng. Das PCR-Programm im Thermocycler (Biometra, Göttingen) lautete, wenn nicht anders vermerkt, wie folgt:

- 95°C, 2min (Denaturierung)
 - 95°C, 45sec
 - Annealingtemperatur (Primerspezifisch), 45sec
 - 72°C, 1min/1000bp (Elongation)
- } **30 Zyklen**
- 72°C, 5min (finale Elongation)
 - 4°C, Pause

2.2.3 RNA-Isolierung

Gesamt-RNA wurde anhand eines abgewandelten Protokolls nach Sambrook *et al.* (1989) isoliert. Die Isolierung erfolgte mittels eines Extraktionspuffers (200mM NaCl, 50 mM Tris (pH 8,8-9,0), 5mM EDTA (pH 8,0), 1% SDS), gefolgt von einer Chloroform-Phenol Aufreinigung, einer Lithiumchlorid-Präzipitation und einer Ethanol-Fällung. Die RNA wurde im Anschluss an die Isolierung mit dem NucleoSpin RNA Clean-up Kit (Macherey-Nagel,

Düren, Deutschland) aufgereinigt und die Qualität der RNA mittels einer denaturierenden, gelelektrophoretischen Auftrennung überprüft.

2.2.4 46k-Mikroarray

Das 46k-Array der Universität Arizona (USA) aus dem „Maize Oligonucleotide Array Project“ (<http://www.maizearray.org>) wurde zur Untersuchung der genomweiten Expression der 21 elterlichen Inzuchtlinien aus dem Exp1 des Züchtungsprogrammes der Universität Hohenheim (Deutschland) verwendet. Auf dem Array befanden sich insgesamt 46.128 Oligonukleotide (43.381 davon Gen-bezogen) mit einer Länge von 50-70 Nukleotiden. Die Oligonukleotide stammten von Expressionsdaten aus 16 unterschiedlichen Mais-Geweben und wurden von ESTs, cDNAs und genomischen Sequenzen abgeleitet. Die Hybridisierungen zwischen den 21 Inzuchtlinien erfolgten nach einem sogenannten „interwoven loop design“ (Kapitel 3.2, Abb.10), basierend auf einer Studie von Kerr und Churchill (2001). Ziel des Hybridisierungsschemas war es eine möglichst geringe durchschnittliche Varianz zwischen den Hybridisierungen zu erreichen, vor allem zwischen Linien unterschiedlicher heterotischer Gruppen, welche in dieser Arbeit von gesondertem Interesse waren. Außerdem wurden die Hybridisierungen so durchgeführt, dass die Farbstoffe (Cy3, Cy5), welche zur Markierung der aminoalyl-RNAs verwendet wurden, alternierten um einen systemischen Fehler zu reduzieren.

2.2.4.1 Annotation des 46k-Arrays (Blast2GO)

Mittels des Programms Blast2GO (Version 2.4.8) (<http://www.blast2go.org>) (Götz *et al.* 2008) wurde eine Neu-Annotation des 46k-Arrays durchgeführt. Blast2GO verwendete dabei die sogenannten Original-Sequenzen des „Maize Oligonucleotide Array Projects“ (<http://www.maizearray.org>) aus der Datei „remapping_version4_57452_fasta“, die in der ursprünglichen Array-Annotation bereits die Informationen für die Oligonukleotide geliefert haben. Blast2GO führte mit diesen Original-Sequenzen eine Suche in NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) mit dem Blast Programm blastx durch. Der Grenzwert für die E-Werte betrug $1e^{-3}$. Im Anschluss an die Blastx-Suche erfolgte eine GO-Annotation der Treffer in Blast2GO.

2.2.4.2 Anzucht der 21 Maisinzuchtlinien für das 46k-Mikroarray

Die 21 Maisinzuchtlinien (F037, F039, F043, F047, L024, L035, L043, P033, P040, P046, P048, P063, P066, S028, S036, S044, S046, S049, S050, S058, S067) aus dem Experiment 1 (Schrag *et al.* 2006) des Züchtungsprogrammes der Universität Hohenheim (Deutschland) wurden für die Mikroarray-Versuche mit dem 46k-Array in einem Klimaschrank (Percival Scientific Inc., Perry, USA) unter regulierten Bedingungen (16 Std. Tag bei 25°C, 8 Std. Nacht bei 21°C, 70% Luftfeuchtigkeit) für einen Zeitraum von 7 Tagen angezogen. Dabei wurde jeweils ein Keimling jeder Maisinzuchtlinie zufällig verteilt in einer 6 x 4 Anzuchtplatte angezogen und dieser Schritt fünfmal wiederholt. Die fünf Keimlinge (5 biologische Replikate) jeder Maisinzuchtlinie wurden anschließend vereint, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Anschluss gemörsert. Zum Schluss wurde eine RNA-Isolierung (Kapitel 2.2.3) mit dem gemörserten Pflanzenmaterial durchgeführt.

2.2.4.3 Herstellung von RNA-Sonden und die 46k-Array-Hybridisierung

Im Anschluss an die RNA-Isolierung (Kapitel 2.2.3) wurde mittels der isolierten Gesamt-RNA, aminoallyl-RNA (aRNA) mit Hilfe des Kits „Amino Allyl MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit“ (Applied Biosystems/Ambion, Austin, USA) synthetisiert. Die Herstellung und Markierung der aRNAs mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 bzw. Cy5 (GE Healthcare, Chalfont St.Giles, UK) geschah nach dem Protokoll „RNA amplification and Cy Dye Coupling“ vom „Maize Oligonucleotide Array Project“ (<http://www.maizearray.org>). Das „RNeasy MinElute Kit“ von Qiagen (Hilden, Deutschland) wurde hierbei zur Aufreinigung der RNAs und zum Entfernen ungebundener Cy-Farbstoffe verwendet. Die Hybridisierung der 46k-Mikroarrays erfolgte nach dem Protokoll „Hybridization with cRNA Targets“ (<http://www.maizearray.org>).

Die bioinformatische Auswertung der Mikroarray-Daten erfolgte mittels des Programms GenePix Pro 4.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Die Normalisierung der Daten erfolgte an der Universität Hohenheim in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. E. Melchinger durch Dr. Junjie Fu anhand des LIMMA Programms (Version 2.9) von Bioconductor (Gentleman *et al.* 2004). Die Normalisierung beinhaltete einen Prozess bestehend aus 2-Schritten; zum Einen einer Normalisierung innerhalb eines Arrays mittels „print-tip group

loss“ und zum Anderen einer Normalisierung zwischen den unterschiedlichen Hybridisierungen.

2.2.4.4 Identifizierung differentiell exprimierter und Hybridmerkmal korrelierter Gene

Differentiell exprimierte Gene wurden anhand eines modifizierten F-Tests mit einer FDR (false discovery rate) von 0,01, mittels des LIMMA Programms (Version 2.9) in R identifiziert. Nur Gene mit einem Expressionslevel (log₂) von mindestens 8,0 wurden als exprimiert angesehen und in die Identifizierung differentiell exprimierter Gene einbezogen.

Zum Zwecke der Identifizierung Hybridleistung von Kornertrag bzw. der Korntrockenmasse und/oder MPH von Kornertrag korrelierter Gene wurde zunächst bei allen differentiell exprimierten Genen die mittlere Expression der Inzuchtelternpaare aller 98 Hybride berechnet. Anhand aller 98 mittleren parentalen Expressionsleveln und der vorhandenen MPH Werte für Kornertrag und der absoluten Hybridleistungen von Kornertrag bzw. der Korntrockenmasse aus den Felddaten der Universität Hohenheim (Schrag *et al.* 2006) wurde eine Pearson-Korrelation in R durchgeführt. Alle Gene, die eine Korrelation mit einem p-Wert kleiner 0,01 zwischen den mittleren parentalen Expressionsleveln und einem der drei Hybridmerkmale aus dem Feld zeigten, galten als signifikant korreliert.

2.2.4.5 Quantitative Real-Time (RT)-PCR zur Validierung der 46k-Array Expressionsprofile

Die quantitative RT-PCR wurde zur Validierung der 46k-Mikroarray Expressionslevel der 21 untersuchten Inzuchtlinien eingesetzt und wie von Meyer *et al.* (2007) beschrieben durchgeführt. Hierzu wurde zunächst cDNA aus der isolierten Gesamt-RNA der Inzuchtlinien S028, F047, L024, S058, S044, P033, L043 und F039 synthetisiert. Die cDNA-Synthese erfolgte mittels der RevertAid™ H Minus Reverse Transcriptase der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) und dem T7polydT-Primer (Tab.1) nach Angaben des Herstellers Fermentas.

Für die eigentliche qRT-PCR wurden genspezifische Primer mit Hilfe der Primerselect Software (Lasergene, GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland) entworfen (Kapitel 2.1.4, Tab.1). Die Primereffizienz wurde zunächst mittels einer Template-Konzentrationsreihe (1ng-1fg) in einer quantitativen RT-PCR ermittelt. Bei den Templates handelte es sich hierbei um die PCR-Produkte der jeweiligen Primerpaare. Für die qRT-PCR wurde das iCycler iQ© Detektionssystem der Firma Biorad (München, Deutschland) und der qPCR MasterMix Plus

für SYBR Green I mit Flourescein, 5mM MgCl₂ (Eurogentec, Seraing, Belgien) verwendet und nach dessen Protokoll die qRT-PCR durchgeführt. Nur getestete Primer mit einer Effizienz zwischen 77-100% wurden für die nachfolgende qRT-PCR ausgewählt. Aktin, ein Gen welches konstitutiv in Mais exprimiert ist, diente zur Normalisierung der Expressionsdaten. Hierzu wurden Aktin-spezifische Primer verwendet (Q_actin ex2_fw und Q_actin ex2_rev, Tab.1). Jedes Gen, wie auch die Aktin-Kontrolle, wurden insgesamt dreimal in getrennten Reaktionsansätzen in die qRT-PCR eingesetzt.

Die Auswertung der qRT-PCR Daten beinhaltete die Normalisierung der Expressionslevel gegen Aktin und die anschließende Berechnung der relativen Genexpressionshöhen zwischen den Genen der einzelnen Linien. Dabei erhielt das am schwächsten exprimierte Gen den relativen Expressionswert 1 und das am stärksten exprimierte Gen den Wert 2 und alle anderen gemäß ihrer Expression einen relativen Wert dazwischen. Zum Vergleich der Expressionslevel der qRT-PCR mit den Ergebnissen des 46k-Arrays wurden hier ebenfalls die relativen Expressionslevel der untersuchten Gene bestimmt.

2.2.5 Herstellung des 1k-Mikroarrays

Die eigene Herstellung eines Mikroarrays geschah unter der Verwendung ausgewählter Oligonukleotide des 46k-Mikroarrays (Universität von Arizona, USA). Ausgewählt wurden Gene, deren Expression mit MPH und/oder der Hybridleistung von Kornertrag und/oder der Hybridleistung der Korntrockenmasse signifikant korrelierten ($p < 0,01$). Zudem wurden einige Gene angereicherter biologischer Prozesse der Hybridleistung von Kornertrag und einige Positiv- bzw. Negativkontrollen des 46k-Arrays ausgewählt. Eine genauere Beschreibung über die Auswahl der Oligos befindet sich im Kapitel 3.7. Die ausgewählten Oligos wurden von der Firma Ocimum (Ijsselstein, Niederlande) synthetisiert.

Die geschliffenen Objektträger (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wurden auf folgende Art für den Druck präpariert. Zunächst wurden die Objektträger gewaschen und dann nach einem Protokoll von Bowtell und Sambrook (2002) mit Poly-L-Lysin beschichtet. Nach der Beschichtung und einer zweiwöchigen Lagerung im Vakuum wurden die Oligonukleotide punktuell mittels eines Microgrid II Roboters (BioRobotics, Boston, USA) auf den präparierten Objektträger aufgebracht. Die Immobilisierung der DNA-Gensonden war angelehnt an das Protokoll „Hybridization Protocol for cRNA Targets“ des „Maize Oligonucleotide Array Projects“ (<http://www.maizearray.org>). Zunächst wurden die Objektträger bei

56°C Wasserdampf für ca. 2-3 sec rehydriert und 1 min bei RT getrocknet. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Gensonden unter UV-Licht (60mJ) an die Objektträger gebunden.

Im Anschluss erfolgte die Blockierung der bedruckten Objektträger nach einem abgewandelten Protokoll von Diehl *et al.* (2001). Hierbei wurden die Objektträger für 1 Stunde in Blockierlösung (1g Bernsteinsäureanhydrid, 200ml 1,2-Dichlorethan, 2,5ml 1-Methylimidazol) bei RT inkubiert und im Anschluss zweimal kurz in 1,2-Dichlorethan gewaschen. Hiernach wurden die bedruckten Objektträger dreimal in 95°C heißes Wasser getaucht und für 2 min darin belassen. Zum Ende wurden die Objektträger mit 98%igem Ethanol gewaschen und zum Trocknen unter die Clean-Bench gelegt. Bis zur Hybridisierung wurden Sie im Vakuum gelagert.

2.2.5.1 Anzucht der Maisinzuchtlinien für das 1k-Mikroarray

Die 9 Maisinzuchtlinien (P024, P033, P048, S028, S036, F012, F039, F047, L024) und die aus deren Kreuzungen resultierenden 9 Hybride (P033xF047, P048xF047, P024xF039, S036xL024, S028xL024, S028xF012, S028xF039, P024xF012, F012xF039) aus den Experimenten 1, 2 und 3 (Schräg *et al.* 2006) des Züchtungsprogrammes der Universität Hohenheim (Deutschland) wurden für die Mikroarray-Versuche mit dem 1k-Array in einem Klimaschrank (Percival Scientific Inc., Perry, USA) unter regulierten Bedingungen (16 Std. Tag bei 25°C, 8 Std. Nacht bei 21°C, 70% Luftfeuchtigkeit) für einen Zeitraum von 7 Tagen angezogen. Im Gegensatz zu den Versuchen mit den 21 Inzuchtlinien wurden jedoch diesmal nur jeweils 4 Keimlinge jedes Genotyps angezogen und diese nicht mehr vereint. Jeder Keimling wurde einzeln mit flüssigem Stickstoff gemörsert und die Gesamt-RNA isoliert (Kapitel 2.2.3).

2.2.5.2 Herstellung von RNA-Sonden und die 1k-Array Hybridisierung

Die Synthese der aRNA-Sonden wurde im Vergleich zur vorherigen Sondenherstellung (Kapitel 2.2.4.3) des 46k-Arrays modifiziert, um den Prozess kostengünstiger zu gestalten. Anstelle eines Kits wurde nach der RNA-Isolierung ein Verdau der restlichen genomischen DNA mittels DNaseI (Fermentas, St. Leon-Rot) gefolgt von einer Nukleinsäureaufreinigung durch das NucleoSpin RNA Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) durchgeführt. Als nächstes wurde mit 5 µg Gesamt-RNA eine cDNA-Erstrangsynthese mit der

Superskript II von Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, USA) durchgeführt. Die Zweitstrangsynthese erfolgte nach einem Protokoll von Fermentas mit der DNA-Polymerase I und der RNase H und zum Abschluss mit einer 5 min. Inkubation durch die T4 DNA Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot). Hiernach folgte ein Verdau der restlichen RNA durch die RNase A. Die *in vitro*-Transkription, die den Einbau aminoallyl-markierter UTPs in die RNA-Transkripte bewerkstelligen sollte, erfolgte mittels der T7 RNA Polymerase der Firma Fermentas mit einer doppelt so langen, wie vom Hersteller ursprünglich angegebenen Inkubationszeit. Zum Abschluss wurde die restliche DNA mittels der DNase I von Fermentas degradiert.

Die Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen (Cy3 und Cy5) an die aRNA erfolgte wie schon beim 46k-Array nach dem Protokoll „cRNA Target Production Using RNA Amplification“ des „Maize Oligonucleotide Array Projects“ (www.maizearray.org) und die Hybridisierung folgte dem Protokoll „Hybridization with cRNA Targets“. Die Hybridisierungen zwischen den Inzuchteltern und ihren jeweiligen Hybriden folgten dem Schema aus Abbildung 23 (siehe Kapitel 3.7). Erneut wurden hierbei die verwendeten Cy-Farbstoffe, Cy3 und Cy5 alternierend zwischen den Hybridisierungen und zwischen den 4 biologischen Replikaten eingesetzt.

Die bioinformatische Auswertung erfolgte, wie schon zuvor beim 46k-Array, durch das Programm GenePix Pro 4.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Die Normalisierung der Mikroarray-Daten wurde von Dr. Junjie Fu an der Universität Hohenheim in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. E. Melchinger in R anhand des LIMMA Programms (Version 2.9) von Bioconductor (Gentleman *et al.* 2004) durchgeführt und beinhaltete eine Normalisierung innerhalb der einzelnen Arrays (within-array-normalization) und eine Normalisierung zwischen den unterschiedlichen Arrays (between-array-normalization).

2.2.6 Gene Ontology (GO) Anreicherungsanalyse

Zur Untersuchung der molekularen Hintergründe von Heterosis- bzw. Hybridleistungskorrelierter Gene wurden Analysen durchgeführt, die überrepräsentierte GOs innerhalb dieser Gengruppen identifizieren sollten. GOs stellen ein dynamisches, kontrolliertes, funktionelles und hierarchisches Annotationssystem dar, welches in drei Hauptkategorien unterteilt ist. Die drei Hauptkategorien sind der biologische Prozess (BP), die molekulare Funktion (MF), und die zelluläre Komponente (CC) (Gene Ontology Consortium 2000).

Die GO Annotation der untersuchten Gene stammte von der Universität von Arizona (<http://www.maizearray.org>) bzw. aus der eigenen Neuannotation (Kapitel 2.2.4.1) der Gene des 46k-Arrays durch das Programm Blast2GO (Götz *et al.* 2008). Die GO Analyse wurde in R (<http://www.r-project.org>) mittels des Programms topGO (Version 1.10.1) durchgeführt (Alexa *et al.* 2006). Die Analyse basierte auf dem „Fisher`s exact test“. Als Referenzgene, dem sog. Universum, dienten alle GO-annotierten Gene des 46k-Arrays. Zur Vermeidung doppelt vorhandener Referenzgene wurden solche aus der Analyse ausgeschlossen, deren TC-Annotation („maizearray.org_Version4“) bereits mehr als einmal in der Genliste vorhanden war.

2.2.7 In silico mapping Hybridleistung bzw. Heterosis von Kornertrag korrelierter Gene

Zur *in silico* Lokalisierung ausgewählter Gene auf dem Mais-Genom der Linie B73 wurden die jeweiligen 50-70 Nukleotide langen Oligonukleotidsequenzen des 46k-Arrays gegen die „B73 RefGen_v1-Datenbank“ (<http://www.maizegdb.org>) geblastet (blastn, E-Wert < 0,0001). Anschließend wurden die Blast-Ergebnisse nach bestimmten Kriterien gefiltert. Von den möglichen zahlreichen Blast-Treffern eines Oligonukleotids wurde nur jeweils einer, und zwar der mit dem niedrigsten E-Wert, in den weiteren Analysen verwendet. Im Falle eines Blast-Ergebnisses mit zwei oder mehr Treffern mit jeweils identischen E-Werten, wurden alle Blast-Ergebnisse dieses Oligos verworfen. Diese strikten Kriterien wurden aus Gründen der exakten Lokalisierung im Genom und um stark repetitive Sequenzen auszuschließen, angewandt.

2.2.7.1 Untersuchung der Verteilung in silico gemappter Gene im B73-Maisgenom

Zunächst sollte die Verteilung der Hybridleistung bzw. ausschließlich MPH korrelierten Gene von Kornertrag im Genom der Linie B73 *in silico* bestimmt werden. Desweiteren sollte die Fragestellung geklärt werden, ob deren Lokalisierung im Genom einer rein zufälligen oder nicht-zufälligen Verteilung entsprach. Hierzu musste als Erstes, die zu erwartende Verteilung für einen rein zufällig ausgewählten Gensatz bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden 20.000 zufällig ausgewählte Gene des 46k-Arrays wie bereits beschrieben geblastet und im Anschluss gefiltert (Kapitel 2.2.7). Das Genom wurde dann in 150 bzw. 200 gleich große Fragmente unterteilt. Aus dem Pool der 20.000 Kontrollgene wurden dann zufällige Gensätze

in der Größe der zu untersuchenden Hybridmerkmal-korrelierten Gene ausgewählt und die Anzahl der kolokalisierten Gene für jedes Genomfragment bestimmt. Dieser Schritt wurde mit Hilfe eines „PHP-Skripts“ tausendmal, jeweils mit einem zufällig wechselnden Gensatz aus dem Pool der Kontrollgene, wiederholt und dann die durchschnittliche Anzahl der Gene pro Genomfragment ermittelt. Mittels eines Chi-Quadrat-Tests konnte nun berechnet werden, ob die Genomverteilung der Hybridmerkmal (HL Kornertrag, MPH Kornertrag) korrelierten Gene sich signifikant von der rein zufälligen Genverteilung der Kontrollgene unterschied.

2.2.7.2 *In silico* QTL mapping

Ein weiteres Ziel des *in silico* mapping war die Lokalisierung bereits bekannter QTLs auf dem Maisgenom der Linie B73 (B73 RefGen_v1), die mit den Fragmenten kolokalisierten, die eine statistisch erhöhte Anzahl Hybridmerkmal (Hybridleistung bzw. Heterosis von Kornertrag) korrelierter Gene aufwiesen (Kapitel 2.2.7.1). Zunächst wurde hierfür in der Maizegdb-Datenbank (<http://www.maizegdb.org>) nach den QTLs gesucht und die Gen-Marker identifiziert, die die einzelnen QTLs direkt flankierten. Anhand der genetischen Karte „IBM2 2008 Neighbors“ und der physikalischen Karte „B73 RefGen_v1“ wurde nun für jeden flankierenden Marker der physikalische Genom-Bereich bestimmt, zwischen dem sich der Marker befand. Der identifizierte QTL-Bereich definierte sich über die inneren, dem QTL zugewandten, Marker-Grenzen (Abb.8). Eine Liste der *in silico* lokalisierten QTLs befindet sich in Kapitel 3.6 (Tab.7).

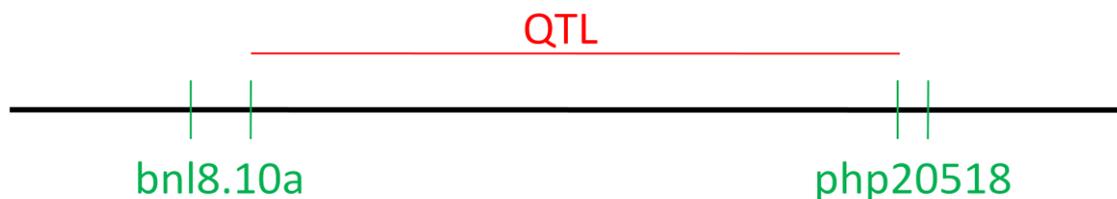


Abb.8: Schematische Darstellung eines QTLs von Kornertrag mit flankierenden Markern.

Gezeigt ist das QTL von Kornertrag *qgyld1* (Beavis 1994) mit den flankierenden Markern (*bnl8.10a* und *php20518*) auf Chromosom 1. Die Grenzen aller *in silico* gemappten QTLs entsprachen den inneren Grenzen der flankierenden Marker.

2.2.8 Untersuchung der putativen Rolle des Gene Silencings bei der Ausbildung von Heterosis

Transgene P1/HC-Pro Maispflanzen wurden insgesamt achtmal selektiv im Gewächshaus mit der Inzuchtlinie A188 zurückgekreuzt, um einen nahezu vollständig homozygoten, transgenen Inzuchtlinien-Genotyp zu erzeugen. In jeder Generation wurden die Nachkommen, zum Erhalt der Transgene, mit Basta (300 mg/L) selektiert und nur transgene Pflanzen in der nächsten Phase der Introgression verwendet.

Ziel des Versuches war es den Einfluss des Gene Silencing Suppressors P1/HC-Pro und damit verbunden den Einfluss kurzer RNAs auf den Heterosis-Effekt zu untersuchen. Hierzu wurden die transgenen P1/HC-Pro Pflanzen reziprok mit H99 Inzuchtlinien und mit A188 Inzuchtlinien gekreuzt und nach einem Tag das Nucellus Gewebe in eine *in vitro*-Kultur zur Induktion des Transgens überführt. Die etablierte Gewebekultur erlaubte eine Kultivierung des intakten Embryosacks einen Tag nach Bestäubung unter kontrollierten Bedingungen bis zur Entwicklung eines intakten Keimlings (Campenot *et al.* 1992).

2.2.8.1 Anzucht der Maispflanzen im Gewächshaus

Die transgenen P1/HC-Pro Maispflanzen, sowie die Inzuchtlinien H99 und A188 wurden im Gewächshaus in Töpfen unter Standardbedingungen angezogen. Die Bewässerung erfolgte automatisch und die Lichtstärke wurde durch eine Lichtanlage gesteuert, die sich bei einer maximalen Lichtsumme von 600 kLuxh/Tag abschaltete. Die Anlage war auf einen Tag/Nacht-Wechsel von 16 Stunden Helligkeit und 8 Stunden Dunkelheit eingestellt. Die tatsächliche Lichtsumme betrug im Winter ca. 230-250 kluxh/Tag und im Sommer ca. 400-600 kluxh/Tag. Die Kreuzungen der Maispflanzen verliefen unter streng kontrollierten Bedingungen. Zu diesem Zweck wurden die sich entwickelnden Kolben so früh wie möglich vor dem Austreten der Nebenfäden mit einer Papiertüte abgedeckt, um eine ungewollte Fremdbestäubung zu vermeiden. Die gezielten Kreuzungen fanden morgens zwischen 9 und 11 Uhr statt.

2.2.8.2 *In vitro* Kultur von Nucellus Gewebe einen Tag nach der Bestäubung

Nucellus Gewebe aus den reziproken Kreuzungen, zwischen den transgenen P1/HC-Pro-Pflanzen und A188 bzw. H99, wurde nach einem Protokoll von Campenot *et al.* (1992) einen Tag nach Bestäubung aus dem Korn isoliert und auf Platten mit einem modifizierten Murashige-Skoog (MS) Medium aufgelegt. Dexamethason im modifizierten MS-Medium in einer Konzentration von 20 μM diente zur Induktion der Transgenexpression. Die Hälfte der Platten enthielt kein Dexamethason, um Effekte bedingt durch das Induktionsmedium ausschließen zu können. 2 Tage nach dem Auskeimen der Maisembyronen wurden diese von der Platte in ein Weckglas mit Standard-MS-Medium (mit bzw. ohne Dexamethason) (Murashige und Skoog 1962) überführt. Die Messung des Pflanzenwachstums erfolgte das erste Mal 6 Tage nach Überführung in das Weckglas und dann insgesamt achtmal alle 2 Tage.

Zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit wurde eine lineare Regression durchgeführt und durch die Messpunkte eine Gerade gelegt und das Bestimmtheitsmaß berechnet. Die Steigung der linearen Regression repräsentierte die Wachstumsgeschwindigkeit der Maispflanzen. Nur Wachstumsgeschwindigkeiten mit einem Bestimmtheitsmaß der linearen Regression von über 0,97 wurden in die Analyse mit einbezogen.

Anhand einer Gus-Färbung (Kapitel 2.2.8.3) wurde jede Pflanze, sowohl die induzierten als auch die nicht-induzierten, nach vorheriger Induktion des Blattmaterials auf die Expression des Transgens hin untersucht. Dies geschah zur Unterscheidung der transgenen Nachkommen von den nicht-transgenen Nachkommen, da aufgrund der Hemizygotie des P1/HC-Pro-Konstruktes nur 50% der Nachkommen ebenfalls transgen waren.

Die Daten der reziproken Pflanzen eines jeden Genotyps wurden im weiteren Verlauf der Auswertung gemeinsam betrachtet. Für jeden Genotyp wurde die BPH (best parent heterosis) berechnet, also der Zuwachs der Hybride gegenüber den homozygoten Inzuchtlinien-Kreuzungen A188xA188.

Ein statistische Tests (T-Test, ANOVA) zwischen den Heterosis-Daten der transgenen und der nicht-transgenen, bzw. der induzierten und nicht-induzierten Genotypen sollte zeigen, ob ein signifikanter Unterschied zwischen Pflanzen, die den Gene Silencing Suppressor exprimieren und denen ohne Suppressor, bezogen auf Heterosis bestand.

2.2.8.3 β -Glucuronidase (Gus)-Färbung

Zur Überprüfung der Expression der Transgene in den P1/HC-Pro -Pflanzen wurde Pflanzenmaterial, wie z.B. Blattgewebe oder Nucellus-Gewebe, in einer kleinen Petrischale mit X-Gluc-Lösung zur Gänze bedeckt. Um eine Färbung tieferliegender Zellschichten zu gewährleisten wurde beim Nucellus-Gewebe ein Vakuum für die Dauer einer Minute angelegt und dieser Schritt fünfmal wiederholt. Es folgte eine Inkubation bei 37°C über Nacht. Beim Blattgewebe wurde die X-Gluc-Lösung abgenommen und das Gewebe mit 70% Ethanol über Nacht inkubiert, um das Chlorophyll auszuwaschen. Bei einer erfolgreichen Gus-Expression konnte eine deutliche Blaufärbung des untersuchten Gewebes beobachtet werden.

Bei biologischem Material, welches nicht auf einem Induktionsmedium mit Dexamthason gewachsen ist, erfolgte zunächst eine Inkubation in einer wässrigen 20 μ M Dexamethason-Lösung über Nacht bei 37°C. Erst im Anschluss daran erfolgte die Inkubation in X-Gluc-Lösung.

X-Gluc-Lösung (200ml)

100 mg X-Gluc (gelöst in 2ml Dimethylformamid)

10 mM EDTA

0,1 % Triton

100 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 7)

0,5 mM Kalium-Ferrocyanid

3 Ergebnisse

3.1 Das korrelative Verhältnis der drei Hybridmerkmale aus den Felddaten der 21 europäischen Elite-Maisinzuchtlinien

Die Felddaten der Universität Hohenheim umfassten 21 europäische Elite-Maisinzuchtlinien und stammten aus einem faktoriellen Kreuzungsexperiment (14 x 7) mit der Bezeichnung Exp1, bestehend aus zwei verschiedenen heterotischen Gruppen, den Zahnformen (Dent) und den Hartweizenformen (Flint) sowie deren aus den interpool-Kreuzungen resultierenden 98 Hybriden (Schrag *et al.* 2006). Drei unterschiedliche Hybridmerkmale wurden gemessen, die Hybridleistung des Kornertrages und die der Korntrockenmasse in Prozent zum Erntezeitpunkt sowie die mittlere parentale Heterosis (MPH) des Kornertrages. Der Begriff Hybridleistung umschreibt dabei die absoluten Werte des Kornertrages bzw. der Korntrockenmasse der Hybride, ohne die Werte in Relation zu denen der Inzuchteltern zu stellen. Die Werte der MPH des Kornertrages hingegen stehen in Relation zu den Werten der Inzuchteltern und beschreiben den Zuwachs des Hybriden gegenüber dem mittleren Wert seiner beiden Inzuchteltern.

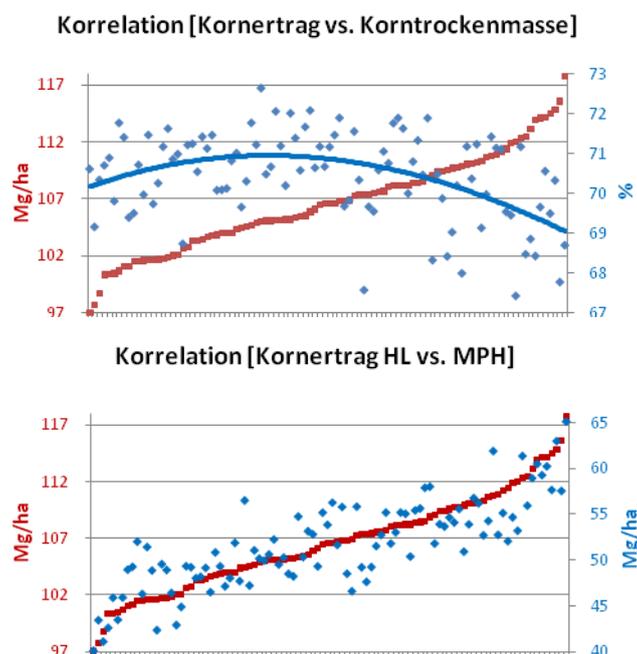


Abb.9: Korrelatives Verhältnis der Hybridmerkmale.

Zu sehen sind die Felddaten der Hybridleistung (HL) vom Kornertrag und die der Korntrockenmasse und die Werte der mittleren parentalen Heterosis (MPH) vom Kornertrag der insgesamt 98 Hybride aus Experiment 1 der Universität Hohenheim (Schrag *et al.* 2006). Im oberen Diagramm sind die Messwerte der HL vom Kornertrag (rot) gegen die der HL der Korntrockenmasse (blau) gegeneinander aufgetragen, um deren negative Korrelation ($r = -0,33$; $p < 0,01$) anschaulich darzustellen. Bei der blauen durchgezogenen Linie handelt es sich um eine polynomische Trendlinie 3.Grades der Korntrockenmassenwerte. Im unteren Diagramm sind die Felddaten der HL (rot) und die der MPH (blau) von Kornertrag zur Veranschaulichung der positiven Korrelation ($r = 0,84$; $p < 0,01$) gegeneinander aufgetragen.

Korrelationsanalysen der drei gemessenen Hybridmerkmale offenbarten, dass diese in einem gewissen korrelativen Verhältnis zueinander standen. So existierte eine schwach, negative Korrelation ($r = -0,33$, $p < 0,01$) zwischen der Hybridleistung vom Kornertrag und der Hybridleistung der Korntrockenmasse. Ebenfalls konnte eine sehr viel stärkere, jedoch positive Korrelation ($r = 0,84$, $p < 0,01$) zwischen der Hybridleistung und MPH vom Kornertrag beobachtet werden (Abb.9).

3.2 Genexpressionsanalysen der 21 Inzuchtlinien

Die genomweiten Expressionsprofile der 7 Tage alten Keimlinge der 21 Inzuchtlinien wurden mittels eines 46k-Arrays (<http://www.maizearray.org>) nach einem bestimmten Hybridisierungsschema untereinander verglichen. Das Ziel war eine zufriedenstellende Vergleichbarkeit zwischen allen Flint und Dent Linien, mit einer möglichst geringen Anzahl an Hybridisierungen zu gewährleisten. Das Ergebnis war das in Abbildung 10 dargestellte „Interwoven loop design“, welches nach dem Vorbild von Kerr und Churchill (2001) für den Versuchsaufbau entwickelt wurde.

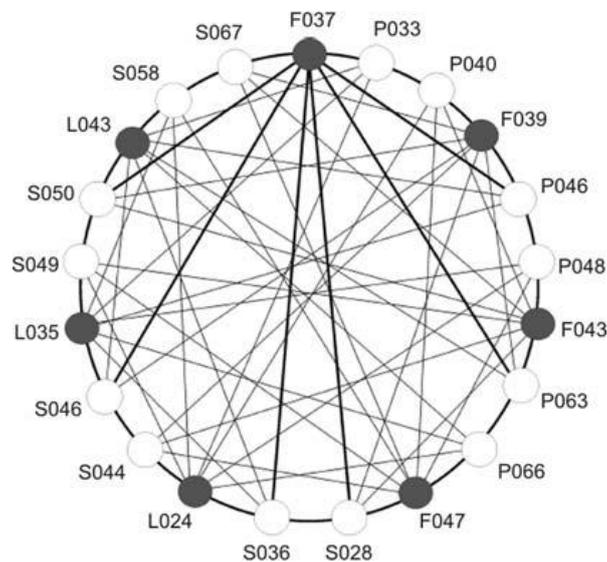


Abb.10: Schematische Darstellung des Hybridisierungsschemas des 46k-Arrays.

Die Expressionen der 21 Inzuchtlinien aus Experiment 1 der Universität Hohenheim wurden nach diesem Hybridisierungsschema in Form eines „interwoven loop designs“ in insgesamt 63 Hybridisierungen miteinander verglichen. Die dunklen Kreise stellen die Inzuchtlinien der heterotischen Gruppe der Hartmaisformen (Flint) und die weißen Kreise die der Zahnmaisformen (Dent) dar. Jede Verbindungslinie, sowohl die des Kreises, als auch die im Inneren des Kreises, stehen jeweils für eine erfolgte Mikroarray-Hybridisierung. (Thiemann *et al.* 2010)

Insgesamt wurden 63 Hybridisierungen durchgeführt, wobei die maximale Distanz zwischen jeder Hartmaislinie und Zahnmaislinie entweder eine oder zwei Hybridisierungen betrug.

Zusätzlich zu den direkten Hybridisierungen existierten weitere indirekte Hybridisierungen. Die dadurch resultierende durchschnittliche Varianz aller möglichen Vergleiche betrug 0,5. Für die Vergleiche zwischen Linien gleicher heterotischer Gruppen betrug die durchschnittliche Varianz 0,64 und für Vergleiche zwischen Linien unterschiedlicher heterotischer Gruppen, welche aufgrund der untersuchten Hybride von besonderem Interesse in dieser Arbeit waren, betrug die durchschnittliche Varianz 0,45.

3.2.1 Validierung der 46k-Array Expressionsprofile

Zur Validierung der 46k-Mikroarray Expressionsprofile wurden qRT-PCR Analysen durchgeführt. Hierfür wurden 2 Gene des 46k-Arrays (MZ00042747, MZ00000855), mit einer besonders stark ausgeprägten differentiellen Expression zwischen den einzelnen Inzuchtlinien, ausgewählt. Die Analyse wurde anhand dieser 2 Gene in 8 verschiedenen Inzuchtlinien (S028, F047, L024, S058, S044, P033, L043, F039) in zwei getrennten qRT-PCRs durchgeführt. Anschließend wurden die Tendenzen der relativen Expressionen jedes einzelnen Gens zwischen den 8 Linien mit den Tendenzen der relativen Expressionen der Mikroarray-Daten verglichen (Abb.11). In der ersten qRT-PCR wurden die beiden Gene in den drei Linien S028, F047 und L024 untersucht und die Expressionstendenzen stimmten mit denen der Mikroarray Analyse überein. Bei beiden Analysen war MZ00042747 in F047 das am stärksten exprimierte (relative Expression = 2), und MZ00000855 in S028 das am schwächsten exprimierte Gen (relative Expression = 1). Die relativen Genexpressionsniveaus die dazwischen lagen stimmten ebenfalls mit den Daten des Mikroarrays überein. Die Ergebnisse der zweiten qRT-PCR mit den Linien S058, S044, P033, L043 und F039 stimmten bis auf eine einzige Ausnahme ebenfalls mit den Ergebnissen der Mikroarrays überein. Ausschließlich bei MZ00042747 in den Linien P033 und S044 war ein Unterschied in der Tendenz der relativen Expressionen zu beobachten. Gemäß der Mikroarray Ergebnisse war das Gen in der Linie P033 stärker als in der Linie S044 exprimiert, wohingegen es bei der qRT-PCR stärker in der Linie S044 exprimiert war. Jedoch war die Differenz der relativen Expressionen dieses Gens zwischen diesen beiden Linien im Fall der Mikroarray Ergebnisse nur sehr gering und betrug lediglich 0,07. Zusammengefasst stimmten die Expressionen des 46k-Arrays somit größtenteils mit den relativen Expressionen der qRT-PCRs überein.

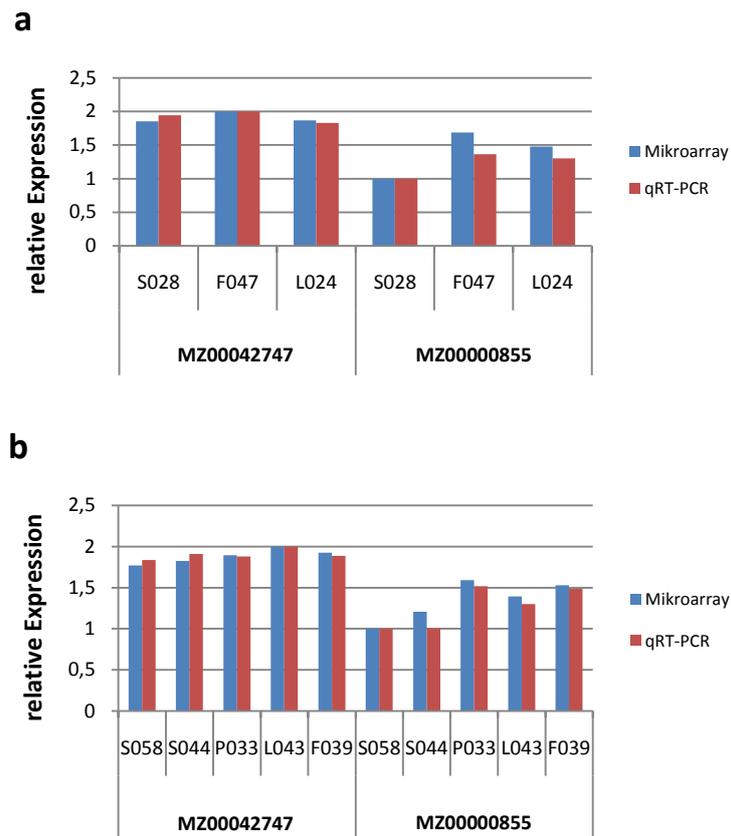


Abb.11: Validierung der Expressionsdaten des 46k-Mikroarrays mittels qRT-PCR.

Die Abbildungen (a) und (b) zeigen die relativen Expressionen der Mikroarrays (46k) und qRT-PCRs für 2 Gene (MZ00042747, MZ00000855) in 7 Inzuchtlinien. Insgesamt wurden zwei getrennte qRT-PCRs (a) und (b) durchgeführt und deren relative Expressionen (rot), denen der Mikroarrays (blau) gegenüber gestellt. (Thiemann *et al.* 2010)

3.2.2 Identifizierung differentiell exprimierter Gene

Die Hybridisierungen der 21 Inzuchtlinien mit dem 46k-Mikroarray führten zur Identifizierung einer Liste von differentiell exprimierten Genen. Von den ursprünglich 46.128 Mikroarray-Oligos blieben nach Abzug aller Kontrollen 43.381 genbezogene Oligonukleotide übrig. Von diesen genbezogenen Oligos zeigten 24.498 (56,5%) in mindestens einer Inzuchtlinie ein verlässliches Expressionssignal (\log_2) von $> 8,0$. Basierend auf einem F-Test ($p < 0,01$) waren insgesamt 12.288 (28,3%) Gene differentiell zwischen den Inzuchtlinien exprimiert.

3.2.3 Identifikation Hybridmerkmal korrelierter Gene

Die differentiell exprimierten Gene wurden in einer anschließenden Korrelationsanalyse verwendet, um Gene zu identifizieren, deren mittlere parentale Expressionslevel mit einem

der Hybridmerkmale, wie der Hybridleistung von Kornertrag, der Hybridleistung der Korntrockenmasse oder der MPH von Kornertrag korrelierten. Jede Korrelationsanalyse wurde mit den Felddaten der 98 Hybride und den mittleren Genexpressionsniveaus der 98 Inzuchteltern-Paare für jedes differentiell exprimierte Gen einzeln durchgeführt. Dabei wurden bei allen drei Hybridmerkmalen sowohl positiv korrelierte, als auch negativ korrelierte Gene identifiziert.

Die Pearson-Korrelation zwischen der mittleren parental Genexpression und der Hybridleistung des Korntrockenmasse zeigte eine signifikante ($p < 0,01$), lineare Korrelation bei 2317 differentiell exprimierten Genen. Von diesen 2317 Genen waren 969 signifikant negativ korreliert mit einer Korrelationsstärke $[r]$ von $-0,3103$ bis $-0,763$, und 1348 Gene positiv korreliert mit einer Stärke von $0,3102$ bis $0,648$. Von den 1694 Genen die signifikant mit der Hybridleistung von Kornertrag korrelierten, waren 758 Gene negativ korreliert ($-0,6319 < r < -0,3191$) und 936 positiv korreliert ($0,3189 < r < 0,6478$). Die mittleren parental Expressionslevel von 545 Genen waren signifikant mit der Hybridleistung beider Hybridmerkmale Kornertrag und Korntrockenmasse korreliert. Diese Gene aus der Schnittmenge zeigten bei den beiden Hybridmerkmalen stets eine gegensätzliche Korrelation. Das bedeutet, ein negativ Kornertrag korreliertes Gen zeigte eine positive Korrelation bei der Korntrockenmasse und andersherum.

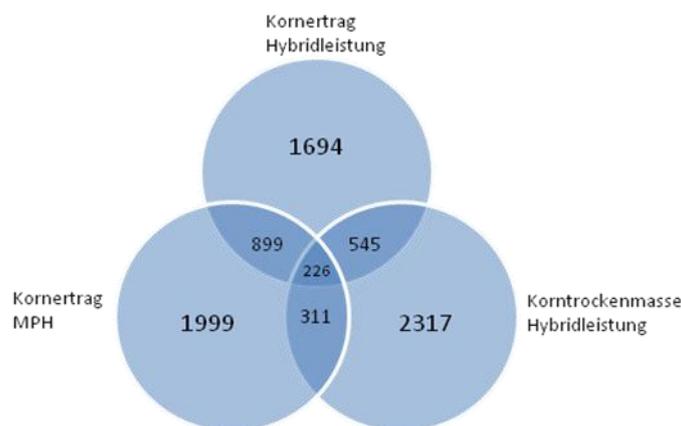


Abb.12: Venn-Diagramm der parental differentiell exprimierten, Hybridmerkmal korrelierten Gene.

Gezeigt ist ein Venn-Diagramm mit der Anzahl der parental differentiell exprimierten Gene, deren mittlere parentale Genexpression mit der Hybridleistung vom Kornertrag und/oder Korntrockenmasse und/oder der mittleren parental Heterosis (MPH) vom Kornertrag signifikant korrelierten ($p < 0,01$). Die Gene wurden durch Expressionsanalysen von 21 Inzuchtlinien, die aus einem faktoriellen Kreuzungsexperiment (Exp1) der Universität Hohenheim stammten, identifiziert.

1999 Gene zeigten eine signifikante, lineare Korrelation mit MPH von Kornertrag. Davon waren 887 Gene negativ korreliert mit einer Korrelationsstärke r von $-0,3143$ bis $-0,6733$ und 1112 Gene positiv korreliert ($0,3143 < r < 0,6794$). 899 dieser MPH korrelierten Gene zeigten

gleichzeitig eine Korrelation mit der Hybridleistung vom Kornertrag und 311 gleichzeitig mit der Hybridleistung der Korntrockenmasse. Die Richtung der Korrelation war bei der Hybridleistung und der MPH von Kornertrag stets die gleiche und bei MPH von Kornertrag und der Hybridleistung vom Korntrockengewicht nicht konsistent. 226 Gene waren mit allen drei Merkmalen korreliert. Die Anzahl der Hybridmerkmal korrelierten Gene ist in einem Venn-Diagramm in Abbildung 12 anschaulich dargestellt.

Die Abbildung 13 veranschaulicht die Korrelation zwischen den mittleren parentalen Expressionen und der Hybridmerkmale, der drei jeweils am stärksten korrelierten Gene.

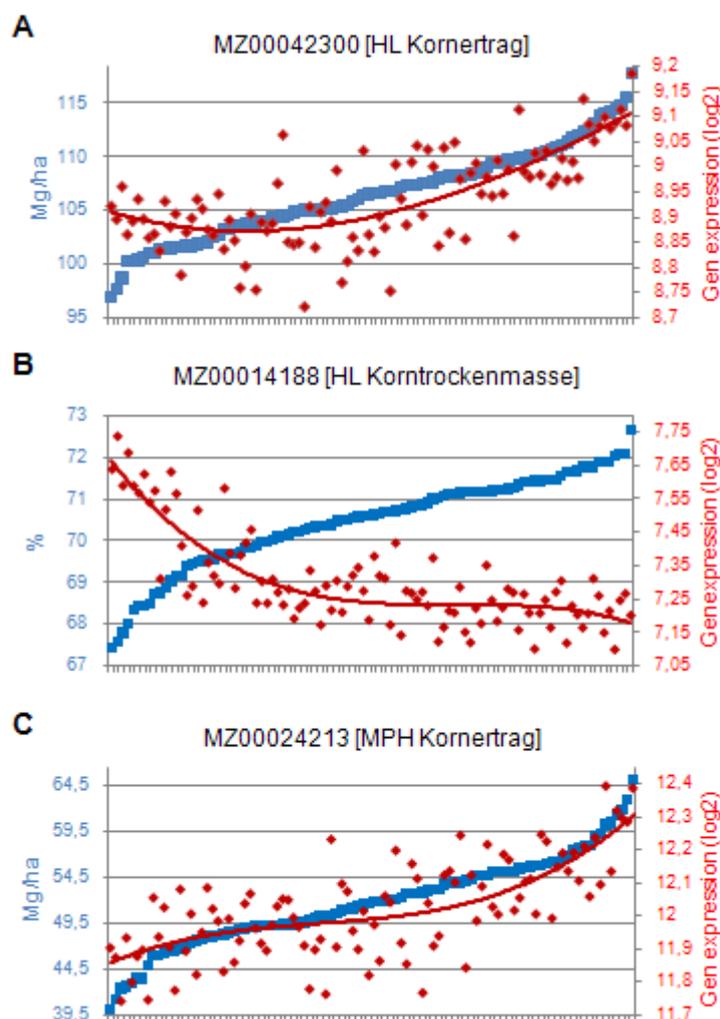


Abb.13: Korrelationen der jeweils am stärksten Hybridmerkmal korrelierten Gene.

Gezeigt sind die mittleren parentalen Genexpressionen (\log_2) (rot) der 98 erfolgten Inzuchtlinienvergleiche, der Gene MZ00042300, MZ00024213, MZ00014188 und die Felddaten der Hybridmerkmale Kornertrag [Mg/ha], Korntrockenmasse in % und MPH von Kornertrag [Mg/ha] zur Veranschaulichung der jeweiligen korrelativen Verhältnisse. MZ00042300 korreliert mit der Hybridleistung (HL) von Kornertrag (blau), MZ00014188 mit der HL der Korntrockenmasse (blau) und MZ00024213 mit der MPH von Kornertrag (blau). Bei den roten durchgezogenen Linien handelt es sich um polynomische Trendlinien 3. Grades der jeweiligen mittleren parentalen Genexpressionen (\log_2).

Das Gen, welches am stärksten mit der Hybridleistung vom Kornertrag korreliert war ($r = 0,65$; $p = 6,9222e^{-09}$), kodierte für ein Protein mit der Bezeichnung Hexokinase 8 und besaß die Oligonukleotid-Identifikationsnummer MZ00042300. Das Gen, dessen parentale Expressionslevel am stärksten mit der Hybridleistung der Korntrockenmasse korrelierten ($r = -0,76$; $p = 8,40e^{-16}$), war MZ00014188, welches für die Catalase 3 (Cat3) kodierte. Im Fall der MPH des Kornertrags, kodierte das am stärksten korrelierte Gen ($r = 0,68$; $p = 7,00e^{-11}$) für eine Alpha-Untereinheit der Pyrophosphat:Fruktose-6-Phosphat-1-Phosphotransferase (MZ00024213). Die Identifikation der Gene erfolgte durch eine Blastn-Analyse in der NCBI-Datenbank anhand der jeweiligen Original-Sequenzen des „Maize Oligonucleotide Array Projects“ der Universität Arizona (USA). Bei den Original-Sequenzen handelt es sich um die Sequenzen, von denen sich die jeweiligen Oligos des 46k-Arrays ursprünglich ableiteten (<http://www.maizearray.org>).

3.3 Vergleichende Charakterisierung: Kornertrag vs. Korntrockenmasse

Zur Identifizierung bedeutender Hybridmerkmal assoziierter biologischer Stoffwechselwege bzw. biologischer Prozesse wurde eine Anreicherungsanalyse mittels der GO (Gene Ontology)-Annotation, der Hybridmerkmal korrelierten Gene durchgeführt. Eine Anreicherungsanalyse identifiziert GOs, deren zugehörige Gene häufiger innerhalb einer Gruppe von Genen vorkommen, als statistisch zu erwarten wäre. Die Analyse wurde in R mit dem Programm topGO (Alexa *et al.* 2006) und dem weight-Algorithmus durchgeführt und die GO-Annotation stammte vom „Maize Array Oligonucleotide Project“ der Universität von Arizona (<http://www.maizearray.org>).

Sowohl die 1694 Gene, die signifikant ($p < 0,01$) mit der Hybridleistung vom Kornertrag korrelierten, als auch die 2317 mit der Hybridleistung der Korntrockenmasse korrelierten Gene zeigten GOs aus allen drei Kategorien, dem biologischen Prozess (BP), der molekularen Funktion (MF) und der zellulären Komponente (CC), welche signifikant ($p < 0,03$) angereichert waren (Abb.14 und 15). In allen drei Kategorien waren unterschiedliche GOs zwischen den beiden Hybridmerkmal korrelierten Gengruppen angereichert, mit Ausnahme von biologischen Prozessen, die die Regulation der Glykolyse (GO:0006110) und die Modifikationen der Zellwand (GO:0009831, GO:0009827) betrafen.

Die angereicherten GOs der Hybridleistung vom Kornertrag korrelierten Gene umfassten metabolische, regulatorische als auch Stress-Stimulus aktivierte Prozesse (Abb.14). Zu den

metabolischen Prozessen gehörten solche aus dem Stickstoff- (Cyanid Metabolismus (GO:0019499)) und dem Kohlenwasserstoff-Metabolismus (Trehalose Metabolismus (GO:0005991)), wie auch aus der Biosynthese von Aminosäuren (Cystein-Biosynthese aus Serin (GO:0006535)) und Aminosäurederivaten (Chalkon-Biosynthese (GO:0009715)), dem Abbau von Lipiden (Phospholipid Katabolismus (GO:0009395)), der Regulation der Glykolyse (GO:0006110) und der homeostatischen Regulation von Membranpotentialen (GO:0042391). Zu den angereicherten Prozessen die auf einen Stress-Stimulus reagieren, zählten die Reaktion auf Trockenstress (GO:0009269) und nitrosativen Stress (Entgiftung stickstoffhaltiger Verbindungen (GO:0051410)). Weitere Prozesse umfassten die wachstumsbezogene Zellwandmodifikation (GO:0009831) und die Faltung von Proteinen (GO:0006457). Der am signifikantesten ($p = 0,0049$) angereicherte Prozess war die Initiation der DNA Replikation (GO:0006270).

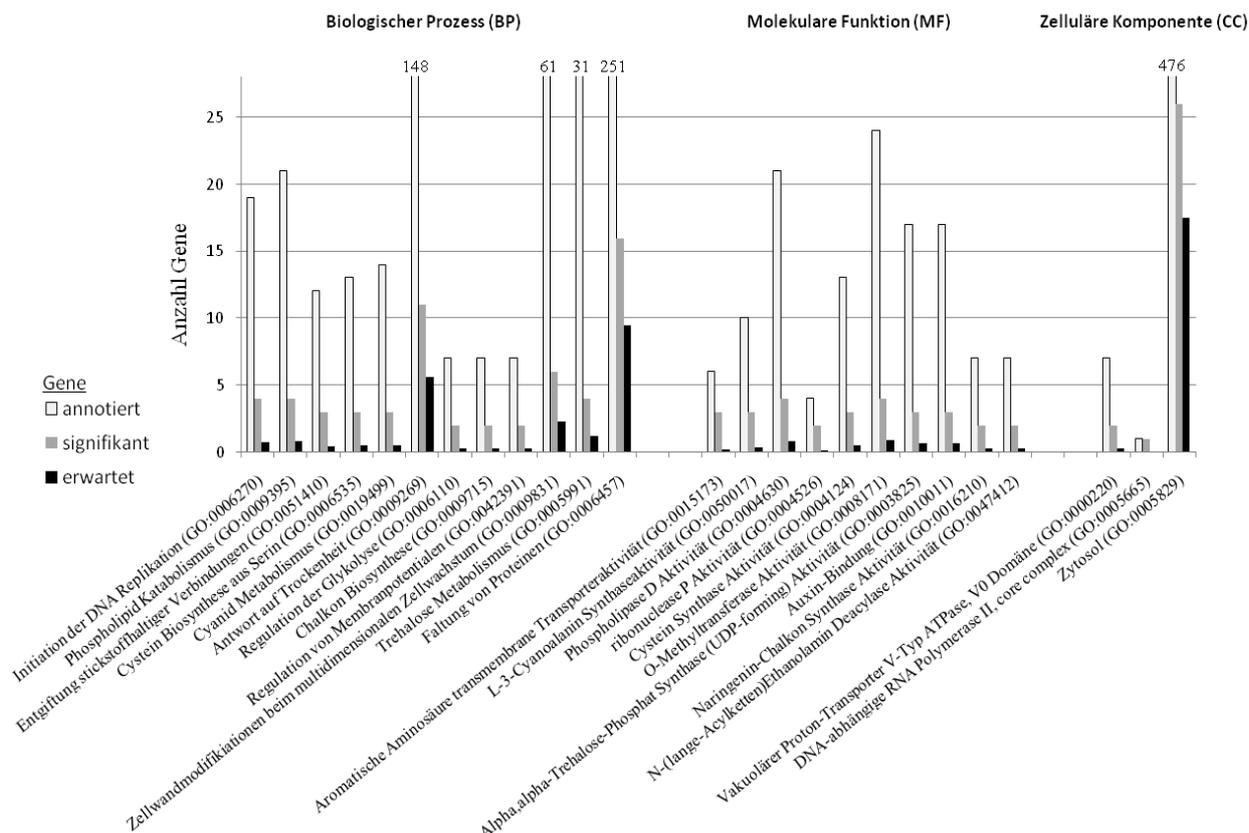


Abb.14: Angereicherte GOs der Hybridleistung von Kornertrag korrelierten Gene.

Die Abbildung zeigt die angereicherten bzw. überrepräsentierten GOs der Gene, deren Genexpression mit der Hybridleistung von Kornertrag signifikant ($p < 0,01$) korrelierten. Die angereicherten GOs werden in drei Kategorien unterteilt, der biologische Prozess (BP), die molekulare Funktion (MF) und die zelluläre Komponente (CC). Ausschließlich GOs die signifikant ($p < 0,03$) angereichert waren sind aufgeführt und innerhalb der drei Kategorien, gemäß ihrer Signifikanz, mit dem signifikantesten auf der linken Seite, sortiert. Jeder GO-Begriff wird repräsentiert durch die Anzahl aller GO-verwandten annotierten Gene aus der Analyse (annotiert), der Anzahl der GO-verwandten Gene, die signifikant mit Kornertrag korrelierten (signifikant) und die statistisch zu erwartende Anzahl signifikant korrelierter Gene im Falle einer hypothetischen nicht vorhandenen Anreicherung (erwartet). (Thiemann *et al.* 2010)

Im Vergleich zu der Hybridleistung von Kornertag ergab die Analyse der Gene, die mit der Hybridleistung der Korntrockenmasse korrelierten, eine größere Anzahl angereicherter GOs (Abb.15). Auch hier waren wieder, wie auch zuvor bei den Hybridleistung von Kornertag korrelierten Genen, Prozesse aus dem Metabolismus, der Regulation und der Antwort auf Stress-Stimuli vertreten. Zu den angereicherten Prozessen zählten die Biosynthese von Aminosäurederivaten (Lignin Biosynthese (GO:0009809)), S-Adenosylmethionin (GO:0006556) und Spermidin (GO:0008295), der Katabolismus von Aminosäuren (Tryptophan Katabolismus (GO:0006569)) und die Biosyntheseregulation von Flavonoiden (GO:0009962). Prozesse, welche in der Antwort auf Stress-Stimuli bzw. äußere Einflüsse involviert waren, umfassten solche in Bezug auf Temperatur (GO:0009266), Licht (Vermeidung von Schatten (GO:0009641), Antwort auf Rotlicht (GO:0010114), Antwort auf hohe Lichtintensitäten (GO:0010201)), Nährstoffmengen (zelluläre Antwort auf Glukosemangel (GO:0042149)) und der umweltbedingten Einstellung der circadianen Rhythmik (GO:0009649). Metabolische Prozesse umfassten die Biosynthese von aromatischen Verbindungen (Cumarin Biosynthese (GO:0009805), Camalexin Biosynthese (GO:0010120)) und die Sulfat Assimilation (GO:0000103). Ein weiterer angereicherter Prozess war die Entwicklung der Cuticula (GO:0042335), der wachshaltigen äußeren Barriere der Pflanze. Der am signifikantesten ($p = 5,7e^{-5}$) angereicherte Prozess war die Lignin Biosynthese (GO:0009809).

Die identifizierten angereicherten molekularen Funktionen (MF) spiegelten sowohl im Fall der Kornertag-, als auch der Korntrockenmasse korrelierten Gene die angereicherten biologischen Prozesse beider Hybridmerkmale wieder. Die Anreicherungsanalyse zellulärer Komponenten (CC) diente der Identifikation subzellulärer Bereiche, in denen statistisch mehr Hybridmerkmal korrelierte Gene lokalisiert bzw. biologische Prozesse stattfanden. Diese Analyse ergab für die Korntrockenmasse korrelierten Gene überwiegend Prozesse, welche extrazellulär oder in der Zellperipherie lokalisiert waren. Im Fall der Kornertag korrelierten Gene wurden ausschließlich Prozesse identifiziert, welche in der Zelle ohne direkten Kontakt zur Zellperipherie angesiedelt waren (Abb.14, 15).

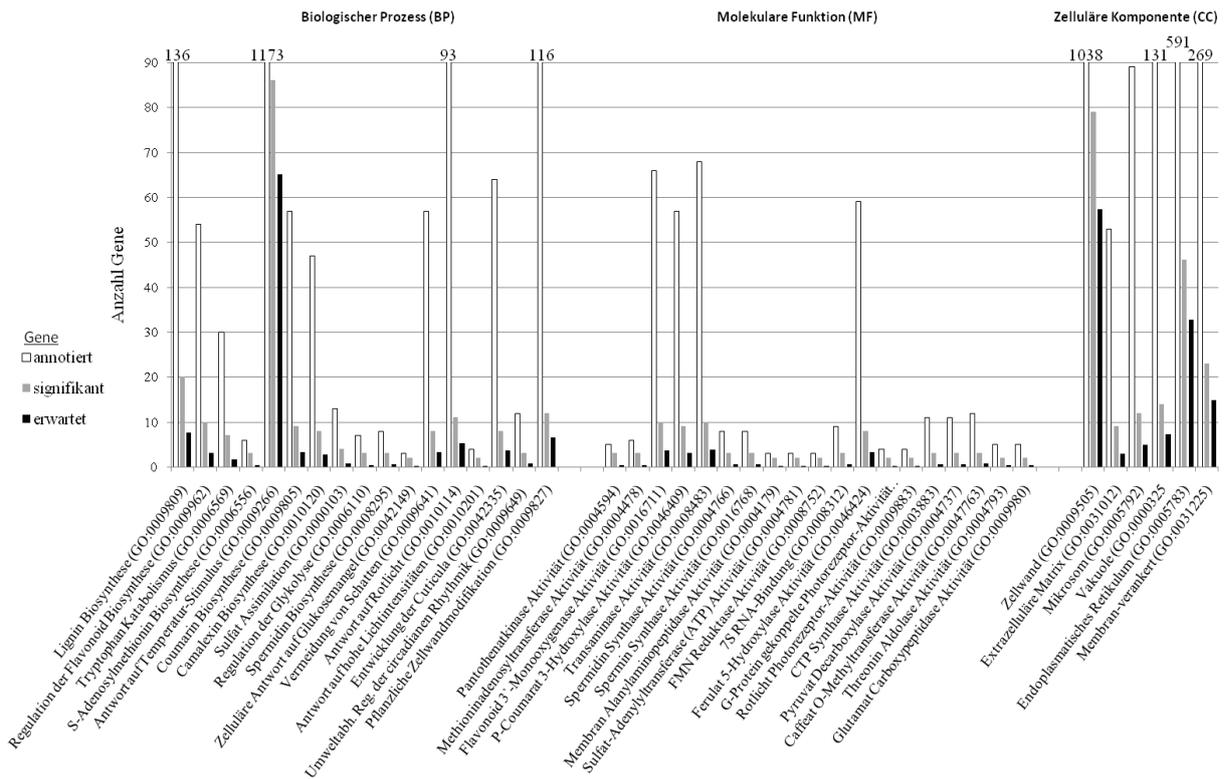


Abb.15: Angereicherte GOs der Hybridleistung der Korntrockenmasse korrelierten Gene.

Die Abbildung zeigt die angereicherten bzw. überrepräsentierten GOs der Gene, deren Genexpression mit der Hybridleistung der Korntrockenmasse signifikant ($p < 0,01$) korrelierten. Die angereicherten GOs wurden in drei Kategorien unterteilt, der biologische Prozess (BP), die molekulare Funktion (MF) und die zelluläre Komponente (CC). Ausschließlich GOs die signifikant ($p < 0,03$) angereichert waren sind aufgeführt und innerhalb der drei Kategorien, gemäß ihrer Signifikanz, mit dem signifikantesten auf der linken Seite, sortiert. Jeder GO-Begriff wird repräsentiert durch die Anzahl aller GO-verwandten annotierten Gene in der Analyse (annotiert), der Anzahl der GO-verwandten Gene die signifikant mit der Korntrockenmasse korrelierten (signifikant) und die statistisch zu erwartende Anzahl signifikant korrelierter Gene im Falle einer hypothetischen nicht vorhandenen Anreicherung (erwartet). (Thiemann *et al.* 2010)

Eine weitere Anreicherungsanalyse wurde mit den 545 Genen durchgeführt, dessen mittlere parentale Genexpression sowohl mit der Hybridleistung von Kornertrag als auch mit der Hybridleistung der Korntrockenmasse korrelierten (Tab.2). Signifikant angereicherte ($p < 0,03$) biologische Prozesse dieser Gene umfassten die Biosynthese von Lipiden und Lipopolysacchariden (Triglycerid-Biosynthese (GO:0019432), Lipopolysaccharid-Biosynthese (GO:0009103)), wachstumsrelevante Zellwand modifizierende Prozesse (GO:0009828, GO:0009831), die Meioseregulation (Synapsis (GO:0007129)) und lichtabhängige Entwicklungsprozesse (Photomorphogenese (GO:0009640)). Der am stärksten ($p = 0,003$) angereicherte biologische Prozess war erneut, wie auch bei den Kornertrag korrelierten Genen bereits, die Regulation der Glykolyse (GO:0006110).

Tabelle 2: Angereicherte biologische Prozesse (BP) von Genen, die sowohl mit der Hybridleistung vom Kornertag, als auch mit der Hybridleistung der Korntrockenmasse korrelierten.

GOs (angereichert)	Gene	p-Wert
Regulation der Glykolyse (GO:0006110)	2	0,003
Zellwand Auflockerung (GO:0009828)	4	0,005
Zellwandmodifikationen beim Zellwachstum (GO:0009831)	4	0,006
Triacylglycerol Biosynthese (GO:0019432)	2	0,011
Synapsis (GO:0007129)	1	0,024
Lipopolysaccharid-Biosynthese (GO:0009103)	1	0,024
Photomorphogenese (GO:0009640)	6	0,028

Signifikant ($p < 0,03$) angereicherte GOs (BP) der Gene, die signifikant ($p < 0,01$) mit der Hybridleistung von Kornertag und gleichzeitig signifikant ($p < 0,01$) mit der Hybridleistung der Korntrockenmasse korrelierten. Desweiteren ist die Anzahl der signifikant Hybridmerkmal korrelierten Gene innerhalb dieser angereicherten biologischen Prozesse gezeigt (Gene). Außerdem ist der p-Wert (weight) der Anreicherungsanalyse angegeben (p-Wert).

3.4 Neuannotation des 46k-Arrays

Die Annotation der Gene stammte ursprünglich vom „Maize Oligonucleotide Array Project“ der Universität von Arizona (<http://www.maizearray.org>). Von den insgesamt 43.381 Genen des 46k-Mikroarray waren 16.549 (38,15%) Gene zu diesem Zeitpunkt mit GOs annotiert. Das entsprach insgesamt einer Anzahl von 113.584 GOs mit einer durchschnittlichen GO-Anzahl von 6,86 pro Gen (Abb.16).

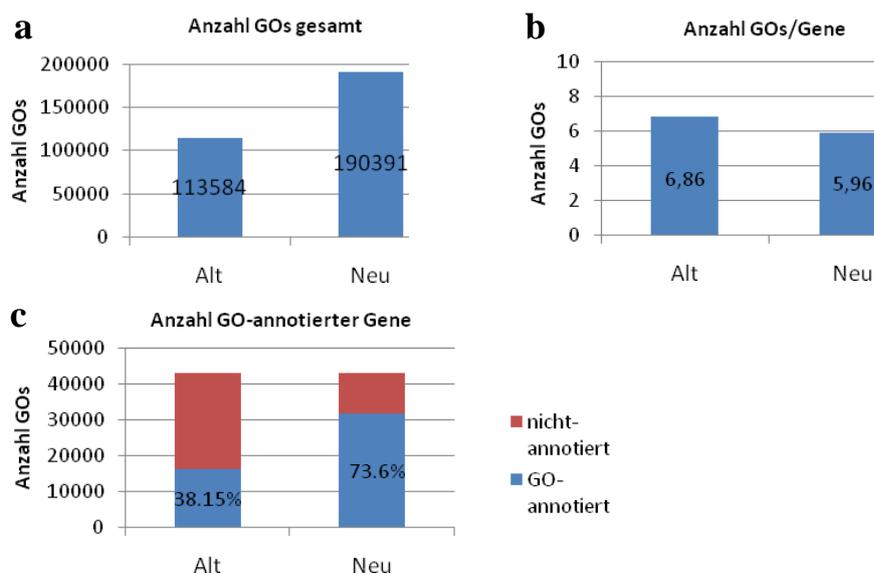


Abb.16: Ergebnisse der Neuannotation des 46k-Mikroarrays durch Blast2GO.

Die alte GO-Annotation stammte vom „Maize Oligonucleotide Array Project“ (<http://www.maizearray.org>) der Universität Arizona. Die neue Annotation erfolgte durch das Programm Blast2GO (<http://www.blast2GO.org>).

- Gesamtzahl der GOs (gene ontology) aller Gene des 46k-Arrays vor (alt) und nach (neu) der Neuannotation.
- Durchschnittliche Anzahl der GOs pro Gen vor (alt) und nach (neu) der Neuannotation.
- Gesamtzahl der Gene des 46k-Arrays mit GO-Annotation vor (alt) und nach (neu) der Neuannotation.

Nach der Neuannotation durch das Programm Blast2GO (<http://www.blast2go.org>) stieg die Anzahl der GO-annotierten Gene auf 31.927 (73,6%) also um nahezu das Doppelte des ursprünglichen Wertes an. Die Zahl der annotierten GOs pro Gen blieb mit 5,96 jedoch nahezu gleich (Abb.16). Die neue und umfassendere Annotation wurde in allen folgenden GO-Anreicherungsanalysen verwendet.

3.5 Charakterisierung von Heterosis für Kornertrag

Die Korrelationsanalysen zur Identifizierung Hybridmerkmal korrelierter Gene ergaben 1999 Gene deren mittlere parentale Expressionslevel signifikant mit MPH von Kornertrag korreliert waren. Von diesen MPH korrelierten Genen waren 899 Gene zur gleichen Zeit mit der Hybridleistung von Kornertrag korreliert. Diese Gene wurden aus den folgenden Analysen zur Charakterisierung von Heterosis ausgeschlossen und nur die 1100 allein MPH korrelierten Gene berücksichtigt.

Zum Zwecke der Charakterisierung von Heterosis wurde eine GO-Anreicherungsanalyse durchgeführt. Die GOs dabei stammten aus der Neuannotation durch das Programm Blast2GO (Kapitel 3.4). Die ausschließlich MPH korrelierten Gene wurden zunächst in die 613 positiv und die 487 negativ korrelierten Gene unterteilt und getrennt voneinander in jeweils einer GO-Anreicherungsanalyse untersucht.

Die Analyse der 613 allein MPH positiv korrelierten Gene ergab eine Vielzahl angereicherter ($p < 0,03$) biologischer Prozesse (BP) (Tab.3). Diese Prozesse konnten z.T. in übergeordneten Kategorien zusammengefasst werden. Zu den am signifikantesten angereicherten Prozessen gehörten solche, die an Energie bezogenen Prozessen, wie dem ATP- (GO:0015867) oder ADP- (GO:0015866) Transport und dem ATP-Synthese gekoppeltem Protonentransport (GO:0015986) beteiligt waren. Das am stärksten korrelierte Gen, des letztgenannten Prozesses kodierte für die ATPase Untereinheit 6 und wies eine Korrelation mit der Stärke r von 0,453 auf. Ebenso angereichert waren Prozesse, die an der Regulation der Genexpression beteiligt waren, wie die Histon-Phosphorylierung (GO:0016572), das posttranskriptionelle Gene Silencing (GO:0010495), das Schneiden von mRNAs (GO:0006379), die mRNA-Polyadenylierung (GO:0006378) und die Transkription durch die, an der rRNA-Synthese beteiligten, RNA-Polymerase I (GO:0006360). Weitere angereicherte biologische Prozesse umfassten solche, direkt oder indirekt involviert in der Endoreduplikation und dem Zellwachstum, wie die positive Regulation der DNA-Endoreduplikation (GO:0032877), die Regulation

des Mitoseendes (GO:0007096), die postreplikative Reparatur (GO:0006301) als auch dem Katabolismus der Zellwände (GO:0016998). Desweiteren waren biologische Prozesse angereichert, deren Funktionen in der Interaktion mit der Umwelt liegen. Solche Prozesse umfassten die Antwort der Pflanze bzw. der Zelle auf Pilze (GO:0009620), die Antwort auf osmotischen Stress (GO:0006970), als auch dem Übergangsprozess von der vegetativen in die reproduktive Phase, gelenkt durch eine Veränderung im Tag-Nacht-Rhythmus (GO:0048574). Der letztgenannte Prozess enthielt das am stärksten von allen Genen der angereicherten biologischen Prozesse korrelierte Gen mit einer Korrelationsstärke r von 0,5. Dieses Gen kodierte für das Calmodulin-verwandte Protein 2. Die letzte übergeordnete Kategorie angereicherter biologischer Prozesse umfasste biosynthetische bzw. metabolische Prozesse, wie die Biosynthese von Spermidin (GO:0008295) und Coumarin (GO:0009805) und dem Leucin-Metabolismus (GO:0006551).

Tabelle 3: Signifikant ($p < 0,03$) angereicherte biologische Prozesse (BP) von Genen, die mit der mittleren parental Heterosis (MPH) vom Korntrug positiv korrelierten.

GOs (angereichert)	Gene	p-Wert
ADP Transport (GO:0015866)	2	0,00062
ATP Transport (GO:0015867)	2	0,00062
ATP Synthese gekoppelter Protonentransport (GO:0015986)	6	0,00437
Leucin Metabolismus (GO:0006551)	3	0,0048
Zellwand Katabolismus (GO:0016998)	5	0,0057
Histon Phosphorylierung (GO:00016572)	2	0,00697
Posttranskriptionelles Gene Silencing (lange Distanz) (GO:0010495)	2	0,008363
Schneiden von mRNAs (GO:0006379)	2	0,01243
Reaktion auf Pilze (GO:0009620)	6	0,01364
Regulation des Mitoseendes (GO:0007096)	1	0,01441
Intermembran Transport (GO:0046909)	1	0,01441
Lichtabhängiger Blühzeitpunkt (GO:0048574)	2	0,01455
Spermidin Biosynthese (GO:0008295)	2	0,01681
mRNA Polyadenylierung (GO:0006378)	2	0,01921
Reaktion auf osmotischen Stress (GO:0006970)	12	0,02046
Postreplikative Reparatur (GO:0006301)	2	0,02442
RNA Polymerase I Transkription (GO:000360)	1	0,02862
Cumarin Biosynthese (GO:0009805)	1	0,02862
Positive Regulation der DNA-Endoreduplikation (GO:0032877)	1	0,02862

Signifikant ($p < 0,03$) angereicherte GOs (BP) der Gene, die signifikant ($p < 0,01$) positiv mit MPH von Korntrug korrelierten. Desweiteren ist die Anzahl der positiv MPH korrelierten Gene innerhalb der angereicherten biologischen Prozesse gezeigt (Gene). Zudem ist der p-Wert (weight) der Anreicherungsanalyse angegeben (p-Wert).

Insgesamt waren 51 (8,3%) der insgesamt 613 allein MPH korrelierten Gene an den genannten angereicherten biologischen Prozessen beteiligt. Die restlichen Gene gehörten somit biologischen Prozessen an, deren Anzahl korrelierter Gene dem statistisch zu erwarteten Wert entsprach oder deren Anzahl unter dem erwarteten Wert lag. Von den 51 Genen zeigten 31 Gene eine Korrelation mit einer Stärke r von 0,3 - 0,4, 19 Gene eine stärkere Korrelation mit Werten zwischen 0,4 - 0,5 und nur ein Gen, und zwar das bereits erwähnte Calmodulinverwandte Protein 2 kodierende Gen, eine Korrelationsstärke von 0,5.

Die vorherige Anreicherungsanalyse umfasste alle positiv korrelierten Gene, unabhängig von deren Korrelationsstärke (Tab.3). Um die Gene mit einer besonders hohen Korrelationsstärke, und somit einem potentiell größeren Einfluss auf MPH, zu untersuchen, wurden diese im Anschluss gesondert betrachtet. Insgesamt existierten 36 allein MPH positiv korrelierte Gene mit einer Korrelationsstärke größer 0,5. Das am stärksten korrelierte Gen zeigte eine Korrelationsstärke von 0,6 und eine Blastx-Analyse in der NCBI-Datenbank ergab die größtmögliche Sequenzhomologie (e -Wert = $1e^{-156}$) mit einem hypothetischen Protein aus *Sorghum bicolor* aus der SCP-Familie mit einer SCP-ähnlichen extrazellulären Domäne. Diese Genfamilie enthält Mitglieder, wie das Protein PR-1 (pathogenesis-related protein 1), welches an der pflanzlichen Abwehr von Pathogenen beteiligt ist (Niderman *et al.* 1995).

Mittels funktioneller Kategorien, etabliert vom Münchener Informationszentrum für *Arabidopsis* Proteinsequenzen (MIPS) (Ruepp *et al.* 2004) wurde eine Einteilung der 36 am stärksten positiv MPH-korrelierten Gene in 11 dieser funktionellen Kategorien vorgenommen. Die Einteilung der Gene erfolgte auf Grundlage der annotierten GOs durch Blast2GO. In Abbildung 17 ist die Anzahl der zu den jeweiligen Kategorien zugehörigen Gene in Prozent angegeben. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Gesamtanzahl der GO-annotierten Gene. Insgesamt konnten 20 der insgesamt 36 Gene gemäß ihrer GO-Annotation kategorisiert werden.

Die funktionelle Klassifikation zeigte, dass die meisten Gene am Metabolismus (45%) beteiligt waren. An der Signaltransduktion und Zellkommunikation waren 35% aller funktionell charakterisierbaren Gene beteiligt. Insgesamt 30% der Gene waren am Proteinschicksal und an Transportmechanismen beteiligt und 20% an der Regulation des Metabolismus. 15% der Gene wiesen eine Funktion in der Interaktion mit der Umwelt und 10% in der Transkription und Zellabwehr auf. Jeweils 5% der Gene waren am Zellzyklus, der Biogenese von Zellkomponenten oder der Proteinsynthese beteiligt (Abb.17).

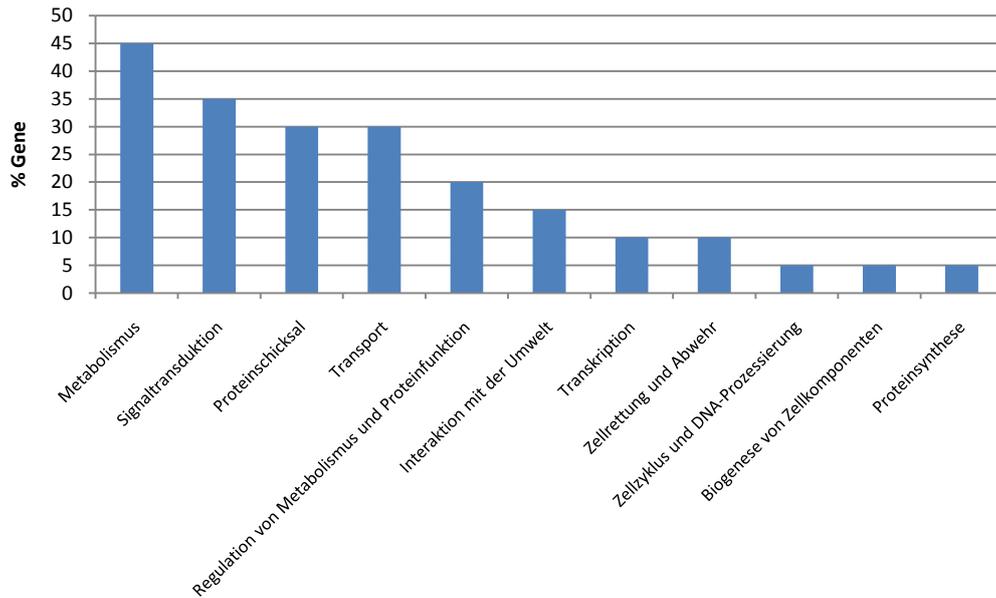


Abb.17: Funktionelle Klassifizierung der allein MPH positiv korrelierten Gene mit einer Korrelationsstärke r über 0,5.

55,6% der insgesamt 36 allein MPH positiv korrelierten Gene mit einer Korrelationsstärke r größer 0,5 konnten gemäß ihrer GO-Annotation in 11 Kategorien, etabliert vom Münchener Informationszentrum für *Arabidopsis* Proteinsequenzen (MIPS), eingeteilt werden. Ein Gen konnte dabei in mehreren Kategorien gleichzeitig vertreten sein. Insgesamt 16 Gene (44,4%) konnten z.T. aufgrund fehlender GO-Annotation keiner der Kategorien zugeordnet werden.

Als nächstes wurde eine GO-Anreicherungsanalyse mit den allein MPH, negativ korrelierten Genen durchgeführt. Die Analyse ergab eine Vielzahl verschiedener biologischer Prozesse, die im Gegensatz zu den positiv korrelierten Genen einer sehr viel größeren Bandbreite an übergeordneten Kategorien zugeordnet werden konnten (Tab.4). Ähnlich wie bei den positiv korrelierten Genen waren auch hier wieder Prozesse der DNA-Replikation vertreten, wie die postreplikative Reparatur (GO:0006301) und die Regulation der DNA-Replikation (GO:0006275), sowie Prozesse welche an der Interaktion mit der Umwelt beteiligt waren, wie die Reaktion der Pflanze auf hohe Temperaturen (GO:0009408). Weitere gemeinsame Kategorien umfassten, in die Modifikation der Zellwände involvierte Prozesse, wie die Biosynthese von Cellulose (GO:0030244) und Prozesse, die chemische und strukturelle Veränderungen in der Zellwand (GO:0009831) bedingen und somit eine größere Streckung der Zelle (GO:0009828) beim Zellwachstum erlauben. Zusätzlich waren Prozesse angereichert die nur hier auftraten und die mit der Signaltransduktion (GO:0035023), der Trichoblasten-Entwicklung (GO:0010063), der Synthese von Membranbestandteilen (GO:0006656, GO:0042425), der Methylierung von Proteinen (GO:0006479) und dem Transport, wie z.B. von Proteinen in die innere mitochondrielle Membran (GO:0045039) oder dem mitochondrialen Elektronentransport (GO:0006120) assoziiert waren. Zusätzlich waren noch eine

Vielzahl biosynthetischer und metabolischer Prozesse unterschiedlicher Verbindungen, wie z.B. von Aminosäuren (GO:0009089), Kofaktoren (GO:0006729, GO:0046653), Pigmenten (GO:0046148) oder des Pentose-Phosphat-Weges (GO:0006098) angereichert (Tab.4).

Tabelle 4: Signifikant ($p < 0,03$) angereicherte biologische Prozesse (BP) von Genen, die mit der mittleren parental Heterosis (MPH) vom Kornertrag negativ korrelierten.

GOs (angereichert)	Gene	p-Wert
Zellulose Biosynthese (GO:0030244)	6	0,00036
Postreplikative Reparatur (GO:0006301)	3	0,00131
Phosphatidylcholin Biosynthese (GO:0006656)	2	0,00246
Cholin Biosynthese (GO:0042425)	2	0,00246
Tetrahydrofolat Metabolismus (GO:0046653)	2	0,00576
Porphyrin Biosynthese (GO:0006779)	5	0,00855
Pentose Phosphat Weg (GO:0006098)	4	0,00879
Folsäure Biosynthese (GO:0009396)	3	0,00901
Mitochondrieller Elektronentransport (GO:0006120)	2	0,01029
Zellwandauflockerung (GO:0009828)	2	0,01206
Positive Regulation der Trichoblastentwicklung (GO:0010063)	1	0,01306
Nickel-Ionen Transport (GO:0015675)	1	0,01306
Regulation der Rho-Protein Signaltransduktion (GO:0035023)	1	0,01306
Pigment Biosynthese (GO:0046148)	6	0,0133
Zellwandmodifikationen während Zellwachstum (GO:0009831)	2	0,01395
Regulation der DNA-Replikation (GO:0006275)	2	0,01596
Lysin Biosynthese (GO:0009089)	2	0,01808
Proteinimport in innere mitoch. Membran (GO:0045039)	2	0,01808
Carbonsäure Biosynthese (GO:0046394)	9	0,01827
Reaktion auf Hitze (GO:0009408)	6	0,01883
Protein-Aminosäure Methylierung (GO:0006479)	4	0,01953
Arabinose Metabolismus (GO:0019566)	2	0,02267
Threonyl-tRNA Aminoacetylierung (GO:0006435)	1	0,02595
Tetrahydrobiopterin Biosynthese (GO:0006729)	1	0,02595
Methylammonium Transport (GO:0015843)	1	0,02595
Beta-Oxidation bestimmter ungesättigter Fettsäuren (GO:0033542)	1	0,02595
Positive Regulation des Schwefel Metabolismus (GO:0051176)	1	0,02595

Signifikant ($p < 0,03$) angereicherte GOs (BP) der Gene, die signifikant ($p < 0,01$) negativ mit MPH von Kornertrag korrelierten. Desweiteren ist die Anzahl der negativ MPH korrelierten Gene innerhalb der angereicherten biologischen Prozesse gezeigt (Gene). Zudem ist der p-Wert (weight) der Anreicherungsanalyse angegeben (p-Wert).

Von den insgesamt 487 allein MPH negativ korrelierten Genen waren 57 (11,7%) an den signifikant angereicherten Prozessen beteiligt. Von diesen 57 Genen war der Großteil (44

Gene) mit einer Korrelationsstärke r von -0,3 bis -0,4 mit MPH korreliert und 12 Gene mit einer Stärke von -0,4 bis -0,5. Insgesamt 9 Gene waren mit einer negativen Korrelationsstärke r größer 0,5 mit MPH korreliert. Das am signifikantesten korrelierte Gen besaß eine Korrelationsstärke r von -0,55. Hierbei handelte es sich laut Mikroarray-Neuannotation durch das Programm Blast2GO um ein Gen, welches für ein Protein mit der Bezeichnung „Chloroplast Zebra Nekrosis Protein“ kodierte, welches wahrscheinlich an der Chloroplasten-Entwicklung in frühen Stadien der Blatentwicklung beteiligt ist (Li *et al.* 2010).

Nach den Informationen der Array-Annotation durch Blast2GO kodierten zwei der neun am stärksten negativ korrelierten Gene für Proteine, die an der Translation beteiligt waren. Hierzu gehörten ein Elongationsfaktor (MZ00029738) und eine β -Untereinheit eines Initiationsfaktors (MZ00038786). Außerdem waren noch ein mit dem Interferon-verwandter Entwicklungsregulator (MZ00019162) und ein Copia-Retrotransposon (MZ00056689) unter den am stärksten negativ korrelierten Genen. Ein weiteres der neun Gene kodierte für eine Protease aus Chloroplasten (MZ00027578), ein anderes für ein durch DNA-Schäden induzierbares Protein (DDI1-Homolog) mit einer Ubiquitin-Domäne (MZ00026003) und ein weiteres für ein Protein mit einer Pentatricopeptid Repeat-Domäne (MZ00028089).

Tabelle 5: Signifikant ($p < 0,03$) angereicherte zelluläre Komponenten (CC) von Genen, die allein mit MPH vom Kornertrag korrelierten.

GOs (angereichert)	Gene	p-Wert
Innere Membran der Mitochondrien (GO:0005743)	23	9,60E-05
Stroma der Chloroplasten (GO:0009570)	29	0,00044
Pyrophosphat-abh. Phosphofruktokinase Komplex (GO:0010316)	3	0,0015
ATP-Synthase Komplex, Kopplungsfaktor F(o) (GO:0045263)	4	0,00272
UBC13-MMS2 Komplex (GO:0031372)	3	0,0037
PCNA Komplex (GO:0043626)	2	0,0043
Kleine ribosomale Untereinheit (GO:0015935)	12	0,00679
Atmungskette Komplex I (GO:0045271)	6	0,00985
Cytosol (GO:0044445)	17	0,02383
Peroxisomale Matrix (GO:0005782)	1	0,02729
Kinetochor Mikrotubuli (GO:0005828)	1	0,02729

Signifikant ($p < 0,03$) angereicherte GOs (CC) der Gene, die signifikant ($p < 0,01$) allein mit MPH vom Kornertrag korrelierten. Desweiteren ist die Anzahl der allein MPH korrelierten Gene innerhalb der angereicherten zellulären Komponenten gezeigt (Gene). Zudem ist der p-Wert (weight) der Anreicherungsanalyse angegeben (p-Wert).

GO-Anreicherungsanalysen der zellulären Komponenten (CC) mit den positiv und negativ MPH korrelierten Genen ergaben eine besonders häufige Lokalisierung in den Chloroplasten

(GO:0009570) und in der inneren Membran der Mitochondrien (GO:0005743). Ebenfalls angereichert, jedoch weniger signifikant, waren Bereiche im Cytosol, dem Kern und den Peroxisomen (Tab.5).

3.6 *In silico* mapping der Hybridmerkmal korrelierten Gene

Nach der Identifizierung der Hybridmerkmal korrelierten Gene wurde in einem nächsten Schritt deren Position auf dem Maisgenom *in silico* ermittelt. Das Ziel dieser Lokalisierung der Gene war die Klärung der Frage, ob deren Verteilung im Genom zufällig ist oder auf bestimmte Bereiche konzentriert war. Eine nicht zufällige Verteilung könnte dann im Anschluss zur Identifizierung Hybridmerkmal assoziierter chromosomaler Regionen beitragen.

Die Lokalisierung der Hybridmerkmal korrelierten Gene auf dem Maisgenom der Linie B73 erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben (siehe Kapitel 2.2.7) anhand einer Blastn-Analyse der 50-70 nt langen Oligonukleotidsequenzen des 46kArrays gegen die B73 Ref-Gen_v1-Datenbank (<http://www.maizegdb.org>). Nach der Blastn-Analyse wurden die Treffer nach bestimmten Kriterien gefiltert, in dessen Verlauf einige von Ihnen für die nachfolgenden Analyseschritte eliminiert wurden. Der Filterprozess sorgte für einen Ausschluss repetitiver genomischer Sequenzen aus der Analyse. Im Anschluss an die Blastn-Analyse und den Filterprozess blieben von den Hybridleistung Kernertrag korrelierten Genen 1428 (84,3%), von den Hybridleistung Korntrockenmasse korrelierten Genen 2048 (88,4%) und von den allein MPH Kernertrag korrelierten Genen 962 (87,45%) gemappte Gene übrig.

Um die Frage nach der Zufälligkeit der Verteilung der Hybridmerkmal korrelierten Gene auf dem Maisgenom zu untersuchen, wurden diese mit einem Satz aus 20.000 zufällig ausgewählten Genen des 46k-Arrays verglichen. Eine Blastn-Analyse zur Lokalisierung der 20.000 Gene auf dem B73-Maisgenom, gefolgt von einem Filterprozess der Blastn-Treffer, führte zur Identifizierung von insgesamt 17.298 (86,49%) gemappten Kontrollgenen.

Für die Analyse wurde das gesamte Maisgenom zunächst in gleich große Fragmente unterteilt. Da sich kein Fragment über zwei Chromosomen erstrecken sollte, wurden die übrig gebliebenen Abschnitte am Ende eines jeden Chromosoms dem vorausgegangenen Fragment angefügt. Anschließend wurden von den gemappten Kontrollgenen zufällige Stichproben in der Größe der jeweiligen Hybridmerkmal-korrelierten Gengruppe genommen, und deren Verteilung auf dem Maisgenom ermittelt. Dieser Schritt wurde mit immer wechselnden,

zufällig ausgewählten Stichproben insgesamt tausendmal durchgeführt und die durchschnittliche Anzahl der Kontrollgene pro Genom-Fragment bestimmt.

Zur Untersuchung der Gene, die mit der Hybridleistung von Kornertrag korrelierten, wurde das Genom in 200 Fragmente mit einer Länge von jeweils 10.320.216 bp unterteilt. Die Stichprobengröße der Kontrollgene für die Analyse der Kornertrag Hybridleistung korrelierten Gene betrug 1428 Gene. Mittels eines Chi-Quadrat-Tests konnte im Anschluss festgestellt werden, dass die Verteilung der korrelierten Gene signifikant (p -Wert = 0,00038) von der Verteilung der Kontrollgene, also einer rein zufälligen Verteilung abwich. In Abbildung 18 ist die durchschnittliche Verteilung der Kontrollgene und die der Hybridleistung von Kornertrag korrelierten Gene schematisch dargestellt. Anhand der Kontrollgene konnte man deutlich die Verteilung der Gene auf den einzelnen Chromosomen erkennen, die sich je nach Region deutlich voneinander in der Genanzahl unterschieden. So waren z.B. aufgrund der Zentromere in bestimmten mittleren Bereichen der Chromosomen weniger Gene lokalisiert als in den Randbereichen. Die Kornertrag korrelierten Gene folgten im Großen und Ganzen diesem Muster, unterschieden sich jedoch in einigen Regionen des Genoms erheblich von der zufälligen Verteilung, was in der Summe betrachtet zu dem signifikanten Unterschied, ermittelt durch den Chi-Quadrat-Test, führte.

In einem nächsten Schritt sollten die Fragmente auf dem Maisgenom identifiziert werden, bei denen die Anzahl der Hybridleistung von Kornertrag korrelierten Gene besonders stark von der rein zufälligen Verteilung abwich. Hierzu wurde überprüft, in welchen Fragmenten die Anzahl der korrelierten Gene im Vergleich zur zufälligen Verteilung der Kontrollgene um mindestens den zweifachen Wert erhöht war. Dies traf für 3 Fragmente auf dem Chromosom 1 (Fragment 12, 14, 16), 2 Fragmente auf dem Chromosom 3 (Fragment 4, 13), 1 Fragment auf Chromosom 7 (Fragment 2) und ein weiteres Fragment auf Chromosom 8 (Fragment 15) zu (Abb.18). Auf Chromosom 1 betraf das das Fragment 12 (gyld1.12), mit 6 kolokalisierten Kornertrag korrelierten Genen, das Fragment 14 (gyld1.14) mit jeweils 5 und das Fragment 16 (gyld1.16) mit jeweils 8 Kornertrag korrelierten Genen. Auf Chromosom 3 besaßen das Fragment 4 (gyld3.4) mit 13 Genen und das Fragment 13 (gyld3.13) mit 19 Genen, mindestens doppelt so viele Gene wie statistisch erwartet und auf Chromosom 7 das Fragment 2 (gyld7.2) mit 15 Genen und auf Chromosom 8 das Fragment 15 (gyld8.15) mit 19 Genen. Eine Liste der in diesen genomischen Fragmenten lokalisierten Hybridleistung von Kornertrag korrelierten Genen, befindet sich im Anhang (Kapitel 7.2, Tab.11).

3 Ergebnisse

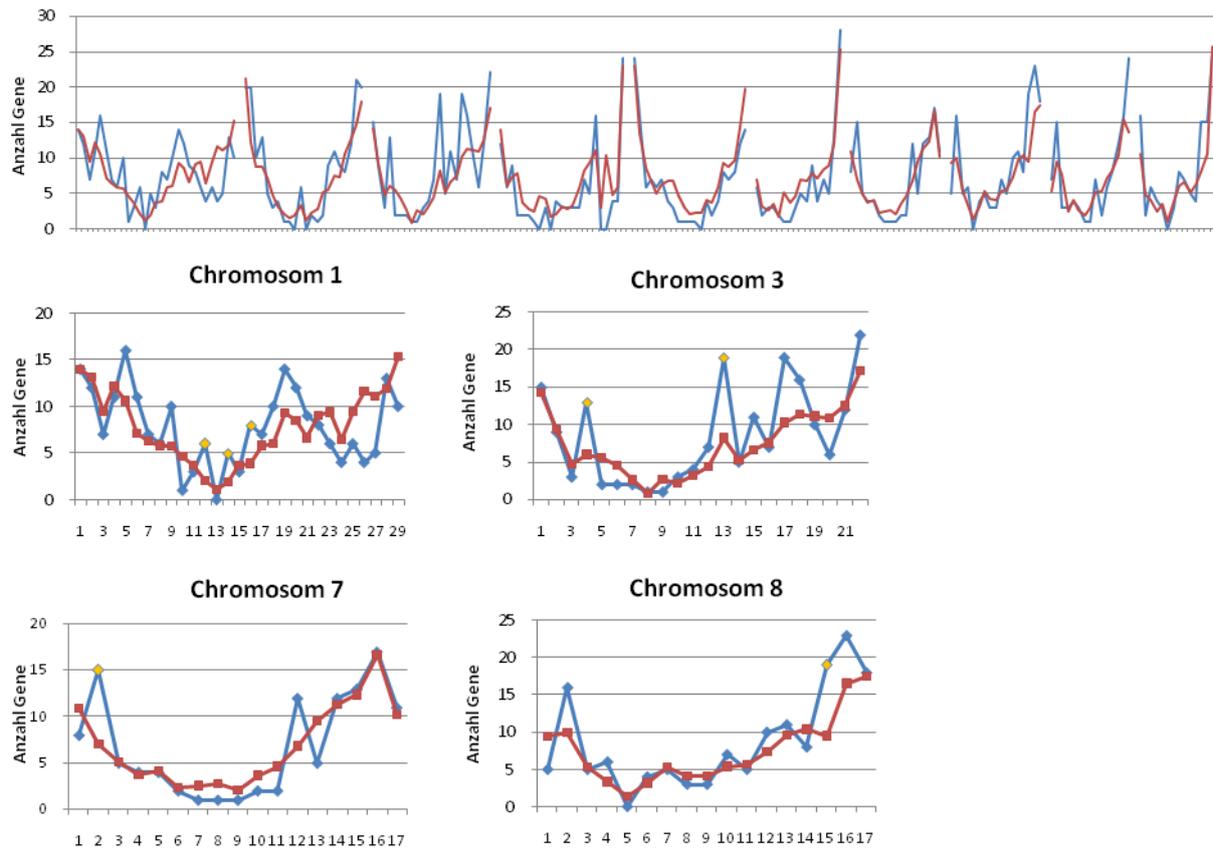


Abb. 18: Genverteilung Hybridleistung von Kornertrag korrelierter Gene auf dem Maisgenom.

Die Abbildungen zeigen die durchschnittliche Anzahl der zufällig ausgewählten Kontrollgene (rot), sowie die Anzahl der Hybridleistung von Kornertrag korrelierter Gene (blau) pro Genomfragment (x-Achse). Die obere Abbildung zeigt die Genverteilung aller 10 Chromosomen von Mais. Unten ist die Genverteilung der Chromosomen 1, 3, 7 und 8 dargestellt, bei der die Anzahl korrelierter Gene die durchschnittliche Anzahl der Kontrollgene in einigen Fragmenten um mindestens das Doppelte übersteigt (orange Markierung).

Die gleiche Analyse über die Verteilung von Hybridmerkmal korrelierten Genen auf dem Maisgenom wurde mit den 1100 Genen durchgeführt, die signifikant ($p < 0,01$) und allein mit MPH von Kornertrag korrelierten. Gene die gleichzeitig mit der Hybridleistung von Kornertrag assoziiert waren wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Die Stichprobengröße der Kontrollgene betrug in dieser Analyse 962 Gene und das Genom wurde in 150 Fragmente, mit jeweils einer Länge von 13.760.288 bp unterteilt. Die Abbildung 19 zeigt, dass sich erneut die Verteilung Heterosis korrelierter Gene in manchen Regionen des Genoms deutlich von der Normalverteilung der Kontrollgene unterschied. Die statistische Abweichung der Heterosis-Gene von der Normalverteilung konnte durch einen Chi-Quadrat-Test bestätigt werden ($p = 0,01$). Die Fragmente, in denen die Abweichung von der Normalverteilung mindestens um das Zweifache erhöht war, befanden sich auf Chromosom 1 (Fragment 1, 8, 14), Chromosom 2 (Fragment 6) und Chromosom 3 (Fragment 7). Die Anzahl der Heterosis korrelierten Gene in den Fragmenten lag zwischen 4 (Chr3, Fragment 7 (hgyld3.7)) und 26 Genen (Chromosom 1, Fragment 1 (hgyld1.1)). Insgesamt waren 58 allein MPH korrelierte Gene in diesen Fragmenten

ten lokalisiert. In der schematischen Abbildung 22 sind die Positionen der Fragmente mit erhöhter Gendichte noch einmal dargestellt und im Anhang findet sich eine Liste der kolokalisierten Gene (Kapitel 7.3, Tab.12).

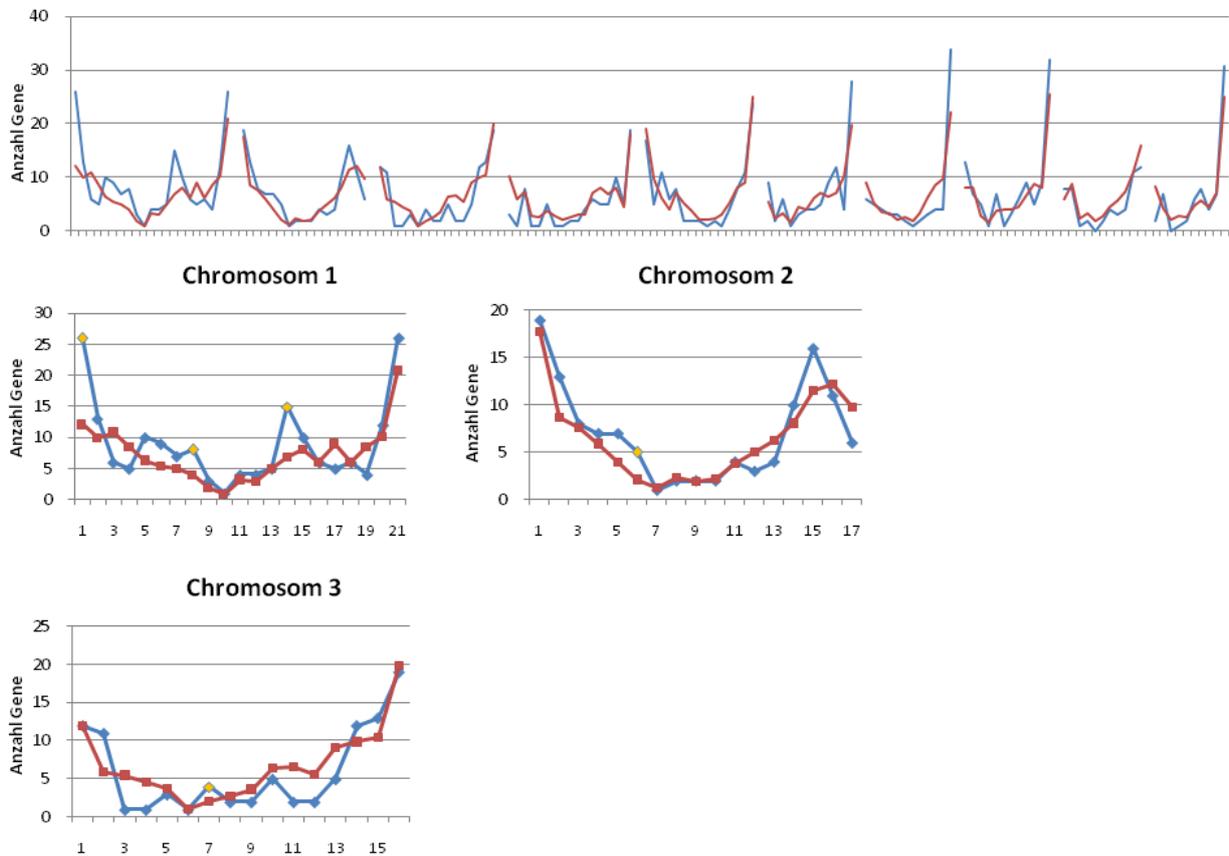


Abb.19: Genverteilung allein MPH korrelierter Gene auf dem Maisgenom.

Die Abbildungen zeigen die durchschnittliche Anzahl der zufällig ausgewählten Kontrollgene (rot), sowie die Anzahl der allein MPH korrelierten Gene (blau) pro Genomfragment (x-Achse). Die obere Abbildung zeigt die Genverteilung aller 10 Chromosomen von Mais. Unten ist die Genverteilung der Chromosomen 1, 2, und 3 dargestellt, bei der die Anzahl korrelierter Gene die durchschnittliche Anzahl der Kontrollgene in einigen Fragmenten um mindestens das Doppelte übersteigt (orange Markierung).

Ein Vergleich der identifizierten genomischen Fragmente mit erhöhter Dichte von Hybridleistung bzw. MPH von Kornertrag korrelierter Gene und bekannter QTLs für das Merkmal Kornertrag aus der Datenbank von Maizegdb (<http://www.maizegdb.org>) ergab Kolokalisierungen im Genom der Linie B73. Die Lokalisierung der QTLs erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben (Kapitel 2.2.7.2). Insgesamt handelte es sich um 3 QTLs auf Chromosom 1 mit den Bezeichnungen qgyld25 (Agrama *et al.* 1996), qgyld55 (Kozumplik *et al.* 1996) und qgyld70 (Austin und Lee 1998). Dabei überlappte qgyld25 teilweise, und zwar auf einer Länge von 8.940.060 bp, mit dem Fragment gyld1.12 der Hybridleistung von Kornertrag. qgyld55 hingegen kolokalisierte in seiner gesamten Länge von 180.790.928 bp mit den Fragmenten gyld1.12, gyld1.14 und gyld1.16 der Hybridleistung von Kornertrag, als auch mit den Fragmenten hgyld1.8 und hgyld1.14, der allein MPH von Kornertrag korrelierten Gene.

Das QTL qgyld70 hingegen war teilweise mit dem Fragment hgyld1.14, der allein MPH von Kornertrag korrelierten Gene, auf Chromosom 1 kolokalisiert. Die Länge der Überschneidung betrug 8.991.441 bp. Weitere QTLs waren qgyld37 (Ribaut *et al.* 1997), qgyld63 (Melchinger *et al.* 1998) und qgyld74 (Austin und Lee 1998), die allesamt mit dem Fragment gyld8.15 der Hybridleistung von Kornertrag auf Chromosom 8 kolokalisierten. In Tabelle 7 und Abbildung 22 sind die QTLs zusammen mit den kolokalisierten genomischen Fragmenten aufgeführt bzw. schematisch dargestellt. In Tabelle 6 sind alle identifizierten genomischen Fragmente der Hybridleistung und der Heterosis von Kornertrag aufgeführt.

Tabelle 6: Genomische Fragmente mit statistisch erhöhter Dichte an Hybridleistung bzw. MPH von Kornertrag korrelierten Genen.

QTL (Kornertrag)	Chromosom	Bin (B73 GefGen_v2)	Physikalische Pos. (B73 GefGen_v1)	Anzahl korrelierter Gene
gyld1.12	1	1,05	113.522.376 - 123.842.592	6
gyld1.14	1	1,05	134.162.808 - 144.483.024	5
gyld1.16	1	1,05	154.803.240 - 165.123.456	8
gyld3.4	3	3,04	30.960.648 - 41.280.864	13
gyld3.13	3	3,04 - 3,05	123.842.592 - 134.162.808	19
gyld7.2	7	7,01 - 7,02	10.320.216 - 20.640.432	15
gyld8.15	8	8,05 - 8,06	144.483.024 - 154.803.240	19
hgyld1.1	1	1,00 - 1,02	1- 13.760.288	26
hgyld1.8	1	1,05	96.322.016 - 110.082.304	8
hgyld1.14	1	1,06	178.883.744 - 192.644.032	15
hgyld2.6	2	2,04 - 2,05	68.801.440 - 82.561.728	5
hgyld3.7	3	3,04	82.561.728 - 96.322.016	4

Die Position der genomischen Fragmente mit erhöhter Dichte Hybridmerkmal korrelierter Gene ist durch das Chromosom, das jeweilige Bin und die physikalische Position angegeben. In der rechten Spalte ist die Anzahl der aus den Fragmenten befindlichen Hybridleistung von Kornertrag korrelierten Genen für die gyld-Fragmente bzw. die Anzahl der MPH von Kornertrag korrelierten Genen für die hgyld-Fragmente angegeben.

Tabelle 7: QTLs (Quantitative trait loci) vom quantitativen Merkmal Kornertrag, welche mit genomischen Fragmenten kolokalisieren, die eine erhöhte Anzahl an MPH bzw. Hybridleistung von Kornertrag korrelierten Genen aufweisen.

QTL (Kornertrag)	QTL-Experiment	Chromosom	Bin	Marker-Intervall	Physikalische Pos. des QTL (B73 GefGen_v1)	kolokalisierte Fragmente mit erhöhter Gendichte
qgyld25	Agrama und Moussa 1996	1 (kurzer Arm)	1,02	umc76a - umc167a	29.364.559 - 114.902.532	gyld1.12
qgyld55	Kozumplik <i>et al.</i> 1996	1 (kurzer Arm)	1,00	ts2 - umc128a	46.811.296 - 227.602.224	gyld1.12;1.14;1.16 hgyld1.8; 1.14
qgyld70	Austin und Lee 1998	1 (langer Arm)	1,06	bnl5.59a - bnl7.08b	183.652.591 - 206.220.588	hgyld1.14
qgyld37	Ribaut <i>et al.</i> 1997	8 (langer Arm)	8,06	umc30a - umc150a	117.343.634 - 162.222.309	gyld8.15
qgyld63	Melchinger <i>et al.</i> 1998	8 (langer Arm)	8,05	umc89a - umc30a	137.229.946 - 154.965.062	gyld8.15
qgyld74	Austin und Lee 1998	8 (langer Arm)	8,06	umc48a - npi268a	151.282.524 - 164.404.492	gyld8.15

Aufgeführt ist die QTL-Nomenklatur von Maizegdb (www.maizegdb.org) und die Experimente, in denen die QTLs identifiziert wurden. Die Position der QTLs ist durch das Chromosom, das jeweilige Bin, die flankierenden Marker und die physikalische Position des QTLs, basierend auf den Positionsdaten der flankierenden Marker, angegeben. In der rechten Spalte sind die, mit den QTLs kolokalisierten, Fragmente mit erhöhter Dichte an Hybridleistung (gyld) bzw. Heterosis (hgyld) von Kornertrag korrelierter Gene aufgeführt.

Um eine Vorstellung über die Funktion der Gene aus Regionen des Genoms mit erhöhter Dichte Hybridmerkmal korrelierter Gene zu erhalten, wurden diese in funktionelle Kategorien, etabliert vom Münchener Informationszentrum für *Arabidopsis* Proteinsequenzen (MIPS) (Ruepp *et al.* 2004), einsortiert. Eine solche Einteilung zeigte bei den 85 Genen, die mit der Hybridleistung von Kornertrag korrelierten, eine starke Zugehörigkeit zu metabolischen Prozessen (43,2%), dem Proteinschicksal (31,8%), dem Transport (18,2%) und der Signaltransduktion (13,6%). Weitere funktionelle Gruppen umfassten die Transkription (9,1%), die Biogenese von Zellkomponenten (9,1%), die Interaktion mit der Umwelt (6,8%) und die Regulation von Metabolismus und Proteinfunktion (6,8%). Insgesamt wurden die Gene in 13 Kategorien eingeteilt, 48,2% der Gene konnten dabei aufgrund z.T. fehlender oder ungenügender GO-Annotation keiner funktionellen Gruppe zugeordnet werden (Abb.20).

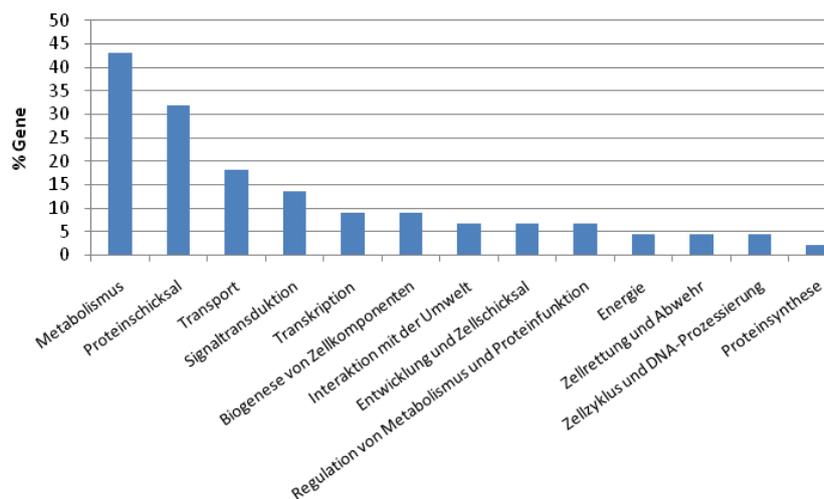


Abb.20: Funktionelle Klassifizierung der Hybridleistung von Kornertrag korrelierten Gene aus den genomischen Regionen mit erhöhter Gendichte.

52% der 85 Hybridleistung von Kornertrag korrelierten Gene aus den Fragmenten mit erhöhter Gendichte konnten gemäß ihrer GO-Annotation in 13 Kategorien, etabliert vom Münchener Informationszentrum für *Arabidopsis* Proteinsequenzen (MIPS), eingeteilt werden. Ein Gen konnte dabei in mehreren Kategorien gleichzeitig vertreten sein. Insgesamt 41 Gene (48%) konnten z.T. aufgrund fehlender GO-Annotation keiner der Kategorien zugeordnet werden.

Eine GO-Anreicherungsanalyse der Hybridleistung von Kornertrag korrelierten Gene in den genomischen Fragmenten ergab mehrere biologische Prozesse die signifikant ($p < 0,03$) angereichert waren (Tab.8). Zu den am signifikantesten angereicherten Prozessen gehörten die Biosynthese von FAD (GO:0006747) und der Metabolismus von FMN (GO:0046444), also von Prozessen, die an Redox-Reaktionen beteiligt waren. Ebenfalls angereichert waren unter Anderen der Transport von Allantoin (GO:0015720) und die Biosynthese von Cholesterol (GO:0006695).

Tabelle 8: Angereicherte biologische Prozesse (BP) von Hybridleistung von Kornertrag korrelierten Genen, die in Regionen mit signifikant erhöhter Anzahl korrelierter Gene, auf dem Genom von *Zea mays L.* kolokalisieren.

GOs (angereichert)	Gene	p-Wert
FAD Biosynthese (GO:0006747)	1	0,0015
FMN Metabolismus (GO:0046444)	1	0,0015
Allantoin Transport (GO:0015720)	1	0,0044
Cholesterol Biosynthese (GO:0006695)	1	0,0088
Proteinimport in Kern (GO:0006606)	2	0,0113
Adenin Wiederverwertung (GO:0006168)	1	0,0176
Polyamin Katabolismus (GO:0006598)	1	0,019
Phytochelatin Biosynthese (GO:0046938)	1	0,0248
Mo-Molybdopterin Kofactor Biosynthese (GO:0006777)	1	0,0262
Antwort auf Cadmium-Ion (GO:0046686)	3	0,0267

Signifikant ($p < 0,01$) angereicherte GOs (BP) innerhalb der Gene die signifikant ($p < 0,01$) mit der Hybridleistung von Kornertrag korrelieren und die in Regionen des Genoms mit statistisch erhöhter Anzahl korrelierter Gene lokalisiert sind. Desweiteren ist die Anzahl der signifikant korrelierten und kolokalisierten Gene gezeigt innerhalb dieser angereicherten biologischen Prozesse (Gene). Außerdem ist der p-Wert (weight) der Anreicherungsanalyse angegeben.

Eine funktionelle Einteilung der 58 allein MPH von Kornertag korrelierten Gene nach MIPS, die in den Regionen mit besonders hoher Gendichte lagen ergab, dass der Großteil der Gene am Transport (29%), dem Metabolismus (29%), dem Proteinschicksal (19,5%) und der Interaktion mit der Umwelt (19,5%) beteiligt waren. Gefolgt von 14,6% der Gene beteiligt an der Biogenese von Zellkomponenten, 12,2% an der Signaltransduktion und ebenfalls 12,2% an Entwicklungsprozessen wie dem Zellschicksal, der Zelldifferenzierung und der Organdifferenzierung. Insgesamt wurden die Gene in 14 Kategorien eingeteilt und 29,3% der Gene konnten dabei keiner funktionellen Gruppe zugeordnet werden (Abb.21).

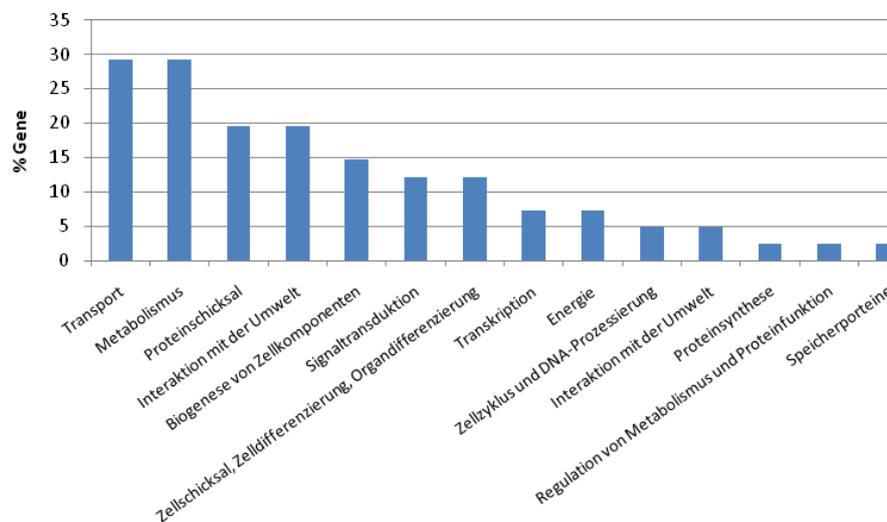


Abb.21: Funktionelle Klassifizierung der allein MPH von Kornertag korrelierten Gene aus den genomischen Regionen mit erhöhter Gendichte.

70,7 der 58 allein MPH von Kornertag korrelierten Gene aus den Fragmenten mit erhöhter Gendichte konnten gemäß ihrer GO-Annotation in 14 Kategorien, etabliert vom Münchener Informationszentrum für *Arabidopsis* Proteinsequenzen (MIPS), eingeteilt werden. Ein Gen konnte dabei in mehreren Kategorien gleichzeitig vertreten sein. Insgesamt 17 Gene (29,3%) konnten z.T. aufgrund fehlender GO-Annotation keiner der Kategorien zugeordnet werden.

Eine GO-Anreicherungsanalyse mit den allein MPH von Kornertag korrelierten Genen der identifizierten genomischen Fragmente ergab verschiedene biologische Prozesse, die schon bereits in den vorherigen Anreicherungsanalysen von allein positiv als auch negativ MPH von Kornertag korrelierten Genen (Kapitel 3.5, Tab.4 und 5) identifiziert wurden. So waren erneut die positiv korrelierten Prozesse, wie die positive Regulation der Endoreduplikation (GO:0032877), der Zellwand Katabolismus (GO:0016998), der ATP-Synthese gekoppelte Protonentransport (GO:0015986) sowie der lichtabhängige Blühzeitpunkt (GO:0048574) vertreten. Ebenfalls vertreten waren erneut Prozesse wie der Nickelionen-Transport (GO:0015675), der mitochondrielle Elektronentransport (GO:0006120) sowie die Zellwand-

auflockerung (GO:0009828). Prozesse, die den bereits identifizierten MPH-assoziierten Prozessen ähnelten, waren die Antwort auf biotischen Stimulus (GO:0009607) bzw. auf symbiotischen Pilz (GO:0009610) sowie der in der Pathogenabwehr involvierte Chitin Katabolismus (GO:0006032). Neue Prozesse umfassten den Oligopeptid-Transport (GO:0006857), die Syncytium-Bildung (GO:0006949), die Pollen und Spermazellen-Differenzierung (GO:0048235) und den Metabolismus von Glutathion (GO:0006749) (Tab.9).

Tabelle 9: Angereicherte biologische Prozesse (BP) von MPH korrelierten Genen, die in Regionen mit signifikant erhöhter Anzahl korrelierter Gene, auf dem Genom von Zea mays L. kolokalisieren.

GOs (angereichert)	Gene	p-Wert
Chitin Katabolismus (GO:0006032)	2	0,0022
Positive Regulation der DNA Endoreduplikation (GO:0032877)	1	0,0022
Nickelionen-Transport (GO:0015675)	1	0,0034
Zellwand Katabolismus (GO:0016998)	2	0,0043
Antwort auf biotischen Stimulus (GO:0009607)	5	0,0067
Antwort auf symbiotischen Pilz (GO:0009610)	1	0,0067
Oligopeptid-Transport (GO:0006857)	2	0,01
Malat-Transport (GO:0015743)	1	0,0112
Diterpen Phytoalexin-Vorläufer Biosynthese (GO:0051504)	1	0,0112
Syncytium-Bildung (GO:0006949)	1	0,0123
Pollen Spermazellendifferenzierung (GO:0048235)	1	0,0123
ATP Synthesis gekoppelter Protonentransport (GO:0015986)	2	0,0157
Zellwandauflockerung (GO:0009828)	1	0,0167
Lichtabhängiger Blühzeitpunkt (GO:0048574)	1	0,0167
Mitochondrieller Elektronentransport, NADH t...(GO:0006120)	1	0,0178
Glutathion Metabolismus (GO:0006749)	1	0,0278

Signifikant ($p < 0,01$) angereicherte GOs (BP) innerhalb der Gene die signifikant ($p < 0,01$) mit MPH vom Korntrag korrelieren und die in Regionen des Genoms mit statistisch erhöhter Anzahl korrelierter Gene lokalisiert sind. Desweiteren ist die Anzahl der signifikant korrelierten und kolokalisierten Gene gezeigt innerhalb dieser angereicherten biologischen Prozesse (Gene). Außerdem ist der p-Wert (weight) der Anreicherungsanalyse angegeben.

3 Ergebnisse

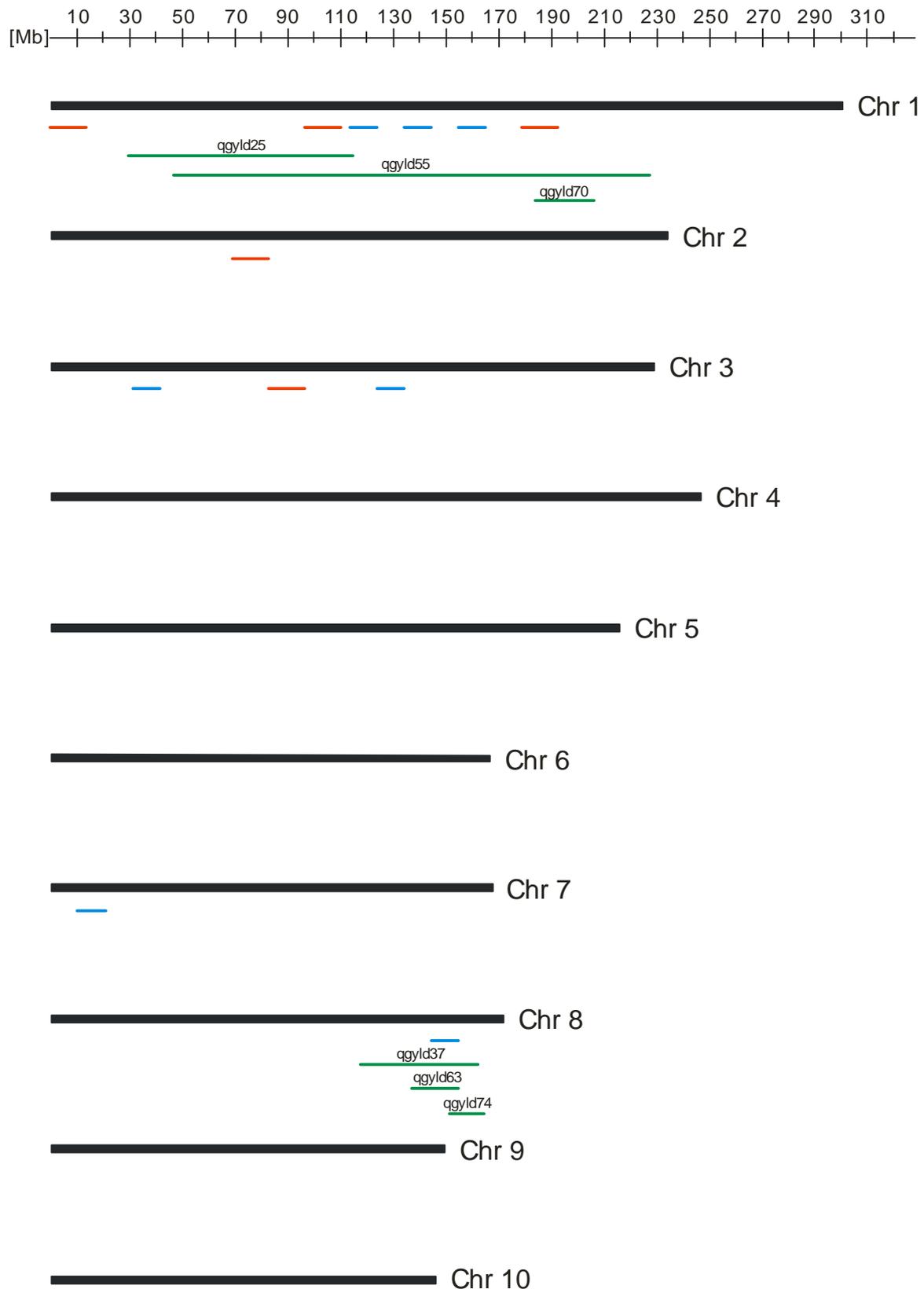


Abb.22: Regionen im Genom von Mais mit erhöhter Gendichte an Heterosis bzw. Hybridleistung von Kornertag korrelierter Gene.

Darstellung des Genoms von Mais (B73) mit seinen 10 Chromosomen im korrekten Maßstab. Unterhalb der Chromosomen sind in Form blauer bzw. roter Linien, die Regionen bzw. Genomfragmente dargestellt, in denen mindestens die doppelte Anzahl allein MPH (rot) bzw. Hybridleistung (blau) von Kornertag korrelierter Gene lokalisiert waren, als statistisch zu erwarten gewesen wäre. Ebenfalls dargestellt sind die QTLs aus der MaizeQTL-Datenbank, die mit den Fragmenten kolokalisierten (grün).

3.7 Vergleichende Expressionsanalysen von Inzuchteltern und ihren Hybriden

Das 1k-Mikroarray diente der vergleichenden Expressionsanalyse ausgewählter Gene in einigen Inzuchtlinien und deren jeweiligen Hybriden. Für das 1k-Mikroarray wurden die Oligos der jeweils 200 am signifikantesten mit der Hybridleistung von Kornertag bzw. der Korntrockenmasse korrelierten Gene ausgewählt. Hinzu kamen die Oligos der 197 am stärksten MPH von Kornertag korrelierten Gene. Zusätzlich wurden Oligos der Gene verwendet, die funktionell mit den sechs am signifikantesten angereicherten biologischen Prozessen der Hybridleistung von Kornertag assoziiert waren. Zu diesen 205 Genen zählten nicht nur die signifikant korrelierten Gene, sondern alle auf dem 46k-Array annotierten Gene, die diesen biologischen Prozessen angehörten. Zu diesen biologischen Prozessen gehörten die Initiation der DNA Replikation (GO:0006270), der Katabolismus von Phospholipiden (GO:0009395), die Entgiftung stickstoffhaltiger Verbindungen (GO:0051410), die Cystein Biosynthese aus Serin (GO:0006535), der Cyanid Metabolismus (GO:0019499) und die Antwort der Pflanze auf Trockenheit (GO:0009269).

In Abbildung 23 ist die Zugehörigkeit der Gene des 1k-Arrays zu den jeweiligen Korrelationsgruppen in einem Venn Diagramm dargestellt. Durch die Überschneidung der einzelnen Gengruppen, also der Zugehörigkeit eines Gens zu möglicherweise zwei oder allen drei Korrelationsgruppen und/oder den Genen der sechs angereicherten biologischen Prozesse, ist die Genanzahl der jeweiligen Korrelationsgruppen größer als die im Voraus ausgewählten 200 bzw. 197 Gene. So waren insgesamt 378 Gene auf dem 1k-Array signifikant ($p < 0,01$) mit der Hybridleistung von Kornertag, 345 Gene mit der MPH von Kornertag und 200 Gene mit der Hybridleistung der Korntrockenmasse korreliert.

Das 1k-Array wurde so entworfen, dass die Oligonukleotide in 4 Blöcken mit je 20x20 Spots aufgetragen wurden. Ein Block war so aufgebaut, dass die Spots in den Reihen 1-10 jedes Blockes sich in den Reihen 11-20 wiederholten. Zudem waren in jedem Block zweimal sechs Kontroll-Oligonukleotide gespottet, um eine möglichst flächendeckende Präsenz der Kontrollen zu gewährleisten. In Abbildung 23 ist ein Block des 1k-Mikroarrays nach Hybridisierung mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sonden dargestellt.

Für die Analyse wurden Inzuchtlinien verwendet, deren Hybride einen besonders starken, einen mittleren bzw. einen besonders schwachen Heterosiseffekt beim Kornertag zeigten. Zu den Hybriden mit einem starken Heterosiseffekt zählten P033xF047 (65,12 Mg/ha), P048xF047 (62,99 Mg/ha) und P024xF039 (57,35 Mg/ha). Die Hybride mit einer besonders

schwachen Heterosis waren S036xL024 (42,58 Mg/ha), S028xL024 (42,88 Mg/ha) und S028xF012 (47,71 Mg/ha). Die mit einer mittleren Heterosis waren S028xF039 (51,64 Mg/ha) und P024xF012 (54,07 Mg/ha). Hinzu kam ein Vergleich zwischen den Linien F012 und F039, zweier Linien aus der gleichen heterotischen Gruppe, den sog. Hartmaislinien. Außerdem wurden Inzuchtlinien in die Untersuchung einbezogen, die aus zwei anderen faktoriellen Kreuzungsexperimenten der Universität Hohenheim stammten und nicht bei der 46k-Array Analyse zur Identifizierung der Hybridmerkmal korrelierten Gene verwendet wurden. Mittels dieser neuen Inzuchtlinien sollte die Frage geklärt werden, ob die Korrelation der Hybridmerkmal assoziierten Gene aus den 46k-Experimenten auch in anderen Inzuchtlinien und deren Hybriden beobachtet werden konnte. Zu den neuen Inzuchtlinien zählten F012 und P024 und deren Hybride F012xP024, P024xF039 und S028xF012 aus den faktoriellen Feldexperiment 2 bzw. 3 der Universität Hohenheim (Schrag *et al.* 2006).

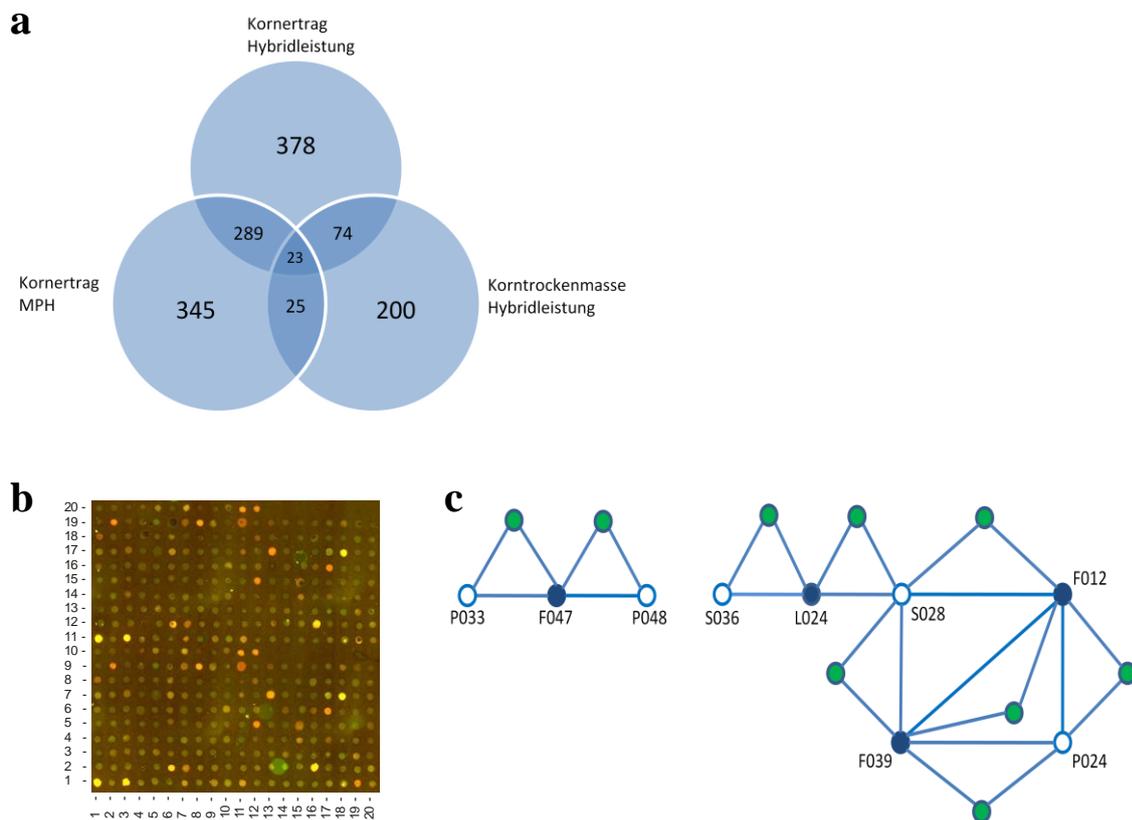


Abb.23: Design und Hybridisierungsschema des 1k-Mikroarrays.

a) Das Venn-Diagramm gibt die Anzahl der Gene vom 1k-Array wieder, dessen mittlere parentale Expressionen mit einem der drei untersuchten Hybridmerkmale signifikant korrelierten ($p < 0,01$). Die Gene, die nicht mit einem der Hybridmerkmale korrelierten, aber einem angereicherten biologischem Prozess angehörten, sowie positive und negative Kontrollgene sind in diesem Diagramm nicht berücksichtigt.

b) Gezeigt ist ein Block des 1k-Arrays nach der Hybridisierung mit Farbstoff markierten aRNA-Populationen zweier Inzuchtlinien. Die Ausmaße des Blocks betragen 20x20 Spots mit einer Wiederholung in den Reihen 11-20.

c) Hybridisierungsschema des 1k-Arrays. Die Linien, welche die Kreise verbinden stehen für die einzelnen Hybridisierungen. Die weißen Kreise kennzeichnen die Inzuchtlinien der Zahnformen (Dent), die blauen Kreise die der Hartmaisformen (Flint) und die grünen Kreise stehen für die Hybride. Das Schema wurde insgesamt anhand der biologischen Replikate viermal durchgeführt, mit jeweils alternierender Farbstoffmarkierung der aRNAs.

Die Hybridisierungen wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit 4 biologischen Replikaten jedes Genotyps und einem Wechsel der Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 und Cy5 durchgeführt. Insgesamt wurden 108 Hybridisierungen gemäß dem Hybridisierungsschema in Abbildung 23 durchgeführt.

Für die Validierung der Mikroarrayergebnisse wurden mittels eines F-Tests differentielle Genexpressionen zwischen den untersuchten Inzuchtlinien identifiziert. Ein Vergleich der Tendenzen aller auf dem 1k-Array parental differentiell ($p < 0,01$) exprimierten Gene, mit den Expressionen des 46k-Arrays der Inzuchtlinien P033, F047, P048, S036, L024, S028 und F039 wurde durchgeführt. Das Ergebnis war, dass insgesamt bei 246 direkten Inzuchtlinienvergleichen eine differentielle ($p < 0,01$) Genexpression auf dem 1k-Array identifiziert werden konnte. Davon zeigten 227 die gleiche und nur 19 eine unterschiedliche Expressionstendenz auf dem 46k-Array. Dies entsprach einer Übereinstimmung von 92,3%.

3.7.1 Identifizierung einer überwiegend additiven Expression der Hybridmerkmal korrelierten Gene

Zur Untersuchung der Frage nach der Hybridexpression der Hybridmerkmal korrelierten Gene wurden T-Tests ($p < 0,05$) durchgeführt, in denen die Hybridexpressionslevel der vier biologischen Replikate mit den mittleren Expressionsleveln der vier biologischen Replikate der Inzuchteltern verglichen wurden. Diese Analyse wurde mit Genen durchgeführt, die entweder differentiell zwischen den Eltern oder andererseits differentiell zwischen den Eltern und/oder einem Elter und dem Hybriden exprimiert waren. Zur Identifikation der differentiell exprimierten Gene wurden T-Tests ($p < 0,05$) zwischen den Expressionsleveln der 4 biologischen Replikate der Eltern bzw. der Eltern und deren Hybriden durchgeführt. Von den insgesamt 558 Genen des 1k-Arrays, deren mittlere parentale Expression der 46k-Arrays mit einem der Hybridmerkmale korreliert waren, wiesen 387 Gene eine differentielle Expression auf dem 1k-Array zwischen den Inzuchteltern und/oder dem Hybriden in mindestens einem Vergleich auf. Das entspricht 69,4% aller 558 Hybridmerkmal korrelierten Gene, seien es solche korreliert mit der Hybridleistung von Korntrag bzw. der Korntrockenmasse oder Heterosis von Korntrag. Von diesen 387 Genen waren 60,7% (235 Gene) differentiell zwischen den Eltern in mindestens einem Vergleich exprimiert. Signifikante Unterschiede in der Anzahl differentiell exprimierter Gene zwischen den einzelnen Gruppen Hybridmerkmal korrelierter Gene wurden nicht beobachtet. So schwankte der prozentuale Anteil an differentiell exprimierten Genen zwischen 68% bei den mit Hybridleistung von Korntrag korrelierten

Genen und 71,5% bei den mit der Hybridleistung der Kornrockenmasse korrelierten Genen. Bei der alleinigen Betrachtung der einzelnen Inzuchtlinienpaare und ihrer Hybride betrug der durchschnittliche Anteil parental differentiell exprimierter Gene 9,1% und der durchschnittliche Anteil aller differentiell exprimierten Gene, also der parentalen und der der Hybride, 18,4%. Diese Beobachtung zeigte, dass ca. die Hälfte aller differentiell exprimierten Gene allein auf Unterschieden in der Expression zwischen den Eltern und ihren Hybriden zurückzuführen waren. Es konnte weder ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl differentiell exprimierter Gene und der genetischen Distanz der Inzuchtlinien hergestellt werden, noch ein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl differentiell exprimierter Gene zwischen den alten (Exp1) und den neuen (Exp2+3) Inzuchtlinienpaaren beobachtet werden. Dennoch schwankte die Anzahl differentiell exprimierter Gene zwischen den einzelnen Inzuchtlinienvergleichen erheblich wie in Abbildung 24 dargestellt. So betrug der Anteil aller differentiell exprimierten Gene im Inzuchtlinienvergleich S028xF012 und ihrem Hybriden 10,7% und bei S028xF039 und ihrem Hybriden 27,6%. Ebenfalls konnte keine Korrelation zwischen der Anzahl differentiell exprimierter Gene und der Höhe von Heterosis beobachtet werden.

Die Untersuchung der Genexpression im Hybriden im Vergleich zu seinen Inzuchteltern wurde, wie bereits erwähnt, mittels eines zweiseitigen, gepaarten T-Tests ($p < 0,05$) zwischen den mittleren parental Genexpressionen und den Expressionen im Hybriden aller vier biologischer Replikate durchgeführt. Eine Hybridexpression, die signifikant vom Mittel der elterlichen Genexpression abwich, wurde als nicht-additiv, eine die mit ihr übereinstimmte, als additiv bezeichnet.

Das Ergebnis war, dass 14,7% aller Hybridmerkmal korrelierten Gene und damit 21,2% aller differentiell exprimierten Hybridmerkmal korrelierten Gene in mindestens einem Inzuchteltern-Hybrid Vergleich, eine nicht-additive Expression aufwiesen. Dabei muss erwähnt werden, dass von den insgesamt 82 nicht-additiv exprimierten Genen nur 14 Gene eine nicht-additive Genexpression in mehr als einem Hybriden zeigten; die restlichen 68 Gene zeigten eine vom Mittel abweichende Expression in nur einem der neun Hybride. Von diesen 14 nicht-additiv exprimierten Genen waren 13 Gene noch in einem weiteren Hybriden nicht-additiv exprimiert und nur ein Gen war in drei der insgesamt neun Hybride vom elterlichen Mittel differentiell exprimiert. Bei alleiniger Betrachtung der einzelnen Inzucht-Hybridvergleiche lag der Anteil an nicht-additiv exprimierten aller differentiell exprimierten Gene zwischen 4,3% (F012xP024) und 19,4% (P024xF039). Der durchschnittliche Anteil nicht-additiv exprimierter Gene betrug 13,4% (Abb.24).

In der bisherigen Betrachtung wurden ausnahmslos alle Genexpressionsvergleiche berücksichtigt, unabhängig davon, ob die Genexpression der Eltern differentiell exprimiert war oder nicht. Da die Hybridmerkmal korrelierten Gene aber ursprünglich auf Basis einer differentiellen Expression zwischen den Eltern ausgewählt wurden, wurden im Anschluss ausschließlich die Hybridexpressionen betrachtet, bei denen die Eltern ebenfalls differentiell exprimiert waren. Dabei war der Anteil, der in mindestens einem Inzuchtlinien-Hybrid-Vergleich nicht-additiv exprimierten Gene geringer und betrug nur 8,9%. Dabei war jedes dieser Gene jeweils nur in einem der 9 Hybride differentiell exprimiert. In den Hybriden S028xF012, F012xP024 und F047xP048 konnten keine nicht-additiv exprimierten Gene beobachtet werden und über alle Hybridvergleiche gemittelt zeigten nur 5,8% der parental differentiellen Genexpressionen ein nicht-additives Expressionsmuster (Abb.24).

Die allein MPH korrelierten Gene für Kornertrag zeigten bei alleiniger Betrachtung eine ganz ähnliche Verteilung additiv und nicht-additiv exprimierter Gene. Hier betrug der Anteil nicht-additiver Gene aller MPH korrelierten, differentiell exprimierten Gene 19,5% und aller parental differentiell exprimierten Gene 8,4%. Jedoch war auch hier der Großteil dieser nicht-additiven Gene meist nur in einem Hybriden nicht-additiv exprimiert.

Zur genaueren Charakterisierung der nicht-additiven Genexpressionen in den Hybriden wurde eine weitere Unterteilung durchgeführt. Die Einteilung der nicht-additiven Hybridexpressionen erfolgte wie von Stupar *et al.* (2008) beschrieben. Die Hybridexpression konnte demnach zwischen den Expressionsniveaus der beiden Inzuchteltern liegen oder im Fall einer dominanten Expression dem Expressionsniveau einer der beiden Eltern entsprechen. Desweiteren konnte die Hybridexpression über der des stärker exprimierten Elters (Überdominant) oder unter der des schwächer exprimierten Elters (Unterdominant) liegen. Dominante Expressionen, bei der die Hybridexpression einem der beiden Eltern gleich, wurden mittels eines zweiseitigen gepaarten T-Tests identifiziert und diesen zugeordnet wenn kein signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied bestand. Anschließend wurden die Expressionsprofile identifiziert die signifikant (einseitiger, gepaarter T-Test $p < 0,05$) überdominant bzw. unterdominant waren. Die übrigen Hybrid-Expressionsmuster fielen in die Kategorie der zwischen dem elterlichen Expressionsniveau liegenden Expressionen.

Von den insgesamt 97 beobachteten nicht-additiven Hybridexpressionen der differentiell exprimierten Hybridmerkmal korrelierten Gene, zeigten 27,8% eine dominante Expression, die dem des höher exprimierten Elter und 37,1% die dem des schwächer exprimierten Elter entsprachen. 11,3% der nicht-additiven Hybridexpressionen waren überdominant und 20,6%

unterdominant exprimiert. Nur 3,1% der nicht-additiven Hybridexpressionsmuster lagen zwischen den Eltern (Abb.24c).

Bei der alleinigen Betrachtung der Expressionsvergleiche mit einer differentiellen, parentalen Expression, glichen 42,9% der dominanten Expressionen im Hybriden dem stärker exprimierten Elter und 33,3% dem schwächer exprimierten Elter. Die über- bzw. unterdominanten Hybridexpressionen, aller nicht-additiven Hybridexpressionen betrug jeweils nur 4,8%. Stattdessen betrug der Anteil der nicht-additiven Hybridexpressionslevel zwischen den Eltern nun 14,3% (Abb.24f).

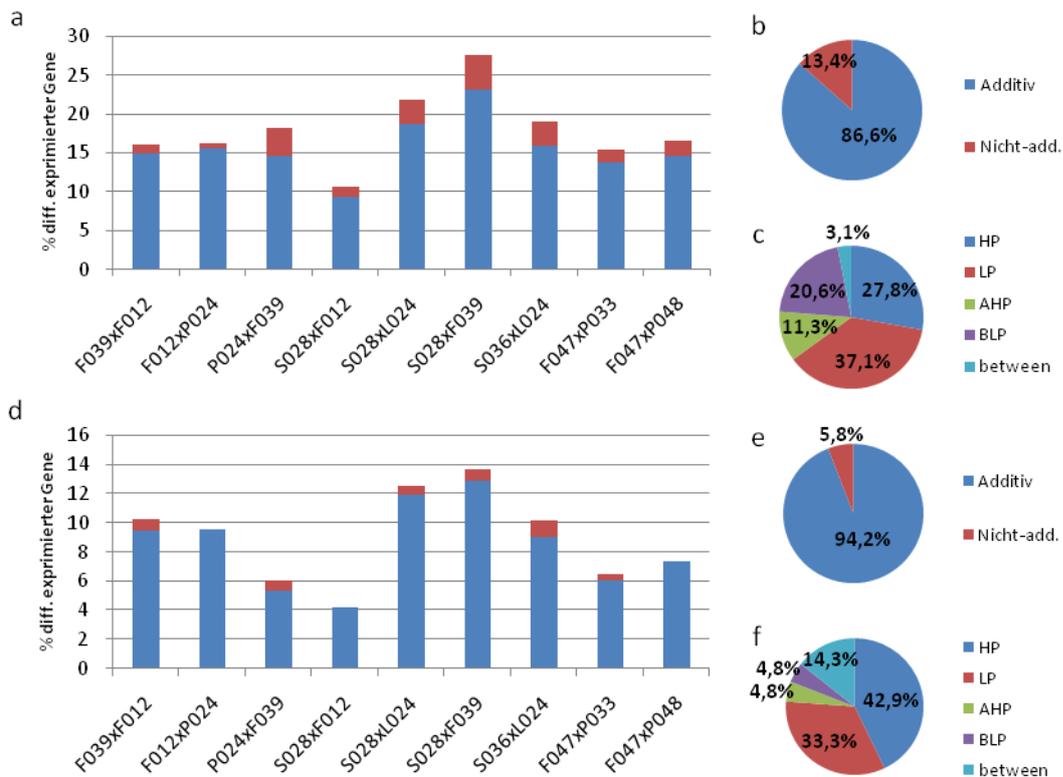


Abb.24: Verteilung additiv und nicht-additiv exprimierter Gene in Hybriden.

Die Diagramme (a) und (d) zeigen den prozentualen Anteil der differentiell exprimierten Gene innerhalb der Gruppe der Hybridmerkmal (HL Kornertrag, HL Korntrockenmasse, MPH Kornertrag) korrelierten Gene. Dabei wird zwischen der Gesamtheit der differentiell exprimierten Gene (a) und den ausschließlich parental differentiell exprimierten Genen (d) unterschieden. Die Diagramme (a) und (d) geben ebenfalls Auskunft über den Anteil additiv (**blau**) und nicht-additiv (**rot**) exprimierter Gene. Der Anteil nicht-additiv und additiv exprimierter Gene, Hybridmerkmal korrelierten, differentiell exprimierten Gene ist in Diagramm (b) und der Anteil aller parental differentiell exprimierten Gene in Diagramm (e) dargestellt. Die Diagramme (c) und (f) zeigen die jeweiligen Anteile verschiedener nicht-additiver Genexpressionsmuster. **HP**: Hybridexpression gleich dem stärker exprimierenden Elter; **LP**: Hybridexpression gleich dem schwächer exprimierenden Elter; **AHP**: Hybridexpression höher als die des stärker exprimierenden Elter; **BLP**: Hybridexpression niedriger als die des schwächer exprimierenden Elter; **between**: Hybridexpression zwischen Eltern.

Als nächstes wurde ein Chi-Quadrat Test durchgeführt, um zu untersuchen, ob die nicht-additiven, MPH korrelierten Gene eine stärkere Korrelation zu Heterosis aufwiesen als die additiv exprimierten Gene. Hierzu wurden alle 241 differentiell exprimierten, MPH korrelier-

ten Gene ($p < 0,01$) des 1k-Arrays in der Reihenfolge ihrer Korrelationsstärke sortiert und entsprechend dieser Reihenfolge in 6 gleich große Gengruppen unterteilt. Bei einer Gesamtzahl von 47 nicht-additiven exprimierten Genen in mindestens einem Hybriden kann man bei einer theoretischen gleichmäßigen Verteilung von 7,83 nicht-additiven Genen pro Gengruppe ausgehen. Der Chi-Quadrat Test zwischen der zu erwartenden Anzahl nicht-additiver Gene und der real beobachteten Anzahl ergab einen p-Wert von 0,71. Das bedeutet, die Verteilung der nicht-additiven Gene war mit großer Wahrscheinlichkeit unabhängig von der Korrelationsstärke zu MPH. Eine Unterteilung der Gene in 4 bzw. 5 Gengruppen ergab ebenfalls eine gleichmäßige Verteilung der nicht-additiven Gene.

3.7.3 Korrelationsanalysen der 1k-Array Expressionsdaten

Als nächstes wurden Korrelationsanalysen zwischen den Expressionsdaten des 1k-Mikroarrays und den drei Hybridmerkmalen, Hybridleistung der Korntrockenmasse und der Hybridleistung und MPH des Kornertrages durchgeführt. Das Ziel war die Beantwortung der Frage, ob die Korrelation bestimmter Gene mit den Hybridmerkmalen, ausgewählt auf der Grundlage der 21 zuvor untersuchten Inzuchtlinien aus Experiment 1, auch in anderen Inzuchtlinienvergleichen beobachtet werden kann. Hierzu wurden in die Expressionsanalysen des 1k-Mikroarrays die Inzuchtlinien F012 und P024 aus den Experimenten 2 und 3 der Universität Hohenheim integriert und die neuen inter-Gruppen Inzuchtlinienpaare F012xP024 (Exp2), P024xF039 (Exp3) und S028xF012 (Exp2) zusammen mit den drei alten Inzuchtlinienpaaren S028xL024, S028xF039 und S036xL024 aus Experiment 1 analysiert und verglichen.

Dabei wurden in getrennten Korrelationsanalysen sowohl erneut die errechneten mittleren parentalen Expressionslevel als auch die tatsächlichen Expressionslevel der Hybride verwendet und deren Ergebnisse, also die Anzahl Hybridmerkmal korrelierter Gene, miteinander verglichen. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der Korrelationsanalysen und die Anzahl der Hybridmerkmal korrelierten Gene aufgeführt.

Tabelle 10: Anzahl der korrelierten Gene zwischen den Felddaten und der mittleren parentalen Genexpression bzw. der realen Hybridexpression

Hybridmerkmal korrelierte Gengruppen (46k-Array)	Berechnete mittlere parentale Expression			Hybridexpression		
	Anzahl korrelierter Gene von Kreuzungen aus Exp1	Anzahl korrelierter Gene von Kreuzungen aus Exp 2+3	Anzahl korrelierter Gene von Kreuzungen aus Exp1 und Exp2+3	Anzahl korrelierter Gene von Kreuzungen aus Exp1	Anzahl korrelierter Gene von Kreuzungen aus Exp 2+3	Anzahl korrelierter Gene von Kreuzungen aus Exp1 und Exp2+3
Hybridleistung Kornertrag	37	36	98	18	26	85
Hybridleistung Korntrockenmasse	25	18	22	17	5	16
MPH Kornertrag	36	49	127	14	13	57
Alle Gengruppen	98	103	247	49	44	158

Korrelationsanalyse zwischen Felddaten der Hybridleistung von Kornertrag, der Korntrockenmasse oder MPH und der mittleren parentalen Expression bzw. der realen Hybridexpression (1k-Array). Angegeben ist die Anzahl der jeweiligen korrelierten Gene.

Ein Vergleich der Anzahl signifikant korrelierter ($p < 0,05$) Gene der Inzuchtlinienpaare aus Exp1 und den neuen Inzuchtlinienpaaren aus den Experimenten 2 und 3 zeigte, dass nahezu kein Unterschied bestand. Die Gesamtheit aller Hybridmerkmal-korrelierten Gene (Kornertrag, Korntrockenmasse, MPH) betrug bei den Korrelationsanalysen mit einer errechneten mittleren parentalen Expression 98 und bei den neuen Inzuchtlinienpaaren 103. Das gleiche galt für Korrelationsanalysen mit den wirklichen Hybridexpressionsdaten und den drei Hybridmerkmalen. Hier betrug die Anzahl signifikant ($p < 0,05$) korrelierter Gene bei den Inzuchtlinienpaaren aus Exp1 49 und bei den neuen Inzuchtlinienvergleichen (Exp2+3) 44 Gene.

Ein Vergleich zwischen den Korrelationsanalysen mittels der errechneten mittleren parentalen Expressionslevel und den realen Hybridexpressionen ergab eine größere Anzahl korrelierter Gene bei Verwendung der mittleren parentalen Expressionen. Hier waren insgesamt 247 Gene korreliert, wohingegen nur 158 Gene signifikant korreliert waren bei einer Analyse, die die realen Hybridexpressionen verwendete. Das entspricht 64% der Menge an Genen im Vergleich zur Korrelation mittels der mittleren parentalen Expressionen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die z.T. beobachtete nicht-additive Expression im Hybriden.

3.8 Untersuchung eines putativen Einflusses des Gene Silencings auf Heterosis

In diesem Teil der Arbeit ging es um die Untersuchung möglicher Einflüsse auf den Heterosiseffekt durch kurze RNAs im Zuge des sog. Gene Silencings. Hierzu wurden transgene A188-Maisinzuchtlinien mit einem viralen Gene Silencing Suppressor aus Weizenstrichelmosaikvirus (WSMV) mit der Bezeichnung P1/HC-Pro verwendet. Kreuzungen zwischen den transgenen A188-Linien und nicht transgenen A188 und H99 Linien wurden durchgeführt, um den Einfluss des Suppressors auf den Heterosiseffekt (best parent heterosis, BPH) zwischen den Hybriden und den A188-Inzuchtlinien zu messen.

Die Nucelli aus den Kreuzungen der P1/HC-Pro Maispflanzen mit den Linien H99 bzw. A188 wurden, wie in Material und Methoden (Kapitel 2.2.8.2) beschrieben, einen Tag nach Bestäubung auf Platten ausgelegt. Alle Genotypen wurden zur Hälfte sowohl auf Induktionsmedium (+Dex), als auch auf Dexamethason-freiem Medium (-Dex) angezogen. Nach wenigen Tagen auf dem Medium konnte man mit bloßem Auge das sich entwickelnde Endosperm im Nucellusgewebe erkennen. Durchschnittlich bildeten ca. 54% der ausgelegten Nucelli im Laufe der Zeit ein Endosperm aus (Abb.25). Diese Werte schwankten jedoch z.T. recht stark zwischen den einzelnen Platten verschiedener Kreuzungen (8% - 97%) in Abhängigkeit von der Bestäubungsrate, die wiederum unter Anderem abhängig von der Qualität der verwendeten Pollen war. Von den Nucelli, die ein Endosperm entwickelten, bildeten durchschnittlich ca. 67% nach ungefähr 1 Monat einen Keimling. Unterschiede zwischen den Genotypen bestanden in der Farbgebung des späteren Endosperms, welches bei Genotypen mit einem H99-Anteil gelblich und bei Genotypen mit einem ausschließlichen A188-Hintergrund weißlich erschienen (Abb.25).

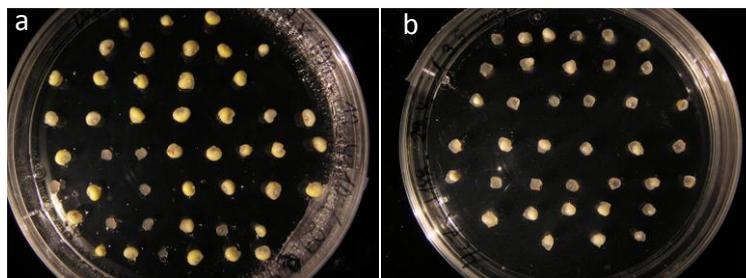


Abb.25: *In vitro*-Kultur der Nucellusgewebe.

Abbildungen der *in vitro* Kulturplatten mit den isolierten Nucellusgeweben. Das sich entwickelnde Endosperm ist in einigen Nucelli deutlich erkennbar. **a:** P1/HC-Pro x H99 (15 dap). **b:** P1/HC-Pro x A188 (12 dap). dap: Tage nach Bestäubung.

Zwei Tage nach dem Auskeimen des Embryos wurde das Pflanzengewebe in Weck-Gläser mit Standard-MS-Medium (mit Dexamethason bzw. ohne Dexamethason) überführt und nach

6 Tagen die Wachstumsmessungen wie in Material und Methoden (Kapitel 2.2.8.2) beschrieben, durchgeführt (Abb.26).

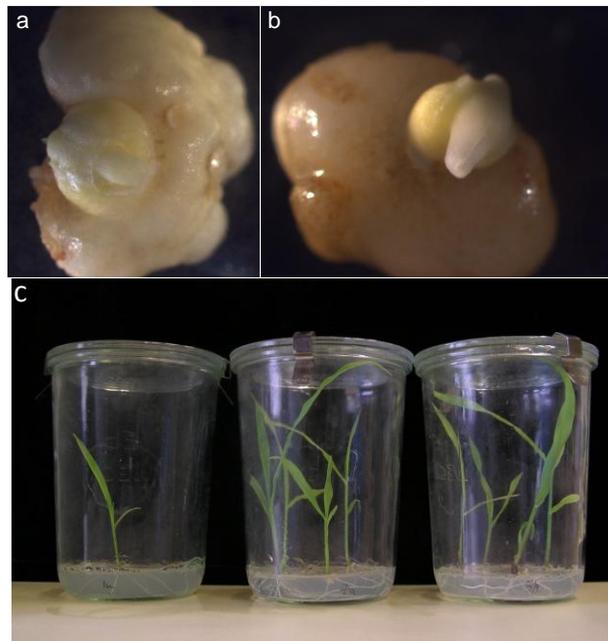


Abb.26: Auskeimende Embryonen und Maiskeimlinge der *in vitro*-Kultur.

Bilder der Nucellus-Kulturen zwei Tage nach Auskeimen der Embryonen. **a:** P1/HC-Pro x A188 (29 dap) **b:** P1/HC-Pro x A188 (25 dap). **c:** Bilder der Maiskeimlinge (H99 x P1/HC-Pro) 15 Tage nach Auskeimen der Embryonen. dap: Tage nach Bestäubung.

Zur eindeutigen Identifizierung der Genotypen wurde nach der Bestimmung der Wachstumsraten eine Gus-Färbung an Blattmaterial durchgeführt. Da die für die Kreuzungen verwendeten transgenen P1/HC-Pro-Pflanzen hemizygot waren, also das Transgen nur mit einem Allel im Genom vertreten war, spaltete sich die erste Filialgeneration in einem Verhältnis von 1:1 auf. 50% der gemessenen Pflanzen waren somit nicht transgen und wurden als negativ Kontrollpflanzen verwendet. Bilder dieser Gus-Färbungen sind in Abbildung 27 zu sehen und zeigen Blattmaterial, welches nach der Färbung blau im Falle der transgenen Pflanzen bzw. nicht blau im Falle der nicht transgenen Pflanzen gefärbt war. Transgene Pflanzen, welche auf Medium ohne Dexamethason gewachsen sind wurden ebenfalls durch eine Gus-Färbung identifiziert, indem vor der eigentlichen Gus-Färbung mit X-Gluc-Lösung das Blattmaterial über Nacht in einer 20µM Dexamethason-Lösung inkubiert wurde (Kapitel 2.2.8.3). Auch hier war im Falle der transgenen Pflanzen eine klare Identifizierung der transgenen Pflanzen durch eine Blaufärbung möglich (Abb.27d).

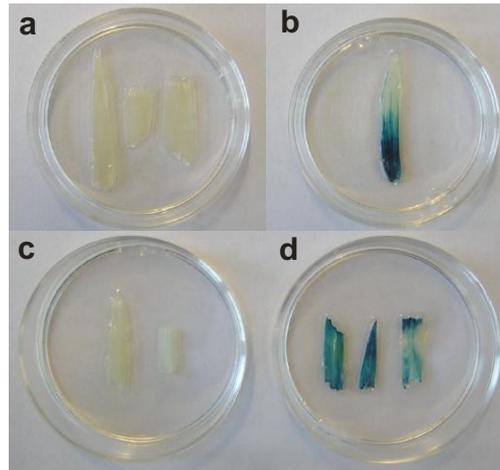


Abb.27: Gus-Färbung mit Blattmaterial von Pflanzen aus der *in vitro*-Kultur.

Blattmaterial wurde von Pflanzen aus der *in vitro*-Kultur über Nacht in X-Gluc-Lösung bei 37°C inkubiert und anschließend mit 70% Ethanol das Chlorophyll der Blätter ausgewaschen. Blattmaterial von Pflanzen, die auf Medium ohne Dexamethason zur Induktion der Transgenexpression wuchsen, wurde vorher in 20µM Dexamethason-Lösung über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine Blaufärbung zeigte die Expression von Gus, als Indikator der Transgen-Expression, an.

a: P1/HC-Pro7 x A188 (+Dex), Gus-negativ **b:** P1/HC-Pro x A188 (+Dex), Gus-positiv **c:** P1/HC-Pro x A188 (-Dex), Gus-negativ **d:** P1/HC-Pro x A188 (-Dex), Gus-positiv.

Die Ergebnisse der Gus-Färbung wurden exemplarisch mittels einer PCR-Analyse bestätigt. In dieser PCR wurden Primer eingesetzt, die erfolgreich einen 855 bp langen Abschnitt des HC-Pro-Anteils des P1/HC-Pro-Konstrukts im Genom der Gus-positiv getesteten Pflanzen amplifizierten (Abb.28; Spalten 1 und 2), während keine Amplifikation in den zuvor Gus-negativ getesteten Pflanzen zu beobachten war (Abb.28; Spalten 3 und 4).



Abb.28: Nachweis der stabilen Integration von P1/HC-Pro in das Genom von Mais.

Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten (Primer: HC-Pro_Fw/HC-Pro_Rv). **Spur 1:** P1/HC-Pro x A188 (+Dex) Gus-positiv; **Spur 2:** P1/HC-Pro x A188 (-Dex) Gus-positiv; **Spur 3:** P1/HC-Pro x A188 (+Dex) Gus-negativ; **Spur 4:** P1/HC-Pro x A188 (-Dex) Gus-neaktiv; **Spur 5:** Wasserkontrolle; **Spur 6:** 1kb DNA Marker

3.8.1 Nachweis der Expression von P1/HC-Pro

Das verwendete *in vitro* Kultursystem wurde aus verschiedenen Gründen etabliert. Es erlaubte die kontrollierte Anzucht einer großen Anzahl von Maiskeimlingen und die sehr frühe Induktion des viralen Suppressors bereits einen Tag nach der Bestäubung. Daher war es wichtig, die Expression des Suppressors in verschiedenen Geweben und bereits so früh wie möglich in der Entwicklung der Pflanzen nachzuweisen. Zum Nachweis der Transkription des P1/HC-Pro-Konstruktes in den stabil transformierten Maispflanzen wurde daher zunächst

Gus-Färbungen mit Nucellusgeweben, 2 und 7 Tage nach Bestäubung durchgeführt. Hierzu wurden Nucelli verwendet, die aus Kreuzungen zwischen einer transgenen paternalen Pflanze und einer nicht transgenen (H99) maternalen Pflanze stammten. Bereits 2 Tage nach Bestäubung konnte ein blau gefärbtes Endosperm unter dem Mikroskop beobachtet werden, was die sehr frühe Expression des Transgens im Nucellusgewebe bewies. Sieben Tage nach der Bestäubung machte das Endosperm bereits einen großen Teil des Gewebes aus und auch hier konnte eine nahezu vollständig, gleichmäßige Färbung des Endosperms beobachtet werden (Abb.29).

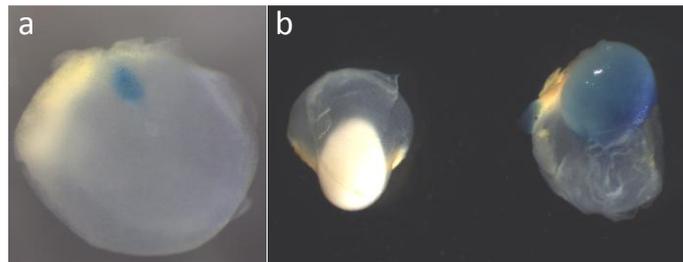


Abb.29: Gus-Färbung von Nucellus-Geweben aus der *in vitro*-Kultur.

a: 2 dap-Nucellus aus H99 x P1/HC-Pro-Kreuzung (+Dex)

b: 7 dap-Nucelli aus H99 x P1/HC-Pro-Kreuzung (+Dex), links: Gus-negativ, rechts: Gus-positiv

dap: Tage nach Bestäubung

Ein weiterer Nachweis zur Expression von P1/HC-Pro beinhaltete die Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen, dessen Wachstumsraten im Weckglas bestimmt und im Anschluss daran mittels Gus-Färbung getestet wurden. Verwendet wurde je eine Gus-positive bzw. Gus-negative, induzierte (+Dex) bzw. nicht-induzierte (-Dex) Pflanze. Nach der RNA-Isolierung wurde die genomische DNA mittels DNaseI verdaut und nach einer gelelektrophoretischen Qualitätskontrolle der Ansatz in einer RT-PCR mit den Primern „HCPro_Fw“ und „HCPro_Rv“ bzw. mit den Primern „P1_Fw“ und P1_Rv“, die einen Abschnitt von HC-Pro bzw. von P1 des Transkriptes amplifizierten, eingesetzt. Parallel wurde Gesamt-RNA jeder Isolation ohne vorherige cDNA-Erstrangsynthese in eine PCR eingesetzt und diente somit als Kontrolle für den erfolgreichen genomischen DNA-Verdau. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und ergaben, dass alle Transkripte vollständig gebildet wurden (Abb.30). Die beobachteten Größen stimmten mit den erwarteten Werten und den Größen der Positivkontrollen (genomische DNA) in allen Fällen überein. So war beim Nachweis des P1/HC-Pro-Transkriptes mittels der Primer „HC-Pro_Fw“ und „HC-Pro_Rv“ ein PCR-Produkt in der korrekten Größe bei der Gus-positiv induzierten Pflanze und ebenfalls ein sehr schwache Bande in der Gus-positiv nicht induzierten Pflanze zu beobachten. Diese

Ergebnisse zeigten, dass die Expression des Konstruktes erfolgreich induzierbar ist, jedoch eine schwache Basisexpression auch ohne Dexamethasoninduktion vorlag.



Abb.30: Nachweis der Dexamethason induzierten Transkription von P1/HC-Pro (PCR 1).

Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten (Primer: „HC-Pro_Fw“ und „HC-Pro_Rv“). Die Ansätze jeder Pflanze wurden in folgender Reihenfolge auf das Gel aufgetragen: **1)** nur PCR ohne cDNA-Synthese; **2)** RT-PCR

Spur 1: 1kb DNA Marker; **Spur 2-3:** P1/HC-Pro x A188 (+Dex) Gus-positiv; **Spur 4-5:** P1/HC-Pro x A188 (-Dex) Gus-positiv; **Spur 6-7:** P1/HC-Pro x A188 (+Dex) Gus-negativ; **Spur 8-9:** P1/HC-Pro x A188 (-Dex) Gus-negativ; **Spur 10:** Wasserkontrolle

Diese Beobachtungen konnten mit den Primern „P1_Fw“ und „P1_Rv“ bestätigt werden (Abb.31). Auch hier war sowohl eine deutlich erkennbare Bande in der korrekten Laufhöhe (886bp) bei der Gus-positiven, induzierten als auch eine sehr viel schwächere Bande bei der Gus-positiven, nicht-induzierten Probe zu beobachten. Dass die PCR-Produkte nicht aus der Amplifikation unvollständig verdauter genomischer DNA resultierten, zeigen die Spuren, wo die Gesamt-RNA nach dem DNaseI-Verdau direkt in die PCR eingesetzt wurde. Diese Spuren wiesen wie erwartet keine PCR-Produkte auf.



Abb.31: Nachweis der Dexamethason induzierten Transkription von P1/HC-Pro (PCR 2).

Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten (Primer: „P1_Fw“ und „P1_Rv“). Die Ansätze jeder Pflanze wurden in folgender Reihenfolge auf das Gel aufgetragen: **1)** nur PCR ohne cDNA-Synthese; **2)** RT-PCR

Spur 1: Wasserkontrolle; **Spur 2-3:** A188 x P1/HC-Pro (+Dex) Gus-positiv; **Spur 4-5:** A188 x P1/HC-Pro (-Dex) Gus-positiv; **Spur 6-7:** A188 x P1/HC-Pro (+Dex) Gus-negativ; **Spur 7:** Wasserkontrolle **Spur 8:** 1kb DNA Marker

3.8.2 Messung der Wachstumsraten und Berechnung von Heterosis

Insgesamt wurden die Wachstumsraten von 8 zu unterscheidenden Pflanzengruppen gemessen, bestehend aus den verschiedenen Genotypen mit jeweils, bezogen auf das Induktionsmedium, unterschiedlichen Anzuchtbedingungen. Insgesamt wurden von 494 Pflanzen die Wachstumsraten ermittelt. 316 dieser Pflanzen erfüllten die Bedingungen die besagen, dass das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression durch die Messpunkte mindestens 0.97 betragen dürfe. Außerdem wurden nur Messwerte verwendet von Pflanzen mit einer Größe von mindestens 3 cm Höhe. Die Bedingungen wurden festgelegt, um sicherzustellen, dass nur Pflanzen mit einem definierbaren, linearen Wachstum in die Analyse mit einfließen. Die

Steigung der linearen Regression entsprach der ermittelten Wachstumsrate. Die Ergebnisse der Wachstumsmessungen sind in der Abb.32 dargestellt. Alle Inzuchtkreuzungen wiesen durchschnittlich ein geringeres Wachstum im Vergleich zu ihren jeweiligen Hybriden auf. Ein ungepaarter, zweiseitiger T-Test zeigte, dass die Unterschiede zwischen den Inzuchtlinien und den Hybriden, bis auf eine Ausnahme, stets signifikant ($p < 0,01$) waren. Bei den transgenen, nicht induzierten Pflanzen war der Unterschied zwischen den Inzuchtlinien und den Hybriden nach dem T-Test nicht signifikant ($p = 0,11$). Der Wert der relativen Heterosis betrug hier nur 1,13. Bei den anderen Genotypen hingegen lag die relative Zunahme der Wachstumsrate zwischen 1,25 und 1,28 (Abb.33). Der geringere Heterosiswert bei den transgenen, nicht induzierten Pflanzen ging auf eine, im Vergleich zu den anderen Hybridgruppen, geringere Wachstumsrate der Hybridpflanzen zurück. Ein ungepaarter, einseitiger T-Test deutete darauf hin, dass die geringere Wachstumsrate der nicht-induzierten transgenen Hybride im Vergleich zu den Hybriden der transgenen, induzierten Pflanzen signifikant ($p = 0,046$) war. Mittels eines ANOVA-Tests mit einer Bonferroni-Holm Korrektur ergab ein Vergleich der Heterosiswerte zwischen den transgenen nicht induzierten und den transgenen induzierten Pflanzen ebenfalls einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$).

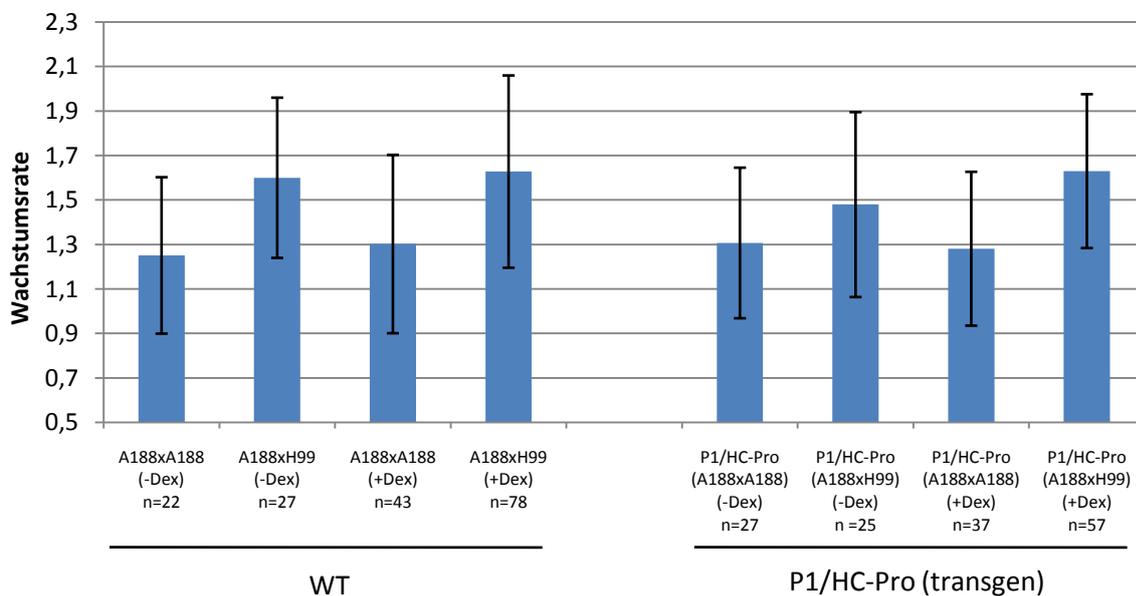


Abb.32: Wachstumsraten der transgenen P1/HC-Pro und nicht transgenen Kreuzungen aus der *in-vitro* Kultur.

Gezeigt sind die Wachstumsraten (Steigung der linearen Regression) mit Standardabweichung der Inzuchtlinien (A188 x A188) und Hybride (A188 x H99) der nicht transgenen Kontrollpflanzen (WT) und der transgenen P1/HC-Pro-Pflanzen. Sowohl bei den Kontrollpflanzen und bei den transgenen Pflanzen wird zusätzlich zwischen den Pflanzen unterschieden die auf dem Induktionsmedium (+Dex) bzw. auf einem Medium ohne Dexamethason (-Dex) angezogen wurden. Zudem ist die Anzahl der jeweils gemessenen Pflanzen angegeben (n).

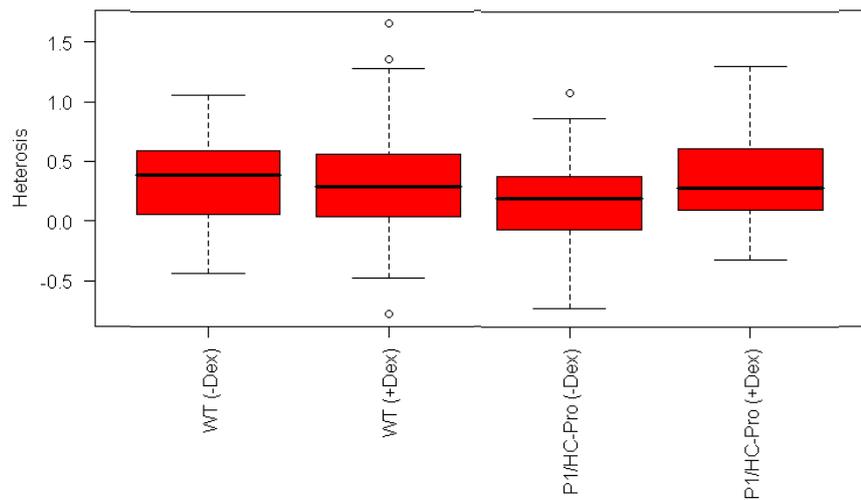


Abb.33: Heterosiswerte der transgenen P1/HC-Pro und nicht transgenen Kontrollpflanzen aus der *in-vitro* Kultur.

Boxplots der Heterosiswerte in Form der Differenzen der Wachstumsraten (Steigung der linearen Regression) zwischen den Hybriden und Inzuchtlinien der einzelnen Pflanzengruppen:

- 1) nicht transgene, nicht Dexamethason induzierte Kontrollpflanzen [WT(-Dex)]
- 2) nicht transgene, Dexamethason induzierte Kontrollpflanzen [WT(+Dex)]
- 3) transgene, nicht Dexamethason induzierte Pflanzen [P1/HC-Pro (-Dex)]
- 4) transgene, Dexamethason induzierte Pflanzen [P1/HC-Pro (+Dex)]

Die horizontalen Linien in den Boxen sind der Median, die Grenzen der Boxen die Quartile, die Enden der gestrichelten Linien die äußersten nicht extremen Werte und die kleinen Kreise die Ausreißerwerte von Heterosis.

4 Diskussion

Heterosis wurde erstmalig von Charles Darwin im Jahre 1876 beschrieben und später durch Shull (1908) und East (1908) wiederentdeckt. Seitdem spielt Heterosis eine bedeutende Rolle im Getreideanbau und trägt so z.B. im Maisanbau zu einem stetig wachsenden Kornertrag bei (Crow 1998). Heterosis zeichnet sich in Hybriden, die aus Kreuzungen zwischen homozygoten Inzuchtlinien entstanden sind, generell durch eine Erhöhung des Kornertrages, einer gesteigerten vegetativen Wachstumsrate, einer verbesserten Adaption gegenüber biotischen und abiotischen Stress, einer schnelleren Reifung und einer Vielzahl anderer wichtiger agrarwirtschaftlicher Merkmale aus (Guo *et al.* 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurden differentiell exprimierte Gene aus 7 Tage alten Maiskeimlingen, heterotischer Inzuchtlinien identifiziert, welche erfolgreich in die Vorhersage von Heterosis integriert werden konnten (Frisch *et al.* 2010). Für die Charakterisierung der drei untersuchten Hybridmerkmale wurden Gene auf der Basis der mittleren Expressionsniveaus beider Eltern identifiziert. Ein solch „additives“ mittleres Expressionsniveau weisen grundsätzlich Gene in Hybriden mit einer rein *cis*-regulierten Expression auf (Wittkopp *et al.* 2004). Mittels weiterer Mikroarrayanalysen konnte dieses additive Expressionsverhalten für den Großteil der Hybridmerkmal korrelierten Gene in insgesamt 9 Hybriden bestätigt werden. Die mittleren Expressionsniveaus der korrelierten Gene aus den Keimlingen standen in einem linearen Verhältnis zu den jeweiligen Hybridmerkmalen und konnten dementsprechend zur Identifikation einer Vielzahl potentiell Hybridmerkmal assoziierter biologischer Prozesse verwendet werden. Desweiteren konnten genomische Bereiche mit erhöhter Dichte an korrelierten Genen, *in silico* identifiziert und mit Kornertrag- bzw. heterotischen QTLs kolokalisiert werden. Expressionsanalysen mit Inzuchtlinien aus anderen faktoriellen Kreuzungsexperimenten ließen darauf schließen, dass die korrelierten Gene unabhängig vom Genotyp mit den Hybridmerkmalen assoziiert waren. In einem weiteren Versuch konnte anhand des viralen Gene Silencing Suppressors P1/HC-Pro ein Zusammenhang zwischen Heterosis und der Funktion kurzer RNAs hergestellt werden.

4.1 Transkriptomdaten zur Entwicklung von Vorhersagemodellen

In der Maiszüchtung stellt die Auswahl der Inzuchtlinien für die Hybriderzeugung den Züchter vor ein großes Problem. Aufgrund der Vielzahl an verfügbaren Inzuchtlinien

verschiedener heterotischer Gruppen ist das Testen aller möglichen Kreuzungen auf dem Feld nicht durchführbar. Die molekulare Vorhersage der Hybridleistung bzw. des Heterosis-Effektes könnte jedoch dem Züchter bei der Auswahl geeigneter Kreuzungspartner helfen und somit kostenintensive Feldversuche in Zukunft minimieren. In Mais wurden bereits einige Vorhersagemodelle entwickelt, so z.B. solche, die sowohl Verwandtschaftsverhältnisse wie auch phänotypische Merkmale und DNA-Marker mit in die Vorhersage einbeziehen (Vuylsteke *et al.* 2000, Schrag *et al.* 2006, 2007, 2009). Jedoch trotz der bisher geleisteten Anstrengungen ist die Zuverlässigkeit solcher Vorhersagemodelle bei weitem nicht optimal. Die Weiterentwicklung und die Entwicklung neuer Vorhersagemodelle ist daher notwendig, um in Zukunft zu einer Verbesserung der Züchtungsprogramme beitragen zu können.

Bisherige Arbeiten lassen vermuten, dass Heterosis ein komplexes Phänomen ist, an dem verschiedenste genetische Mechanismen wie Dominanz, Überdominanz und Epistasie, beteiligt sind (Birchler *et al.* 2003). Diese genetischen Mechanismen sind allem Anschein nach an der Regulation von genetischen Netzwerken beteiligt. In der Vergangenheit haben sich mehrere Arbeiten mit der Expression differentiell exprimierter Gene in Hybriden und Inzuchtlinien beschäftigt (zur Übersicht: Hochholdinger und Hoecker 2007). Die Unterschiede in der Expression bestimmter Gene sind höchstwahrscheinlich an der phänotypischen Variation sowie am Heterosis-Effekt beteiligt (Song und Messing 2003, Guo *et al.* 2004; Springer und Stupar 2007). Diese Annahme wird durch eine Arbeit von Guo *et al.* (2006) bestätigt, in der eine positive Korrelation zwischen dem Anteil differentiell exprimierter Gene zwischen den Elternlinien und Heterosis von Kornertag in Mais beobachtet werden konnte. Eine Untersuchung des Transkriptom von Inzuchtlinien, welche durch die jeweilige genomische Konstitution der Linien beeinflusst wird, könnte somit zur Vorhersage und Charakterisierung von Heterosis in Hybriden Verwendung finden.

Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Bereitstellung von Transkriptomdaten für die Entwicklung statistischer Methoden zur zuverlässigen Vorhersage von Heterosis, um eine Steigerung der Effizienz, eine Beschleunigung in der Züchtung und eine Senkung der Ausgaben für Züchter zu erreichen. Hierfür wurden zunächst 21 verschiedene Inzuchtlinien zweier heterotischer Gruppen (14 Hartmaislinien und 7 Zahnmaislinien) ausgewählt und Keimlinge dieser Inzuchtlinien für 7 Tage unter kontrollierten Bedingungen angezogen. Die Verwendung von jungen Keimlingen ermöglicht dem Züchter ein schnelles und kostengünstiges Testen vieler verschiedener Inzuchtlinien unter reproduzierbaren Bedingungen. Die Modelle zur Vorhersage der Hybridleistung bzw. von Heterosis des Kornertags, basierend auf den Genexpressionsdaten der 21 Inzuchtlinien des faktoriellen Kreuzungsexperiments 1 der Universität

Hohenheim aus dieser Arbeit, wurden von Prof. Dr. Matthias Frisch entwickelt und sind bereits veröffentlicht (Frisch *et al.* 2010). Im Gegensatz zu der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Charakterisierung der Hybridmerkmale wurden für die Heterosis-Vorhersage die Distanzen der Inzuchtlinien, basierend auf den differentiellen Expressionen einzelner Kornertrag assoziierter Gene, berechnet. Die so ermittelten Transkriptom basierten Distanzen wurden mit genomischen Distanzen von Schrag *et al.* (2006), welche auf AFLP-Markern basierten, verglichen.

Eine Hauptkomponentenanalyse ergab, dass beide Distanzen dazu in der Lage waren die Inzuchtlinien gemäß ihrer heterotischen Gruppenzugehörigkeit zu unterteilen (Frisch *et al.* 2010). Dieses Ergebnis zeigt, dass die genomweiten Transkriptionsprofile der einzelnen Inzuchtlinien sich aufgrund ihrer verwandtschaftlichen Herkunft voneinander unterscheiden, was eine Voraussetzung für die Ausbildung von Heterosis im Hybriden darstellt.

Zudem konnten Frisch *et al.* (2010) im Gegensatz zu den DNA Marker-basierten Distanzen, bei den Transkriptom basierten Distanzen eine signifikante Korrelation mit Heterosis bzw. der Hybridleistung von Kornertrag feststellen.

Die Vorhersage der Hybridleistung bzw. von Heterosis von Kornertrag wurde mittels einer linearen Regression durchgeführt. Ein Vergleich der Vorhersagekraft der Transkriptom-basierten Distanzen mit der Vorhersagekraft der Marker basierten Distanzen und der auf Feldversuchen basierenden allgemeinen Kombinationseignung (GCA) ergab bei den Transkriptom basierten Distanzen eine deutlich höhere Korrelation zwischen den vorhergesagten und den real gemessenen Werten der Hybridleistung bzw. der mittleren parental Heterosis vom Kornertrag (Frisch *et al.* 2010).

Die Assoziation zwischen der Expression ausgewählter Gene aus parental Maiskeimlingen und einem Hybridmerkmal wie dem Ertrag konnte ebenfalls in einer Arbeit von Stokes *et al.* (2010) gezeigt werden. In ihren Versuchen führten sie unter anderem Kreuzungen zwischen einer maternalen und 20 verschiedenen paternalen Inzuchtlinien durch. Mittels linearer Regression wurde das Verhältnis zwischen der parental Expression von 14 Tage alten Keimlingen und Heterosis bzw. dem Ertrag ermittelt. Insgesamt 185 Gene in Mais waren hoch signifikant ($p < 10^{-5}$) korreliert und wurden erfolgreich in einer Vorhersage von Heterosis bzw. vom Ertrag verwendet.

Die Übertragbarkeit eines Vorhersagemodells auf andere Inzuchtlinienvergleiche ist für Züchtungsprogramme von entscheidender Bedeutung. Dabei sollte die Expression der verwendeten Gene idealerweise, unabhängig vom Genotyp oder Kreuzungsexperiment, mit

der Hybridleistung bzw. Heterosis korreliert sein. Dass die Expressionsdaten einiger Inzuchtlinien zur Hybrid-Vorhersage anderer Inzuchtlinienvergleiche innerhalb eines faktoriellen Kreuzungsexperiments (Exp1) genutzt werden können, konnten Frisch *et al.* (2010) anhand der Durchführung einer Kreuzvalidierung bereits zeigen. Bei dieser Kreuzvalidierung wurden zufällig ausgewählte Inzuchtlinienpaare zur Vorhersage der Hybridleistung anderer Inzuchtlinienpaare eines Kreuzungsschemas verwendet und dieser Schritt hundertmal wiederholt. Dass dabei die Varianz der Vorhersageergebnisse geringer ausfiel als bei der Vorhersage durch GCA oder DNA Marker-basierte Distanzen lässt darauf schließen, dass die Genauigkeit der einzelnen Vorhersagen, innerhalb der Kreuzvalidierung, relativ unabhängig von den untersuchten Inzuchtlinien ausfiel.

In den Vorhersagen von Stokes *et al.* (2010) konnte ebenfalls eine Übertragbarkeit der Marker-Gene auf andere Linien beobachtet werden. Jedoch wurden hierbei im Gegensatz zu Frisch *et al.* (2010) stets Hybride mit ein und denselben maternalen Elter untersucht. Dieser Umstand kann möglicherweise aufgrund der teilweisen Vererbung der Expressionsprofile durch das mütterliche Genom zu einer Verbesserung der Vorhersageeffizienz beigetragen haben.

Die Frage inwieweit die Vorhersage anhand der Expressionsdaten der 21 Inzuchtlinien auf andere faktorielle Kreuzungsexperimente mit unterschiedlichen Inzuchtlinien übertragbar ist, wurde somit bisher noch nicht beantwortet. Um dies zu untersuchen wurde in der vorliegenden Arbeit eine Auswahl der anhand der 21 Inzuchtlinien identifizierten Hybridmerkmal korrelierten Gene auf ihre Korrelation in Inzuchtlinienpaaren anderer faktorieller Feldexperimente (Exp2, 3) hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl der auf der Basis der 21 Inzuchtlinien aus Exp1 identifizierten Hybridmerkmal korrelierten Gene der Anzahl korrelierter Gene aus den Experimenten 2 und 3 entsprach (Kapitel 3.7.3, Tab.10). Dies deutet auf eine Rolle dieser Gene nicht nur in Inzuchtlinien eines einzelnen Kreuzungsexperimentes hin sondern auf eine allgemeine Bedeutung für das jeweilige Hybridmerkmal.

Ein zukünftiges Ziel der Transkriptom basierten Vorhersage von Heterosis ist es, einen definierten, festgelegten Satz von Genen zu etablieren, mit dessen Hilfe eine Vorhersage in verwandtschaftlich unterschiedlichen Inzuchtlinien ermöglicht wird. Die Vorhersagemodelle von Frisch *et al.* (2010) deuten darauf hin, dass die optimale Anzahl zur Vorhersage verwendeter Gene zwischen 1000 und 1500 Genen liegt. Eine größere bzw. geringere Anzahl von Genen führte in den Vorhersagen zu geringeren Korrelationswerten und einer größeren Varianz (Frisch *et al.* 2010). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Heterosis für Kornenertrag

in Mais keinesfalls durch ein einzelnes Gen verursacht wird, sondern durch eine Beteiligung und Interaktion einer größeren Anzahl von Genen erfolgt. Der Ansatz zur Identifizierung dieser Gene und deren biologischer Prozesse wird in Abschnitt 4.2 ausführlich diskutiert.

Zusammengefasst unterstreichen all diese Ergebnisse die Aussagekraft der parentalen Transkriptomdaten in Bezug auf Heterosis vom Kornertrag. Dass die Expressionsanalysen mit sieben Tage alten Keimlingen durchgeführt wurden zeigte zudem, dass bereits zu diesem frühen Zeitpunkt der Entwicklung eine definierbare und messbare transkriptionelle Grundlage für Heterosis in späteren Entwicklungsstadien wie dem Kornertrag für nachfolgende Generationen gelegt wird. Diese Erkenntnis kann man sich für eine Charakterisierung von Heterosis und anderer Hybridmerkmale anhand der parentalen Expressionsprofile, wie in dieser Arbeit geschehen, zu Nutze machen.

4.2 Funktionelle Charakterisierung der Hybridmerkmale

Die erfolgreiche Vorhersage von Heterosis und der Hybridleistung von Kornertrag durch Frisch *et al.* (2010) anhand der Transkriptomdaten aus der vorliegenden Arbeit, sowie die Arbeiten von Guo *et al.* (2006) und Stokes *et al.* (2010) unterstreichen den direkten Zusammenhang zwischen der parentalen Genexpression der Inzuchtlinien und dem Heterosis-Effekt der Hybridnachkommen. Genomweite Mikroarray-Analysen der Inzuchteltern stellen daher eine erfolgversprechende Methode zur Identifizierung Hybridmerkmal-assoziiierter Gene dar, die wiederum zur funktionellen Charakterisierung der Hybridmerkmale verwendet werden können.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit, basierend auf den Transkriptomdaten der 21 parentalen Inzuchtlinien, ein funktioneller Vergleich der beiden negativ miteinander assoziierten Hybridmerkmale, Hybridleistung von Kornertrag und Hybridleistung der Korntrockenmasse, sowie eine funktionelle Charakterisierung von Heterosis von Kornertrag, durchgeführt. Hierzu wurden mittels linearer Regression Gene identifiziert, deren mittleres parentales Expressionsniveau mit einem der Hybridmerkmale signifikant korrelierte. Das mittlere parentale Expressionsniveau gleicht dabei einer additiven Genexpression im Hybriden, welche bereits für den Großteil der differentiell exprimierten Gene in Maiskeimlingen (Stupar und Springer 2006) und ebenfalls für die meisten Hybridmerkmal-korrelierten Gene dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3.7.1, Abb.24). Die additive Genexpression stellt somit, aufgrund der direkten Vererbung durch die Eltern, einen vorhersagbaren

genetischen Faktor dar, der sich für die Vorhersage und Charakterisierung von Heterosis eignet.

Zur funktionellen Beschreibung der korrelierten Gene wurden GO-Anreicherungsanalysen durchgeführt, die zur Identifizierung biologischer Prozesse führten, von denen angenommen wurde, dass sie an der Ausbildung der Hybridmerkmale beteiligt sind. Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen des DFG Schwerpunktprojektes „Heterosis in plants“ durchgeführt und bereits publiziert (Frisch *et al.* 2010, Thiemann *et al.* 2010).

4.2.1 Vergleich der assoziierten Hybridmerkmale: Korntrockenmasse vs. Kornertrag

Die Hybridleistung von Kornertrag und die der Korntrockenmasse wurden bei Mais in bisherigen Mikroarray-Untersuchungen, im Gegensatz z.B. zur Kolben- und Kornentwicklung (Liu *et al.* 2008, Zhu *et al.* 2009), nicht näher betrachtet. Jedoch deuten Untersuchungen in Reis auf die Beteiligung verschiedener Prozesse am Kornertrag, wie dem Zellzyklus, der Phytohormon-Signaltransduktion, dem Kohlenstoffmetabolismus und dem Ubiquitin-System hin (Sakamoto und Matsuoka 2008).

Sowohl der Kornertrag, als auch die Korntrockenmasse stellen Pflanzenmerkmale mit einem komplexen Hintergrund dar. So werden sie von einer Vielzahl an Interaktionen zahlreicher physiologischer Prozesse und Umwelteinflüsse im Laufe des gesamten Lebenszyklus beeinflusst (Tollenaar *et al.* 2004). Der Kornertrag resultiert aus mehreren z.T. recht unterschiedlichen Merkmalen, wie der Anzahl der Kolben pro Pflanze, der Anzahl der Körner pro Kolben und dem Trockengewicht pro Korn, die bereits in zahlreichen QTL-Analysen näher untersucht wurden (Tuberosa und Salvi 2009). Die Korntrockenmasse hingegen hängt z.T. vom Zeitpunkt der Blütenbildung und der Akkumulation der Biomasse während der Kornfüllung ab (Bunting 1972). Die komplexe Natur der beiden Hybridmerkmale wird ebenfalls durch die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlicht, in der Merkmal korrelierte Gene, aus einer Vielzahl unterschiedlicher angereicherter, biologischer Prozesse identifiziert wurden (Kapitel 3.3, Abb.14 und 15).

Die Bedeutung der Korntrockenmasse für den Züchter besteht darin Körner zu ernten, deren Reifung bis zum Ende der Saison abgeschlossen ist, da ansonsten die artifizielle Trocknung zu höheren Produktionskosten führen würde (Tuberosa und Salvi 2009).

Die Kornentwicklung durchläuft mehrere verschiedene Stadien, die sich unter Anderem durch einen ständigen Verlust der Kornfeuchtigkeit auszeichnen (Ritchie *et al.* 1993). So besitzt das

Korn zu Beginn seiner Entwicklung einen Kornfeuchtegehalt von ca. 85% und zum Schluss bei seiner physiologischen Reife einen Kornfeuchtegehalt von lediglich ca. 30% (Ritchie *et al.* 1993). Der Prozess der Kornfüllung bzw. Kornentwicklung beginnt dabei mit der erfolgreichen Bestäubung und endet ca. 60 Tage später mit der physiologischen Reife (Ritchie *et al.* 1993). Die Kornfüllung und dessen Ausmaß hängen zudem von der Entwicklung des Endosperms ab, da die Anzahl und die Größe der Endospermzellen das verfügbare Volumen für die Kornfüllung vorgeben (Spillane *et al.* 2000). Eingelagert werden nach der Endospermentwicklung vor allem Kohlenhydrate, Proteine und Lipide, wobei die Kohlenhydrate den größten Anteil ausmachen (Evers *et al.* 1999).

Der am signifikantesten angereicherte Prozess, der Kornertrag korrelierten Gene (Kapitel 3.3, Abb.14), war die Initiation der DNA-Replikation. Denkbar ist, dass eine Erhöhung der DNA-Replikationsrate im direkten Zusammenhang mit einer gesteigerten Zellteilung steht. Eine erhöhte Zellteilung kann in der Endospermentwicklung zu einer Erhöhung der Zellanzahl führen, was wiederum die Verbindung zum Kornertrag erklären würde (Spillane *et al.* 2000). Denkbar ist auch, dass eine gesteigerte Zellproliferation in der Pflanze zu einem generellen Anstieg des Wachstums beiträgt, was wiederum indirekt Auswirkungen auf den Kornertrag haben kann (Iqbal *et al.* 2011). Unterstützt wird diese Annahme durch eine Arbeit, bei der eine erhöhte Zellproliferation in den frühen Stadien der Maisembryonen, für die Ausbildung von Heterosis verantwortlich gemacht werden konnte (Meyer *et al.* 2007). Außerdem kann eine Erhöhung der DNA-Replikation in Verbindung mit einer Endoreduplikation stehen, einer DNA-Replikation mit ausbleibender Zellteilung. Endoreduplikationen treten für gewöhnlich in der Endospermentwicklung von Mais auf und führen zu einem Größenwachstum der Endospermzellen und somit potentiell zu einem gesteigerten Kornertrag (Spillane *et al.* 2000, Vlieghe *et al.* 2007). Für eine Erhöhung der Endoreduplikation spricht ebenfalls die Identifizierung eines weiteren angereicherten Prozesses, der Zellwandmodifikation beim multidimensionalen Zellwachstum. Die Bedeutung der Endoreduplikation für Heterosis von Kornertrag wird in Kapitel 4.2.2 ausführlich diskutiert, spielt aber allem Anschein nach ebenfalls, wie von Fu *et al.* (2010) diskutiert, bei der Hybridleistung von Kornertrag eine bedeutende Rolle, da eine Vielzahl der beteiligten Gene sowohl mit der Hybridleistung als auch gleichzeitig mit Heterosis von Kornertrag korreliert war.

Bei den mit der Korntrockenmasse korrelierten Genen (Kapitel 3.3, Abb.15) hingegen war der am signifikantesten angereicherte Prozess die Lignin-Biosynthese. Eine Erklärung für diese Beobachtung liefern Untersuchungen an brown midrib 3 (bm3) Maislinien in denen gezeigt

werden konnte, dass eine Reduktion der Korntrockenmasse (15-20%) mit einer Reduktion der Lignin-Level einherging (Inoue und Kasuga 1989).

Der Wassergehalt spielt bei der Kontrolle über die Dauer der Kornfüllung eine große Rolle, wobei das Verhältnis zwischen Wassergehalt und Biomasseentwicklung entscheidend ist. So können Körner einen kritischen Punkt des Kornfeuchtegehalts erreichen, bei der die Biomasseproduktion zum Erliegen kommt (Gambin *et al.* 2007). Dass die Korntrockenmasse und der Kornertrag schwach negativ miteinander assoziiert sind, konnten wir anhand einer Korrelationsanalyse zeigen (Kapitel 3.1, Abb.9). Die gegensätzlich positiv bzw. negativ mit beiden Hybridmerkmalen korrelierten Gene könnten dabei pleiotrop an der Ausprägung beider Merkmale beteiligt sein und zur Identifizierung konkurrierender Prozesse bei der Ausprägung beider Hybridmerkmale beitragen. Potentiell bieten diese Prozesse somit die Möglichkeit verstehen zu lernen, wie die negative Korrelation zwischen den beiden Hybridmerkmalen zustande kommt. Dieser Punkt stellt einen Aspekt dar, der besonders wichtig für die Züchter ist, da diese sowohl eine rechtzeitige Kornreife in Form einer hohen Korntrockenmasse zum Zeitpunkt der Ernte als auch einen hohen Kornertrag anstreben.

Ein Prozess der sowohl beim Kornertrag als auch bei der Korntrockenmasse angereichert war, war die der Regulation der Glykolyse. Gene, die an der Regulation der Glykolyse beider Hybridmerkmale beteiligt waren, kodierten unter anderem für drei Transkriptionsfaktoren mit einer AP2-Domäne (MZ00037336, MZ00040401, MZ00029588). Wri1 (Wrinkled1), ein homologer Transkriptionsfaktor aus *Arabidopsis* kontrolliert den Metabolismus während der Kornentwicklung durch eine Erhöhung der Aktivität einiger Glykolyse-Enzyme (Focks und Benning 1998). Eine *wri1*-*Arabidopsis*mutante zeigte dementsprechend einen Anstieg des löslichen Zuckers und eine Reduktion der Fettsäurebiosynthese (Focks und Benning 1998). Neben den regulatorischen Genen war eine Vielzahl anderer Gene aus der Glykolyse mit den Hybridmerkmalen korreliert. Dazu gehörten im Fall vom Kornertrag eine positiv mit Kornertrag korrelierte Adenosin-Kinase/Phosphofruktokinase (PFK) (MZ00013816), welche für den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glykolyse verantwortlich ist und die Reaktion von Fruktose-6-Phosphat in Fruktose-1,6-bisphosphat katalysiert. Desweiteren waren sowohl eine alpha-, wie auch eine beta-Untereinheit der Pyrophosphat:Fruktose 6-Phosphat 1-Phosphotransferase (PFP) (MZ00024213, MZ00024012) positiv mit Kornertrag korreliert. PFP ist an der reversiblen Umwandlung zwischen Fruktose-6-Phosphat und Fruktose-1,6-Bisphosphat beteiligt. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine gesteigerte Glykolyse bereits in den Expressionsmustern der parentalen Keimlinge mit dem Kornertrag des Hybriden assoziiert ist. Bestätigt wird dies durch 3 Invertasen (MZ00005490,

MZ00026683, MZ00033179), die ebenfalls positiv mit der Hybridleistung von Kornertrag korreliert waren und am Saccharose-Abbau beteiligt sind. Die dabei entstehenden Produkte Fruktose und Glukose werden durch eine Hexokinase (MZ00042300), welche das am stärksten positiv mit der Hybridleistung von Kornertrag korrelierte Gen überhaupt war (Kapitel 3.2, Abb.13), in die Glykolyse bzw. in die Stärkesynthese geleitet. Bereits in anderen Arbeiten konnte eine positive Korrelation zwischen der Invertase-Aktivität und dem Wachstum beobachtet werden (Morris und Arthur 1984, Schmalstig und Hitz 1987).

Im Fall der Korntrockenmasse war hingegen eine Beta-Untereinheit der PFP (MZ00024012) negativ mit dem Hybridmerkmal korreliert. Hinzu kommt eine positive Korrelation mit der Fruktose-1,6-Bisphosphatase (MZ00005948), dem Enzym, welches die entgegengesetzte Reaktion zu der PFK katalysiert. Diese Beobachtungen deuten somit auf einen Zusammenhang zwischen der Korntrockenmassebildung in der Kornentwicklung und einer verringerten Glykolyse bzw. einer erhöhten Stärkebildung in den Keimlingen des Hybriden hin. Hierfür spricht die positive Korrelation zweier Enzyme aus der Stärkesynthese, einer Endosperm-ADP-Glukose Pyrophosphorylase (MZ00040536) und einem Enzym, welches bei der Synthese für die Verzweigung der Stärke verantwortlich ist (MZ00041670, starch branching enzyme 4). Eine Regulation der Glykolyse und der konkurrierenden Stärkebildung wird durch das Enzym 6-Phosphofruktokinase 2 gesteuert. Das durch dieses Enzym gebildete Fruktose-2,6-Bisphosphat wirkt in der Pflanze als negativer Regulator der Stärkebildung (Nielsen *et al.* 2004). Eine Fruktose-2,6-Bisphosphatase (MZ00032278) war positiv mit der Korntrockenmasse korreliert. Eine gesteigerte Expression der Fruktose-2,6-Bisphosphatase führt jedoch keinesfalls zwingend zu einer gesteigerten Menge an Fruktose-2,6-Bisphosphat. Der Grund dafür ist, dass bereits kleinste Mengen des Enzyms dazu in der Lage sind die benötigten Mengen an Produkt zu katalysieren und daher keine Korrelation zwischen der Enzymmenge und der Produktmenge beobachten werden konnte (Nielsen *et al.* 2004). Daher führt eine höhere Expression wahrscheinlich eher zu einer Verbesserung des regulatorischen Schalters, welcher schneller auf wechselnde Bedürfnisse bei der Stärkeproduktion reagieren kann (Nielsen *et al.* 2004) und womöglich darüber in der Lage ist einen förderlichen Effekt auf die Korntrockenmasse auszuüben.

Zusammengefasst, wurden für die beiden Hybridmerkmale Kornertrag und Korntrockenmasse Gene identifiziert, deren mittlere parentale Genexpression entweder einen positiven oder negativen Einfluss auf die Hybridmerkmale zeigten. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass die mittlere parentale Genexpression direkt mit der Hybridexpression assoziiert ist und eine gesteigerte DNA-Replikationsrate und ein erhöhtes Zellwachstum zu einem gesteigerten

Kornertrag beitragen. Zudem scheint der Kornertrag im großen Maße von der Bereitstellung von Energie im Zuge der Glykolyse abzuhängen. Diese verbesserte Bereitstellung der Energie könnte auf Kosten der Stärkebildung bei der Kornfüllung gehen. Daher ist anzunehmen, dass die Glykolyse-Regulation eine zentrale Rolle bei der negativen Korrelation der beiden Hybridmerkmale spielt.

4.2.2 Charakterisierung von Heterosis für Kornertrag

Die Entwicklung pflanzlicher Organe besteht in der Regel aus drei aufeinanderfolgenden Prozessen; der Zellteilung, der Zellstreckung und der Zelldifferenzierung (Li *et al.* 2009). Dies gilt ebenfalls für die Endospermentwicklung, in der eine frühe Phase der Zellteilungen gefolgt von einer Phase der Zellexpansion über das endgültige Volumen des Kornes entscheidet, welches für die anschließende Kornfüllung zur Verfügung steht (Spillane *et al.* 2000). Die Phase der Zellstreckung und Differenzierung wird begleitet von Endoreduplikationen, einer DNA-Replikation mit ausbleibender Mitose, was eine Polyploidie zur Folge hat. Diese Polyploidie bewirkt einen gesteigerten Metabolismus, der sich wiederum positiv auf das Wachstum der Zelle auswirkt (Vlieghe *et al.* 2007).

Unter den angereicherten biologischen Prozessen, die positiv mit MPH korrelierten (Kapitel 3.5, Tab.3) befand sich die positive Regulation der DNA-Endoreduplikation. Das positiv MPH-korrelierte Gen (MZ00030283) dieses Prozesses kodiert für ein Protein mit einer Homologie zu Fizzy-related 2 (Fzr2), einem Mitglied der Familie der WD-repeat Proteine (Cebolla *et al.* 1999). Fzr2 führte bei einer Überexpression in *Arabidopsis* zu einer gesteigerten, und wenn ausgeschaltet, zu einer Verringerung der Endoploidie in Blattzellen (Li *et al.* 2009). Somit hat eine Erhöhung bzw. eine Verringerung der fzr2-Expression einen direkten Einfluss auf die Endoploidie in Abhängigkeit von der Expressionshöhe (Li *et al.* 2009). In der Zelle wirkt Frz2 als Aktivator vom Anaphase-Promoting Komplex (APC) und bewirkt darüber eine Degradierung von Cyclin B (Cebolla *et al.* 1999, Li *et al.* 2009). Auf Mais übertragen scheint eine höhere Expression des frz2 homologen Gens, durch eine gesteigerte Endoreduplikation, einen positiven Einfluss auf Heterosis vom Kornertrag zu haben. Die Regulation der Endoreduplikation findet in mehreren Stufen statt und beinhaltet unter anderem den Austritt aus dem mitotischen Zyklus. Dieser regulative Prozess war ebenfalls unter den signifikant angereicherten positiv mit MPH korrelierten Prozessen in Form der Regulation des Mitoseendes vertreten. Das dazugehörige Gen kodiert für ein Protein mit

zwei Dsl1p/Zw10-Domänen. Homologe Proteine wurden in Tieren näher charakterisiert und sind dort unter anderem Teil des RZZ Komplexes am Kinetochor während der Metaphase. Dort interagieren sie mit den Mikrotubuli um diese einzufangen und dann mittels weiterer Regulatoren in die nächste Phase (Anaphase) der Mitose überzuleiten (Schmitt 2010).

Verschiedene regulatorische Mechanismen sind an der Initiation der Endoreduplikation beteiligt, welche durch Proteine des Zellzyklus kontrolliert werden (Cebolla *et al.* 1999). So kann z.B. eine teilweise bzw. vollständige Inhibierung der Expression bestimmter Cyclin-abhängiger Kinasen (CDK), zu einer Steigerung des Endozyklus führen (Vlieghe *et al.* 2007). Übereinstimmend damit waren eine regulatorische Untereinheit einer Cyclin-abhängigen Kinase (MZ00017273) und ein Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor (MZ00021442) positiv mit Heterosis korreliert. Ein ebenfalls positiv korreliertes Gen kodierte für eine Untereinheit des Anaphase-Promoting Komplexes (APC), welches wie bereits beschrieben durch die Proteolyse von Cyclinen einen Endozyklus auslösen kann (Li *et al.* 2009).

Neben den regulatorischen Mechanismen, die zur Initiation der Endoreduplikation beitragen, waren noch weitere biologische Prozesse mit Heterosis korreliert. So waren biologische Prozesse der DNA-Replikation und der postreplikativen Reparatur vertreten, was auf eine Veränderung der DNA-Replikation im Hybriden schließen lässt. Ebenfalls positiv sowohl mit Heterosis als auch mit der Hybridleistung von Kornertrag waren 3 Expansine (MZ00012891, MZ00019290, MZ00022872), die im Zuge der durch die Endoreduplikation initiierten Zellstreckung ein Mitwachsen der Zellwände ermöglichen können (Cosgrove 2005).

Auxin ist ein Phytohormon welches neben der Kontrolle der Zellteilung vor allem an der positiven Stimulierung der Zellelongation beteiligt ist (Went 1928, Christian *et al.* 2006). Unter den mit Auxin interagierenden, Heterosis korrelierten Genen befanden sich nur solche die positiv und gleichzeitig mit der Hybridleistung vom Kornertrag korreliert waren. Dazu gehörten 2 Auxin-response Faktoren (MZ00033465, MZ00024781), ein Auxin-induziertes Protein (MZ00047919) und ein Auxin-bindendes Protein (MZ00041857). Die Ergebnisse zeigten, dass, wie schon bereits für die Hybridleistung von Kornertrag gezeigt (Fu *et al.* 2010), eine verstärkte Zellexpansion in Verbindung mit Endoreduplikationen in Hybriden mit einem höheren Ertrag assoziiert war.

Die Identifizierung energiebezogener, positiv MPH korrelierter Prozesse wie dem ATP/ADP-Transport und dem ATP-Synthese gekoppeltem Protonentransport lassen auf die Bedeutung energieerzeugender Prozesse für Heterosis schließen. Zu diesen Prozessen gehörten unter anderem Gene, die für ATPase Untereinheiten (MZ00040530, MZ00040522)

und ATP-Synthasen (MZ00029012, MZ00013447, MZ00005225) kodierten. Unterstützt wird die vermutete Bedeutung energieerzeugender Prozesse durch eine Arbeit in Reis, bei der innerhalb einer Gruppe von Genen, welche differentiell zwischen den Eltern und dem Superhybriden LYP9 exprimiert waren, eine Anreicherung von Genen aus dem Energiemetabolismus nachgewiesen werden konnte (Wei *et al.* 2009). Weitere Hinweise auf eine Beteiligung energieerzeugender Prozesse am Heterosiseffekt liefert die GO-Anreicherungsanalyse dieser Arbeit, bei der sowohl positiv als auch negativ MPH-korrelierte Gene mit einbezogen wurden (Kapitel 3.5, Tab.5). Die dabei angereicherten zellulären Komponenten waren der ATP-Synthase Komplex (Kopplungsfaktor F_o), der Komplex I der Atmungskette und am signifikantesten angereichert, die innere Membran der Mitochondrien. Der Komplex I der Atmungskette ist mit an der Bildung des Protonengradienten beteiligt, welcher mittels des ebenfalls positiv korrelierten ATP-Synthase Komplexes zur der Bildung von ATP beiträgt und somit Energie für die Entwicklung der Pflanze bereitstellt.

Es konnte gezeigt werden, dass ein Großteil des basalen Pflanzenmetabolismus auf die Synthese, Faltung, Abbau und die erneute Synthese von Proteinen fällt (Quigg und Beardall 2003). Goff (2011) vermutete, dass eine höhere Energieeffizienz des Proteinmetabolismus im Hybriden zum Heterosiseffekt beiträgt. Bei Eukaryoten beträgt die durchschnittliche Halbwertszeit eines Proteins nur ca. 30 Stunden (Goldberg und Dice 1974, Goldberg und St John 1976) und es wurde gezeigt, dass ungefaltete Proteine zu einer verlangsamten Zellproliferation beitragen (King *et al.* 1996, Brewer *et al.* 1999, Goff 2011). Ein effizienterer Proteinmetabolismus könnte somit dabei helfen Energie, welche für das Wachstum und die Kornentwicklung benötigt wird, einzusparen. So zeigte Bao *et al.* (2005) in Hybriden von Reis eine schwächere Expression von Genen, die an der Prozessierung von Proteinen beteiligt waren, wie z.B. UBC2 oder PPIase (Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase), wobei Letzteres den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Proteinfaltung darstellt (Goff 2011). Zwei von insgesamt drei Genen (MZ00036953, MZ00041260) die für eine PPIase kodierten, zeigten eine negative Korrelation mit Heterosis für Kornertrag. Hinzu kamen eine Protease aus den Chloroplasten (MZ00027578) und ein DDI1-Homolog, welches Teil des Ubiquitin-Proteasom Systems und darüberhinaus am Zellzyklus beteiligt ist (White *et al.* 2011). Ein angereicherter Prozess, der ebenfalls negativ mit Heterosis korrelierte, war die Reaktion der Pflanze auf Hitzestress (GO:0009408). Die negativ korrelierten Gene dieses Prozesses kodierten unter Anderem für eine Proteasom-Untereinheit (MZ00016505), zwei Chaperone (MZ00015453, MZ00027332), und zwei Hitzeschockproteine (MZ00015015, MZ00018548), die wie die Chaperone auch an der Proteinfaltung beteiligt sind. Chaperone und Hitzeschockproteine

benötigen für die Proteinfaltung eine beträchtliche Menge an Energie in Form von ATP (Baniwal *et al.* 2004).

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Temperaturstress einen negativen Einfluss auf das Kornwachstum und die Ertragsstabilität hat. Dabei scheint die Aufrechterhaltung hoher Cytokininlevel ein wichtiger Faktor bei der Thermotoleranz und der Ertragsstabilität zu sein (Cheikh und Jones 1994). Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen waren zwei O-Glykosyltransferasen (MZ00005164, MZ00051786) positiv mit Heterosis korreliert. O-Glykosyltransferasen katalysieren die Glykosylierung der Cytokinine, wodurch diese reversibel inaktiviert werden, aber in dieser Form vor dem Abbau durch Cytokinin-Oxidasen geschützt sind (McGaw und Horgan 1983, Armstrong 1994). Dies könnte in Stresssituationen zu einem stabilen Cytokininlevel in den Hybriden beitragen.

Neben den negativ mit Heterosis korrelierten Genen aus der Hitzestressantwort waren noch andere Prozesse, die in Interaktion mit der Umwelt stehen, angereichert. So waren die Reaktion der Pflanze auf Pilze, die Reaktion auf osmotischen Stress und die Reaktion auf eine Veränderung im Tag-Nacht-Rhythmus in Bezug auf die Entwicklung und Reproduktion der Pflanze signifikant angereichert. Da sich Heterosis neben einem erhöhten Ertrag und einem stärkeren Wachstum ebenfalls durch eine verbesserte Toleranz gegenüber Pathogenen und einer verbesserten Adaption an umweltbedingten Stress auszeichnet (Guo *et al.* 2006), ist die Zugehörigkeit der identifizierten Heterosis korrelierten Gene zu den genannten Prozessen durchaus nachvollziehbar. So konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass ein Großteil der Verbesserung der Maishybride auf eine verbesserte biotische und abiotische Stresstoleranz zurückzuführen ist (Duvick 2001, Duvick *et al.* 2004). Zudem kann abiotischer sowie biotischer Stress zu einer Reduktion des Kornertrages während der besonders anfälligen Phasen der Blütenbildung und der Kornfüllung führen (Bidinger *et al.* 1987, Bolaños und Edmeades 1993). Neben den bereits erwähnten angereicherten biologischen Prozessen spielt ebenfalls die positiv mit Heterosis korrelierte und angereicherte Biosynthese von Spermidin eine Rolle bei der Stressadaption. So ist Spermidin in der Lage, bei Salzstress auftretende freie Radikale einzufangen, Zellmembranen zu stabilisieren und das ionische Gleichgewicht in der Zelle aufrechtzuerhalten (Jiménez-Bremont *et al.* 2007).

Neben der positiv mit Heterosis korrelierten Antwort auf Pilze, war der Katabolismus von Zellwänden ebenfalls positiv mit Heterosis korreliert. Die dazugehörigen Heterosis assoziierten Gene kodierten größtenteils für Chitinasen (MZ00014841, MZ00014842, MZ00016332). Damit spielt dieser Prozess keine Rolle im Katabolismus der pflanzlichen Zellwände, sondern

in der Abwehr von Pilzinfektionen durch die direkte Inhibierung des Pilzwachstums oder der Aktivierung der pflanzlichen Abwehr (Ishihara *et al.* 1998, Shoresh und Harman 2008).

Als letzte große Gruppe Heterosis assoziierter biologischer Prozesse waren solche angereichert, die an der Regulation der Genexpression beteiligt waren. Hierzu gehörten solche, die in der Synthese und Prozessierung von mRNAs involviert sind, wie die positiv korrelierten Prozesse der mRNA-Polyadenylierung und dem Schneiden der mRNAs. Hinzu kamen positiv assoziierte Prozesse mit epigenetischen regulatorischen Funktionen, wie der Histon-Phosphorylierung und dem postranskriptionellen Gene Silencing, bei dem eines der beiden assoziierten Gene für einen Argonauten (Ago4) kodiert, der an der durch kurze RNAs gesteuerten Methylierung der genomischen DNA beteiligt ist (Wu *et al.* 2010). Die epigenetische Regulation in der Ausbildung von Heterosis wird im Abschnitt 4.5 im Detail diskutiert.

Zusammenfassend kann für die funktionelle Charakterisierung von Heterosis des Kornertrages gesagt werden, dass die Expression der Eltern auf der Annahme einer überwiegend additiven Genexpression im Hybriden, die ebenfalls in dieser Arbeit bestätigt werden konnte, die Identifikation einer Vielzahl von Heterosis-assoziierten Genen erlaubte, die in bedeutenden Prozessen wie dem Zellwachstum, der Energiegewinnung, der Stress- bzw. Pathogenresistenz und der Genregulation eine gewichtige Rolle spielen.

Dabei lässt die Identifikation der Hybridmerkmal korrelierten Gene in einem so frühen Stadium wie dem der Keimlinge darauf schließen, dass bereits in der frühen Entwicklung bestimmte Expressionslevel im Hybriden etabliert sind, die sich messbar auf den Kornertrag bzw. die Korntrockenmasse auswirken. Eine mögliche Erklärung für die Existenz Heterosis von Kornertrag relevanter Expressionslevel in solch frühen Stadien und Geweben wie dem Keimling, ist die neutrale Evolution der pflanzlichen Transkription. Bei der neutralen Evolution können sich bestimmte Genexpressionslevel in Teilen oder der gesamten Pflanze aufgrund eines fehlenden negativen Selektionsdruckes etablieren, auch wenn deren funktionelle Bedeutung nur auf spezifische Gewebe und/oder Entwicklungsstadien beschränkt ist (Broadley *et al.* 2008). Eine weitere Erklärung für das Vorhandensein von Kornertrag bzw. Korntrockenmasse assoziierten Genexpressionen im Keimlingsstadium kann deren Beteiligung an der Schaffung positiver bzw. negativer Bedingungen für die Etablierung späterer Hybridmerkmale sein. So wurde bereits in anderen Versuchen gezeigt, dass der Kornertrag mit anderen Merkmalen, wie z.B. der Pflanzengröße, positiv in Mais korreliert war (Iqbal *et al.* 2011).

4.3 *In silico* Lokalisierung Heterosis bzw. Hybridleistung von Kornertrag assoziierter Bereiche im Genom der Maislinie B73

In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl von Marker basierten QTL-Analysen durchgeführt, um die Regionen im Genom zu identifizieren, die an der Ausbildung quantitativer Merkmale, wie z.B. dem Kornertrag, beteiligt sind (Agrama und Moussa 1996, Kozumplik *et al.* 1996, Ribaut *et al.* 1997, Austin und Lee 1998, Melchinger *et al.* 1998). Diese Analysen in Verbindung mit Genexpressionsanalysen können dazu beitragen die Gene zu identifizieren, die den QTLs und somit dem Merkmalen unterliegen (Hitzemann *et al.* 2003).

Die Identifizierung der verantwortlichen Gene wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Korrelation der parentalen Genexpressionen mit umfangreichen Felddaten der Hybridmerkmale bewerkstelligt. Diese Gene waren in der Lage Heterosis bzw. die Hybridmerkmale im Hybriden vorherzusagen und führten zur Identifizierung einer Vielzahl interessanter biologischer Prozesse, deren Beteiligung an der Merkmalausprägung zum Großteil durch andere Arbeiten bestätigt werden konnte. Desweiteren zeigte die genomische Verteilung der Hybridmerkmal korrelierten Gene auf dem Genom der Linie B73 eine statistisch signifikante Abweichung von der zufälligen Verteilung der Kontrollgene. Diese Beobachtung untermauert zusätzlich deren funktionelle Bedeutung bei der Merkmalausprägung, da bei einer nicht spezifischen Identifikation der Gene im Zuge der Korrelationsanalysen eine genomische Verteilung ähnlich der der Kontrollgene zu erwarten gewesen wäre.

Resultierend aus der Beobachtung einer nicht zufälligen genomischen Verteilung zeigten die Untersuchungen, dass sowohl für die Hybridleistung von Kornertrag als auch für MPH von Kornertrag Regionen im Genom mit einer erhöhten Dichte korrelierter Gene existierten. Es wurde angenommen, dass diese genomischen Fragmente eine besondere Rolle bei der Ausbildung der untersuchten quantitativen Merkmale spielen können. Um diese Vermutung zu untermauern wurden bereits bekannte QTLs für Kornertrag identifiziert, die mit den genomischen Fragmenten auf Chromosom 1 und einem genomischen Fragment der Hybridleistung von Kornertrag auf Chromosom 8 kolokalisierten. Die genomische Lokalisierung der QTLs, basierend auf den QTL-flankierenden Markern der gentischen Karte „IBM2 2008 Neighbors“, ermöglichte dabei eine Vergleichbarkeit von QTLs unterschiedlicher Linien im Genom der Linie B73. Hierbei kolokalisierten teilweise mehrere QTLs aus Untersuchungen mit unterschiedlichen Linien an den Stellen der in dieser Arbeit identifizierten Fragmente. So z.B. kolokalisierte das Heterosis-Fragment hgyld1.14 gleichzeitig mit dem QTL qgyld55 (Kozumplik *et al.* 1996) und dem QTL qgyld70 (Austin und Lee 1998) auf Chromosom 1.

Ein weiteres Beispiel war das Fragment *gyld8.15*, der Hybridleistung von Kornertrag, welches gleich mit drei QTLs (*qgyld37*, *qgyld63*, *qgyld74*) aus unterschiedlichen Studien (Ribaut *et al.* 1997, Austin und Lee 1998, Melchinger *et al.* 1998) kolokalisierte.

Die Kolokalisierung der Fragmente mit mehreren QTLs verschiedener Studien lassen auf genomische Bereiche schließen, deren Effekt auf den Kornertrag in mehreren Linien von Mais konserviert zu sein scheint. Die Fragmente, die mit keinen der bereits bekannten QTLs kolokalisierten, sind womöglich spezifisch für die untersuchten Linien. Unterschiede zwischen den QTLs verschiedener Linien sind bei Mais wahrscheinlich durch die große Variabilität und Kolinearität des Genoms zu erklären (Brunner *et al.* 2005, Vroh Bi *et al.* 2006).

Neben den bereits erwähnten QTL-Untersuchungen von quantitativen Merkmalen wie dem Kornertrag wurden ebenfalls bereits Analysen über heterotische QTLs vom Kornertrag veröffentlicht (Stuber *et al.* 1992, Cockerham and Zeng 1996, Graham *et al.* 1997, Lu *et al.* 2003, LeDeaux *et al.* 2006; Frascaroli *et al.* 2007, Garcia *et al.* 2008, Frascaroli *et al.* 2009, Schön *et al.* 2010). Und im Gegensatz zu den QTLs vom Kornertrag zeigten die heterotischen QTLs vom Kornertrag eine größere Beständigkeit über mehrere Populationen und Studien hinweg, was deren Position im Genom betraf (Schön *et al.* 2010). So konnte gezeigt werden, dass der Großteil der heterotischen QTLs für Kornertrag direkt in den genomischen Bins lagen, welche sich in direkter Nachbarschaft zum Zentromer befanden (Schön *et al.* 2010). Diese zentromernahe Position traf ebenfalls für vier (*hgyld1.8*, *hgyld1.14*, *hgyld2.6*, *hygld3.7*) der insgesamt fünf in dieser Arbeit identifizierten Fragmente mit erhöhter Gendichte an MPH korrelierten Genen zu. Diese Fragmente lagen zudem allesamt auf Bins in denen bereits heterotische QTLs identifiziert wurden (Schön *et al.* 2010). Schön *et al.* (2010) vermuteten, dass Allele innerhalb dieser QTLs aufgrund der geringen Rekombinationsrate der zentromernahen Regionen (McMullen *et al.* 2009) in heterotischen Gruppen fixiert wurden und in Kombination mit fixierten Allelen anderer heterotischer Gruppen zur Ausbildung von Heterosis beitragen.

GO-Anreicherungsanalysen (Kapitel 3.6, Tab 9) zeigten, dass eine Vielzahl der in Kapitel 4.3 diskutierten biologischen Prozesse für MPH ebenfalls in den 5 heterotischen Fragmenten mit erhöhter Gendichte repräsentiert waren. Die Tatsache, dass die Bedeutung dieser Prozesse für Heterosis, wie z.B. die der Endoreduplikation oder des ATP-Synthese gekoppelten Protonentransports hinreichend gezeigt werden konnte, unterstreicht die Bedeutung der identifizierten Fragmente noch zusätzlich und macht es wahrscheinlich, dass die in dieser Arbeit identifizierten Gene die molekulargenetische Basis für die kolokalisierten QTLs bilden.

4.4 Die Rolle additiv exprimierter Gene bei der Ausbildung von Heterosis

Eine Vielzahl von Studien hat sich in der Vergangenheit mit der Rolle differentiell exprimierter Gene im Hybriden bei der Ausbildung von Heterosis beschäftigt (Vuylsteke *et al.* 2005, Guo *et al.* 2006, Stupar und Springer 2006, Swanson-Wagner *et al.* 2006, Uzarowska *et al.* 2007, Meyer *et al.* 2007, Hoecker *et al.* 2008). Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Gene gerichtet, die im Hybriden vom Mittel der elterlichen Expression abweichen. Solchen nicht-additiv exprimierten Genen wurde aufgrund ihrer veränderten Genregulation im Hybriden eine besondere Rolle bei der Ausbildung von Heterosis zugesprochen. Gestützt wird diese Annahme durch Genexpressionsanalysen aus Reis und *Arabidopsis*, bei denen in Vergleichen zwischen den Inzuchteltern und ihren Hybriden eine Vielzahl nicht-additiv exprimierter Gene nachgewiesen werden konnte. Zudem zeigte eine Analyse in Mais von Auger *et al.* (2005) in Northern Blots bei 24 von 30 untersuchten Genen aus reifem Blattgewebe eine nicht additive Expression im Hybriden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit diesen Beobachtungen, betreffend dem Anteil additiv und nicht-additiv exprimierter Gene, nicht überein. Hier zeigten die differentiell exprimierten, Hybridmerkmal korrelierten Gene, in Vergleichen zwischen 9 Inzuchtlinienpaaren und deren Hybriden in 7 Tage alten Keimlingen, eine überwiegend additive Genexpression (Kapitel 3.7.1, Abb.24). Unterstützt werden diese Ergebnisse durch Arbeiten, bei denen größere Teile des Transkriptoms in Mais untersucht wurden. So demonstrierte Guo *et al.* (2003) in cDNA-AFLP Versuchen mit Endospermgewebe, dass lediglich 10% der differentiell exprimierten Gene nicht-additiv exprimiert waren. Mikroarray Analysen von Stupar und Springer (2006) mit 11 Tage alten Keimlingen ergaben ebenfalls nur 20% nicht-additiv exprimierte Gene. Darüber hinaus waren in der vorliegenden Arbeit die nicht-additiv exprimierten Gene, nicht konsistent in allen untersuchten Hybriden vom Mittel der Eltern abweichend exprimiert, sondern zeigten in anderen Hybriden ebenfalls eine additive Expression. Diese Beobachtung stimmt mit der von anderen Studien überein, bei denen mehr als ein Hybrid analysiert wurde und ebenfalls kein konstitutiv nicht-additiv exprimiertes Gen identifiziert werden konnte (Guo *et al.* 2006, Uzarowska *et al.* 2007). Zusammenfassend kann somit davon ausgegangen werden, dass zumindest in Mais eine additive Expression in Keimlingen und im Endospermgewebe überwiegt.

Guo *et al.* (2006) zeigten zudem, dass der Anteil additiv exprimierter Gene mit Heterosis von Korntrag in Mais positiv korreliert war, wohingegen keine Korrelation zwischen der Anzahl nicht-additiver Gene und Heterosis beobachtet werden konnte. Diese Beobachtung konnte in

der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Keines der Expressionsmuster zeigte eine signifikante Korrelation mit einem der Hybridmerkmale. Jedoch wurde in dieser Arbeit im Gegensatz zu der von Guo *et al.* (2006) eine selektive Vorauswahl der untersuchten Gene, basierend auf den Korrelationen der berechneten mittleren parental Expressionsniveaus und den Hybridmerkmalen, getroffen. Dies kann zu Veränderungen im prozentualen Anteil additiv exprimierter Gene beigetragen haben und somit eine mögliche Korrelation additiv-exprimierter Gene mit Heterosis in den untersuchten Linien kaschiert haben. Desweiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die wenigen nicht-additiv exprimierten, Heterosis korrelierten Gene nicht signifikant stärker mit Heterosis assoziiert waren als die rein additiv exprimierten Gene (Kapitel 3.7.2).

Die Verbindung zwischen einer additiver Expression und Heterosis konnte in dieser Arbeit durch die Identifikation signifikant mit Heterosis korrelierter Gene und deren überwiegend additiven Expression in sieben Tage alten Keimlingen gezeigt werden. Vorteile dieser Arbeit waren dabei die Integrierung umfangreicher Felddaten, die in mehreren verschiedenen Standorten unter unterschiedlichen agrarökologischen Bedingungen gemessen wurden und somit den umweltabhängigen Anteil von Heterosis berücksichtigen. Desweiteren wurden die Hybridmerkmal korrelierten Gene in transkriptomweiten Analysen mit einer großen Anzahl genetisch diverser Inzuchtlinien durchgeführt, was deren Assoziation mit Heterosis und mit den anderen Hybridmerkmalen ein zusätzliches Gewicht verleiht.

Ein Model zur Bedeutung additiver Genexpression bei der Ausbildung von Heterosis wurde bereits von Springer und Stupar (2007) erdacht, konnte bisher jedoch aufgrund der fehlenden Identifizierung Heterosis assoziierter, additiv exprimierter Gene nicht experimentell bestätigt werden. In diesem Model (Kapitel 1.2, Abb.4) gehen sie davon aus, dass eine große Anzahl von Genen einen optimalen Expressionsbereich besitzt, in dessen Grenzen Veränderungen der Genexpression keine größeren negativen Auswirkungen auf den Phänotyp haben. Wird jedoch dieser optimale Expressionsbereich über- bzw. unterschritten, so führt dies zu einer negativen Beeinträchtigung des Phänotyps. Begründen tun sie diese Annahme durch zahlreiche Beobachtungen von Genen mit einem optimalen Expressionsbereich, die z.B. in der Pathogenabwehr und Krankheitsresistenz eine Rolle spielen (Heidel *et al.* 2004) und durch das häufigere Auftreten rezessiver anstelle dominanter Mutationen (Karper 1932, Neuffer und Sheridan 1980).

Im Unterschied dazu identifizierten die Korrelationsanalysen dieser Arbeit Gene, deren mittlere parental Expressionsniveaus entweder negativ oder positiv linear mit Heterosis von

Kornertrag korrelierten. Dies bedeutet, dass die identifizierten Gene im Hybriden, sofern sie additiv exprimiert waren, keinen für Heterosis optimalen Expressionsbereich aufwiesen, sondern mit einem stetig steigenden bzw. sinkenden Expressionsniveau direkt linear mit Heterosis assoziiert waren. Für die identifizierten Heterosis korrelierten Gene besteht zwar die Möglichkeit, dass die gemessene lineare Korrelation mit den Bereichen einer linearen Korrelation eines optimalen Expressionsbereichs zusammenfällt; dies ist jedoch allein aufgrund der großen Anzahl untersuchter Hybride (98 Hybride) und der großen Bandbreite (Kapitel 2.1.1.1) der untersuchten Heterosisausprägung recht unwahrscheinlich. Ebenfalls besteht die Möglichkeit, dass neben den linear korrelierten Genen dieser Arbeit noch andere additiv exprimierte Gene existieren, die einen optimalen mittleren Expressionsbereich aufzeigen, aber durch die hier verwendete lineare Regression nicht identifiziert werden konnten.

Das auf den Ergebnissen dieser Arbeit resultierende, von Springer und Stupar (2007) abgewandelte Model ist in Abbildung 34 dargestellt. In diesem Model führt die additive Expression der linear mit Heterosis assoziierten Gene dazu, dass das Expressionsniveau eines Gens im Hybriden stets günstiger in Bezug auf Heterosis ist, als in einem der beiden Eltern. Bei der Betrachtung eines einzelnen Gens würde jedoch eines der beiden Elternteile stets ein günstigeres Expressionsniveau als das des Hybriden aufweisen. Daher funktioniert dieses Model in Bezug auf Heterosis nur bei der Betrachtung der Summe aller Heterosis assoziierten Gene. Erst dann ist die additive Expression der Gene in der Lage negativ beeinflussende, in den Inzuchteltern fixierte Expressionslevel zu kompensieren und eine Verbesserung gegenüber beiden Eltern herbeizuführen.

Eine Fixierung negativer Expressionslevel bei den Inzuchteltern im Laufe der Züchtung kann verschiedene Gründe haben. So kann der negative Einfluss eines einzelnen Gens für sich allein betrachtet zu schwach sein und daher vom Züchter unentdeckt bleiben. Dies und die recht niedrige Rekombinationsrate mancher Regionen im Maisgenom in Verbindung mit einer möglichen genetischen Kopplung vorteilhaft exprimierter mit nachteilig exprimierten Genen stellen mögliche Gründe dafür dar, warum es Züchtern möglicherweise bisher nicht gelang, diese für Heterosis förderlichen Expressionsniveaus in Inzuchtlinien zu etablieren.

Geht man davon aus, dass die positiv bzw. negativ mit Heterosis korrelierten Gene eine direkte Auswirkung auf Heterosis haben, so führen steigende bzw. fallende Genexpressionen zu einer Erhöhung des Heterosiseffekts, sprich einem Zuwachs der Vitalität des Hybriden gegenüber dem Mittel der beiden Inzuchteltern. Daraus folgt, dass die Hybridleistung in

einem stärkeren Maße zunimmt als die der Eltern. Somit muss eine Veränderung der Genexpression im Hybriden eine stärkere Auswirkung auf den Phänotyp haben als in den Inzuchteltern. Das gilt nicht für die allein mit der Hybridleistung korrelierten Gene. Bei denen kann eine Veränderung der Genexpression sowohl zu einer Verbesserung des Phänotyps beim Hybriden als auch zu einer ähnlichen Verbesserung im Inzuchtelter beitragen. Das bedeutet, Heterosis korrelierte Gene müssen im größeren Maße auf andere Gene als Interaktionspartner angewiesen sein, die möglicherweise im Hybriden in anderer Form oder anderer Menge vorliegen als in den Inzuchteltern. Somit kann keines der Heterosis korrelierten Gene für sich allein genommen einen direkten linearen Einfluss auf Heterosis ausüben. Die Vermutung ist daher, dass durch den transkriptomweiten Ausgleich der Expressionslevel im Hybriden eine lineare Korrelation bestimmter Gene mit Heterosis erst ermöglicht wird. Zudem ist die Wahrscheinlichkeit, aufgrund der mittleren additiven Expression im Hybriden, höher einen Interaktionspartner mit einem günstigen Expressionslevel zu finden. Des Weiteren können Heterosis korrelierte Gene im Hybriden im Gegensatz zu den Inzuchteltern mit zwei unterschiedlichen Allelen eines möglichen Interaktionspartners interagieren. Beispiele bei denen eine ausgewogenere Expression im Hybriden von Vorteil sein kann, liefern Transkriptionsfaktoren und Proteine aus der Signaltransduktion (Birchler *et al.* 2001, Komili und Silver 2008). Viele Gene innerhalb von QTLs kodieren für solche Proteine, die mit anderen Proteinen in regulativen Komplexen interagieren, wo die Mengenverhältnisse der einzelnen Komponenten die Effizienz durch Dosage-Effekte stark beeinflussen (Birchler *et al.* 2001). Ein weiteres Beispiel für eine verbesserte Interaktion in Hybriden liefern Metabolomanalysen aus Mais, in denen eine, im Vergleich zu den Inzuchteltern, geringere Variabilität und ein dichteres Netzwerk untersuchter Metabolite in Hybriden beobachtet werden konnte (Lisec *et al.* 2011). Die Vermutung ist, dass die geringere Variabilität verschiedener Metabolite durch einen verbesserten Fluss durch die Stoffwechselwege entsteht und dadurch ein erhöhtes Wachstum im Hybriden bedingt. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit dem Model dieser Arbeit, bei der eine ausgeglichene Expression von Genen, die an Stoffwechselwegen beteiligt sind, den verbesserten Fluss der Metabolite ermöglichen könnte.

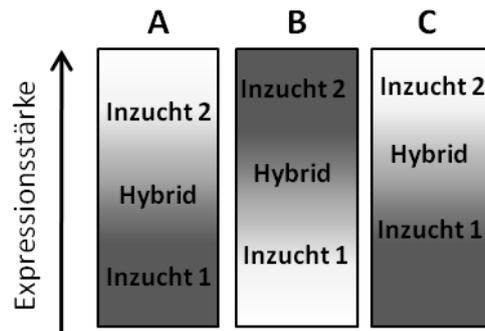


Abb.34: Model zur Erklärung des Einflusses additiv exprimierter, linear Heterosis korrelierter Gene auf Heterosis.

Gezeigt sind drei Gene A, B und C, von denen die Gene A und C positiv und das Gen B negativ mit Heterosis korreliert sind. Jedes Gen zeigt eine lineare Assoziation der Genexpression in Bezug auf Heterosis, dargestellt durch einen gleichmäßigen Übergang von Weiß zu Schwarz, wobei Weiß ein optimaleres Expressionsniveau darstellt. Die Genexpressionsniveaus zweier Inzuchteltern (Inzucht 1, Inzucht 2) und ihres Hybriden (Hybrid) sind innerhalb der Genboxen dargestellt. Die Hybride gleichen durch die additive Expression nachteilige Expressionen der Inzuchteltern aus.

4.5 Gene Silencing hat einen Einfluss auf Heterosis von Kornertrag

In diesem Teil der Arbeit ging es um die Untersuchung eines möglichen Einflusses kurzer RNAs in Form des sog. Gene Silencing auf den Heterosiseffekt. Hierzu wurden transgene Maispflanzen verwendet, die einen viralen Gene Silencing Suppressor aus WSMV exprimierten. Gene Silencing Suppressoren sind generell in der Lage die Funktion kurzer RNAs zu unterbinden (Anandalakshmi *et al.* 1998, Ye *et al.* 2003). Kreuzungsversuche mit diesen Mais-Suppressorlinien und Messungen des Heterosiseffekts bezüglich der Wachstumsgeschwindigkeit sollten mögliche Einflüsse kurzer RNAs auf das Phänomen Heterosis aufklären.

Über die Beteiligung kurzer RNAs an Heterosis wurde in den letzten Jahren viel diskutiert. Ein epigentischer Anteil am Heterosiseffekt wurde zunächst durch deutliche Unterschiede in den DNA-Methylierungsniveaus von Hybriden im Vergleich zu deren Inzuchteltern in Reis vermutet (Xiong *et al.* 1999). In Mais- und Sorghum-Hybriden beeinflussten diese Änderungen in der DNA-Methylierung nicht nur Transposonsequenzen sondern auch Sequenzen von Genen mit bekannter Funktion (Zhao *et al.* 2007, Zhang *et al.* 2007). Basierend auf der uniparentalen Expression und der Komplexität der kurzen RNA-Populationen in der Samenentwicklung von *Arabidopsis*, konnte auf eine Verbindung zwischen kurzen RNAs und den Expressionsunterschieden in Hybriden und somit auf Heterosis geschlossen werden (Mosher *et al.* 2009). Desweiteren deuten Veränderungen in der Anzahl kurzer RNAs und der

Methylierungsmuster im Hybriden, auf deren Beteiligung am Heterosiseffekt hin (Qi *et al.* 2010, Groszmann *et al.* 2011).

Einen weiteren Hinweis konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Identifizierung eines angereicherten, mit Heterosis korrelierten biologischen Prozesses, dem Posttranskriptionellen Gene Silencing, gezeigt werden (Kapitel 3.5, Tab.3). Die mit Heterosis in den Keimlingen der Inzuchtlinien positiv korrelierten Gene dieses Prozesses kodierten für einen Argonauten (MZ00036649) und eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (MZ00028872), zwei Enzyme die eine zentrale Funktion beim Gene Silencing übernehmen. Ein Beweis für eine direkte Beteiligung dieser kurzen RNAs am Heterosiseffekt wurde bisher jedoch noch in keiner Arbeit erbracht.

Wichtig für den Versuch war die erfolgreiche Induktion der P1/HC-Pro Expression zu einem möglichst frühen Zeitpunkt in der pflanzlichen Entwicklung, wie sie in Nucelli, 2 und 7 Tage nach der Bestäubung gezeigt werden konnte (Kapitel 3.8.1, Abb.29). Ein Grund hierfür ist, dass Heterosis durch die Interaktion beider elterlichen Genome im Hybriden verursacht wird. An der Einregulierung der Expression beider elterlicher Genome sind aller Voraussicht nach Demethylierungs- bzw. Methylierungsprozesse beteiligt, die durch kurze RNAs reguliert werden (Chen 2007, Jahnke und Scholten 2009). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass das paternale Genom bereits kurze Zeit nach der Befruchtung aktiviert wird (Meyer *et al.* 2007). Eine frühe Inaktivierung dieser kurzen RNAs durch den viralen Suppressor wäre somit in der Lage eine Veränderung von Heterosis im weiteren Verlauf der Pflanzenentwicklung herbeizuführen.

Zunächst zeigten die Ergebnisse der Kreuzungsversuche mit den P1/HC-Pro Pflanzen, dass das Induktionsmedium Dexamethason keinerlei Einfluss auf das Wachstum der Inzuchtlinien bzw. der Hybride besaß. Dies zeigten die Wachstumsraten der nicht transgenen Wildtyp-Kreuzungen, bei denen T-Tests keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Inzuchtlinien bzw. Hybriden in Abhängigkeit von Dexamethason nachweisen konnten. Dieser Umstand ist wichtig, da Dexamethason den einzigen Unterschied in den Anzuchtbedingungen darstellte und somit eine Wirkung auf das Wachstum einen Vergleich der Wachstumsraten erschwert hätte.

Die Ergebnisse zeigten zudem, bis auf eine einzige Ausnahme, dass alle Hybride, egal ob transgen oder nicht transgen, einen messbaren Heterosiseffekt ausbildeten. Die Ausnahme bildeten die transgenen nicht induzierten Pflanzen, deren Heterosiseffekt geringer ausfiel und statistisch nicht signifikant war. Bei den transgenen induzierten Pflanzen hingegen war der

Heterosiseffekt gut ausgeprägt und so ergab eine ANOVA-Analyse einen signifikanten Unterschied zum Heterosiseffekt der jeweiligen nicht-induzierten Pflanzen. Die Induktion der P1/HC-Pro Expression scheint somit eine Erhöhung des Heterosiseffektes in den untersuchten Pflanzen zu verursachen. Die Veränderung des Heterosiseffektes basierte dabei ausschließlich auf einer Erhöhung der Wachstumsrate der Hybride. Die Wachstumsraten der Inzuchtlinien waren hingegen von der Expression des viralen Suppressors nicht messbar beeinflusst. Ein möglicher Grund für die geringere Wachstumsrate der transgenen nicht induzierten Hybride im Vergleich zu den nicht transgenen Hybriden kann im Genotyp der transgenen Pflanzen liegen. So können die transgenen Pflanzen mit ihrem bei der Transformation ursprünglichen Hi-II Hintergrund, trotz achtmaliger Rückkreuzung mit A188, über einen nicht vollständig homozygoten Genotyp verfügen. Die transgenen Pflanzen aus den Kreuzungen waren in Bezug auf das Transgen stets hemizygot. Aufgrund der bei Mais in manchen Bereichen des Genoms auftretenden geringen Rekombinationshäufigkeit (Gore *et al.* 2009, Liu *et al.* 2009), könnten das Transgen selbst und der umliegende Chromosomenabschnitt, dessen Größe von der Entfernung zu den nächsten Rekombinationsstellen abhängig ist, zu Unterschieden im Vergleich zum Wildtyp führen.

Um den positiven Effekt auf Heterosis durch die P1/HC-Pro Expression in den Hybriden nachvollziehen zu können, muss man sich zunächst mit der Funktion des Suppressors aus WSMV beschäftigen. Der verwendete Suppressor P1/HC-Pro kodiert für ein Polyprotein, das sich nach der Translation autokatalytisch in P1 und HC-Pro aufspaltet. Im Gegensatz zu den Potyviren scheint die Suppressorwirkung nicht durch das HC-Pro sondern wie von Sentner (2008) gezeigt durch das P1 zu erfolgen. Dass P1 die Suppressorwirkung anstelle von HC-Pro ausübt, konnte ebenfalls bereits für das P1 aus CVYV (*Cucumber vein yellowing virus, Potyviridae*) gezeigt werden (Valli *et al.* 2006). Die Wirkung des Gene Silencing Suppressors von WSMV in Mais konnte indirekt bereits durch einen Synergie-Effekt nachgewiesen werden, welcher bei einer Co-Infiltration mit dem *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV) zu einer Verstärkung der Infektion und der daraus resultierenden Symptomatik beiträgt (Scheets 1998).

Jedoch ist der Mechanismus, mit dem das P1 das Gene Silencing unterdrückt noch völlig unbekannt. Durch Versuche an einer Vielzahl verschiedener Suppressoren konnte Mérai *et al.* (2006) zeigen, dass mehrere von ihnen in der Lage waren doppelsträngige RNA zu binden, was vermuten lässt, dass diese Bindungsfähigkeit eine generelle Strategie der Suppression von Gene Silencing darstellt. Nach diesem Model könnte P1 die Funktion von miRNAs stören und wie im Fall von P1/HC-Pro des *Turnip mosaic virus* (TuMV) in *Arabidopsis* die Expres-

sion bestimmter, an der Entwicklung beteiligter Transkriptionsfaktoren, stören (Kasschau *et al.* 2003). Dies führte im Fall des P1/HC-Pro aus TuMV in *Arabidopsis* zu schwerwiegenden Entwicklungsstörungen, wie einem gestauchten Wachstum, einem geringeren Internodienabstand und einer gestörten Blattentwicklung (Kasschau *et al.* 2003). Falls P1 die Funktion der 21nt langen miRNAs inhibiert, hätten wir in dieser Arbeit neben dem beobachteten positiven Einfluss auf Heterosis ebenfalls eine Störung in der Entwicklung der Keimlinge beobachten sollen. Da dies nicht der Fall war, besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass P1 vielleicht in zu geringer Konzentration in den Pflanzen exprimiert wurde. Da nur die Transkription bisher erfolgreich nachgewiesen wurde und nicht die Translation, besteht die Möglichkeit, dass diese in zu geringem Maße ausfiel um einen sichtbaren Phänotyp zu erzeugen. Eine Suppression des Gene Silencing durch die Bindung kurzer RNAs benötigt eine ausreichende Menge des Suppressors, um alle gebildeten kurzen RNAs zu binden und dadurch zu inhibieren. Dennoch kann eine geringe Inhibition durch die Bindung eines Teils der kurzen RNAs einen Einfluss auf ein quantitatives Merkmal wie Heterosis haben, wohingegen andere nicht-quantitative Merkmale unbeeinträchtigt bleiben würden.

Mérai *et al.* (2006) zeigte ebenfalls, dass einige Suppressoren in Abhängigkeit von der Größe der kurzen doppelsträngigen RNAs diese binden. Daher besteht eine weitere Möglichkeit darin, dass P1 einen selektiven Einfluss auf andere kurze RNAs ausübt, wie z.B. die längeren cis-acting siRNAs (casiRNAs), die von Transposons, repetitiven Elementen und Tandem-Repeats (z.B. 5s rRNA) stammen. Sie sind meist 24 nt lang und machen den Großteil der endo-siRNAs aus (Xie *et al.* 2004). casiRNAs bewirken an den Loci ihrer Transkription die Bildung von Heterochromatin, die Methylierung von DNA und die Modifikation von Histonen (Mette *et al.* 2000, Hamilton *et al.* 2002, Llave *et al.* 2002, Zilberman *et al.* 2003, Chan *et al.* 2004, Xie *et al.* 2004, Tran *et al.* 2005).

Für eine Beeinflussung dieser casiRNAs sprechen eine Vielzahl von Ergebnissen aus Reis, Mais und Sorghum, bei denen Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster von Hybriden festgestellt wurden (Zhang *et al.* 2007; Zhao *et al.* 2007). Eine Arbeit in *Arabidopsis*, bei der ausschließlich eine Reduktion der 24nt langen kurzen RNAs im Hybriden nachgewiesen werden konnte (Groszmann *et al.* 2011), stimmt mit der Vermutung einer Suppression dieser kurzen RNAs durch P1/HC-Pro und einer damit einhergehenden Steigerung von Heterosis überein. Die Reduktion der 24nt war mit einer Veränderung der Methylierung und der Genexpression einer Vielzahl unterschiedlicher Gene korreliert, von denen eine Vielzahl für Transkriptionsfaktoren und Regulatoren der Signaltransduktion korrelierten (Groszmann *et al.* 2011). Ebenfalls in zwei Unterarten von Reis und ihren reziproken Hybriden sowie in einer

Untersuchung mit Hybriden von *Arabidopsis* konnte eine Reduktion der 24nt langen kurzen RNAs beobachtet werden (Ha *et al.* 2009, He *et al.* 2010). Eine Arbeit in Mais zeigte zudem eine positive Korrelation zwischen dem parentalen Unterschied in der Methylierung der CHG-Erkennungssequenz und Heterosis von Kornertrag (Qi *et al.* 2010). Eine weitere Gruppe 24nt langer kurzer RNAs sind die longmiRNAs (lmiRNAs), die erst vor kurzem in Reis entdeckt wurden und dort ebenfalls, wie die casiRNAs an der Methylierung von DNA beteiligt sind (Wu *et al.* 2010). Sie werden durch einen anderen Dicer (Dicer3) als die 21nt langen miRNAs prozessiert und wirken mittels eines spezifischen Argonauten (Ago4) sowohl auf die Genomabschnitte ihrer Herkunft, als auch auf andere Abschnitte in trans. Sie spielen dabei mittels DNA-Methylierung eine Rolle in der Genregulation (Wu *et al.* 2010). Das bereits zu Anfang erwähnte positiv mit Heterosis korrelierte Gen (MZ00036649) kodiert für ein Maishomolog des Argonauten 4a aus Reis, einem von vier Mitgliedern der AGO4-Familie (Kapoor *et al.* 2008, Wu *et al.* 2009). Dies bekräftigt die Vermutung, dass die Funktion dieser 24nt langen lmiRNAs und damit verbunden die Methylierung von DNA einen Einfluss auf Heterosis ausüben.

Da bis zu diesem Zeitpunkt die genaue Funktionsweise von P1 nicht gezeigt werden konnte, kann bisher nur vermutet werden, inwieweit oder auf welche Art und Weise das Gene Silencing inhibiert wird und somit eine negative Rolle bei der Ausprägung von Heterosis in den Maislinien A188 und H99 spielt. Weitere Versuche mit anderen, besser charakterisierten Suppressoren, sowie Untersuchungen der kurzen RNA-Populationen sind in Planung und sollen die bisher gemachten Beobachtungen ergänzen bzw. erhärten.

5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war zum Einen die Bereitstellung transkriptioneller Marker für die Entwicklung neuartiger Vorhersagemodelle von Heterosis, sowie zum Anderen die funktionelle Charakterisierung von Heterosis des Kornertrages und zwei weiterer Merkmale, der Hybridleistung von Kornertrag und der Korntrockenmasse.

Hierzu wurden genomweite Mikroarray-Expressionsanalysen mit 7 Tage alten Keimlingen von 21 parental Inzuchtlinien aus einem Züchtungsprogramm der Universität Hohenheim durchgeführt und differentiell exprimierte Gene identifiziert. Die Expressionsprofile der differentiell exprimierten Gene wurden von Frisch *et al.* (2010) für die Entwicklung von Vorhersagemodellen eingesetzt und erzielten dabei in Vergleichen mit DNA Marker basierten Vorhersagemodellen bessere Ergebnisse. Die erfolgreiche Vorhersage der Hybridleistung verdeutlichte die Bedeutung der Gene als Marker in zukünftigen Züchtungsprogrammen und spiegelt deren Aussagekraft in Bezug auf die Charakterisierung von Heterosis wider.

Zur Charakterisierung von Heterosis und der beiden Hybridleistungsmerkmale wurden zunächst Gene identifiziert, die mit einem oder mehreren dieser Hybridmerkmale assoziiert waren. Hierfür wurden Korrelationsanalysen zwischen den Felddaten der Merkmale von 98 Hybriden und den mittleren Expressionsniveaus der differentiell exprimierten Gene der entsprechenden Inzuchtelternpaare durchgeführt. Dies führte zur Identifizierung 4481 linear, mit einem oder mehreren der Hybridmerkmale, korrelierter Gene. Die bei der Korrelation verwendete mittlere parentale Genexpression entspricht dem Niveau einer additiven Expression im Hybriden, welche in weiteren Mikroarrayanalysen von 9 Hybriden und ihren Inzuchteltern für den Großteil der untersuchten korrelierten Gene bestätigt werden konnte. Nicht-additive Expressionsprofile wurden ebenfalls beobachtet, traten aber seltener und nicht konsistent zwischen den 9 untersuchten Hybriden und den Inzuchteltern auf. Die größtenteils additive Expression im Hybriden kann durch eine rein cis-regulierte Genexpression erklärt werden (Wittkopp *et al.* 2004) und stellt, aufgrund der direkten Vererbung durch die elterlichen Genome, ein weiteres Indiz für die funktionelle Aussagekraft der parental Expressionsprofile dar.

Zur funktionellen Charakterisierung der drei Hybridmerkmale wurde mittels GO-Anreicherungsanalyse eine Vielzahl angereicherter biologischer Prozesse identifiziert. Die angereicherten Prozesse ließen darauf schließen, dass die Regulierung der Glykolyse und der Stärkesynthese eine zentrale Rolle bei der Balance der gegenläufigen Merkmale Kornertrag

und Korntrockenmasse spielen. Dabei zeigte sich, dass Gene, die die Glykolyse vorantreiben, eher mit dem Kornertrag assoziiert waren, wohingegen die Korntrockenmasse korrelierten Gene eher an der Glukoneogenese und der Stärkebildung beteiligt waren.

Die funktionelle Charakterisierung von Heterosis von Kornertrag ergab eine Beteiligung der korrelierten Gene an Prozessen wie der Endoreduplikation, dem damit verbundenen Zellwachstum, der Energiegewinnung, der Protein-Prozessierung, der Pathogen-, und Stress-Abwehr und der Regulation der Genexpression. Die funktionelle Bedeutung der identifizierten Gene und biologischen Prozesse konnte durch Ergebnisse zahlreicher anderer Arbeiten unterstützt werden.

Eine *in silico* Lokalisierung auf dem Genom der Maislinie B73 zeigte eine nicht zufällige Verteilung der Hybridleistung bzw. der MPH von Kornertrag korrelierten Gene, was deren funktionelle Bedeutung zusätzlich Gewicht verleiht. Regionen im Genom mit einer Gendichte, die über dem statistisch zu erwartenden Wert lagen, wurden identifiziert und mit bereits beschriebenen QTLs aus verschiedenen Studien unterschiedlicher Linien erfolgreich kolokalisiert. Die Heterosis-assoziierten Regionen waren dabei, wie für heterotische QTLs in anderen Arbeiten bereits gezeigt, zum größten Teil nahe der Zentromere lokalisiert.

Desweiteren wurde über die Bedeutung additiv exprimierter Gene bei der Ausbildung von Heterosis diskutiert und basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit das Model von Springer und Stupar (2007) um die linear mit Heterosis korrelierten Gene erweitert. Gemäß diesem erweiterten Model führen Veränderungen in den absoluten Expressionswerten Heterosis assoziierter Gene im Hybriden zu einem linearen Anstieg bzw. Abfall von Heterosis. Die dabei vorherrschende additive Expression im Hybriden sorgt für einen transkriptomweiten Ausgleich negativ wirkender, in den Inzuchteltern fixierter Expressionslevel.

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss kurzer RNAs in Form des Gene Silencings auf Heterosis untersucht. Hierzu wurden transgene Maispflanzen mit induzierbarer Expression des Gene Silencing Suppressor P1/HC-Pro aus WSMV verwendet. Das induzierbare System erlaubte den Vergleich identischer Genotypen unter induzierten und nicht induzierten Bedingungen. Die Expression von P1/HC-Pro in den untersuchten transgenen Maispflanzen führte zu erhöhten Heterosiswerten in den induzierten Linien im Vergleich zu den nicht-induzierten Pflanzen. Diese Ergebnisse zeigen zum ersten Mal eine direkte Beteiligung des Gene Silencings bei der Ausbildung von Heterosis. Dabei scheint die Störung der Funktion kurzer RNAs zu einer Erhöhung des Heterosis-Effektes beizutragen.

6 Literaturverzeichnis

- Agrama HAS, Moussa ME** (1996) Mapping QTLs in breeding for drought tolerance in maize (*Zea mays* L.). *Euphytica* **91**: 89-97
- Ajimone Marsan P, Castiglioni P, Fusari F, Kuiper M, Motto M** (1998) Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* **96**: 219-227
- Alexa A, Rahnenfuhrer J, Lengauer T** (2006) Improved scoring of functional groups from gene expression data by decorrelating GO graph structure. *Bioinformatics* **22**: 1600-1607
- Anandalakshmi R, Pruss GJ, Ge X, Marathe R, Mallory AC, Smith TH, et al.** (1998) A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 13079-13084
- Armstrong D** (1994) Cytokinin Oxidase and the Regulation of Cytokinin Degradation. In: D W S Mok, MC Mok (eds): Cytokinins: chemistry, activity and function, CRC Press, Boca Raton 139-154
- Auger DL, Gray AD, Ream TS, Kato A, Coe EH, Birchler JA** (2005) Nonadditive gene expression in diploid and triploid hybrids of maize. *Genetics* **169**: 389-397
- Austin DF, Lee M** (1998) Detection of quantitative trait loci for grain yield and yield components in maize across generations in stress and nonstress environments. *Crop Sci.* **38**: 1296-1308
- Baniwal SK, Bharti K, Chan KY, Fauth M, Ganguli A, Kotak S, et al.** (2004) Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J Biosci.* 29(4): 471-87
- Bao J, Lee S, Chen C, Zhang X, Zhang Y, Liu S, Clark T, Wang J, Cao M, Yang H et al.** (2005) Serial analysis of gene expression study of a hybrid rice strain (LYP9) and its parental cultivars. *Plant Physiol.* **138**: 1216-1231
- Bartel DP** (2004) MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**: 281-297
- Baulcombe D** (2004) RNA silencing in plants. *Nature* **431**: 356-363
- Beavis WD, Smith OS, Grant D, Fincher R** (1994) Identification of Quantitative Trait Loci Using a Small Sample of Topcrossed and F4 Progeny from Maize. *Crop Sci.* **34**: 882-896
- Bidinger FR, Mahalakshmi V, Rao GDP** (1987) Assessment of Drought Resistance in Pearl-Millet [*Pennisetum-Americanum* (L) Leeke] .2. Estimation of Genotype Response to Stress. *Aust. J. Agric. Res.* **38**: 49-59
- Birchler JA, Auger DL, Riddle NC** (2003) In search of the molecular basis of heterosis. *Plant Cell* **15**: 2236-2239
- Birchler JA, Bhadra U, Bhadra MP, Auger DL** (2001) Dosage-dependent gene regulation in multicellular eukaryotes: Implications for dosage compensation, aneuploid syndromes, and quantitative traits. *Dev. Biol.* **234**: 275-288
- Bolaños J, Edmeades GO** (1993) Eight cycles of selection for drought tolerance in lowland tropical maize. II. Responses in reproductive behavior. *Field Crops Research* **31**: 253-268
- Boppenmaier J, Melchinger AE, Seitz G, Geiger HH, Herrmann RG** (1993) Genetic Diversity for RFLPs in European Maize Inbreds .3. Performance of Crosses within Versus between Heterotic Groups for Grain Traits. *Plant Breeding* **111**: 217-226
- Bowtell D, Sambrook J** (2002) DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual, 1st ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. p 400-401

- Brewer JW, Hendershot LM, Sherr CJ, Diehl JA** (1999) Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 8505-8510
- Brigneti G, Voinnet O, Li WX, Ji LH, Ding SW, Baulcombe DC** (1998) Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* **17**: 6739-6746
- Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Graham NS, Bowen HC, Emmerson ZF, Fray RG, Iannetta PP, McNicol JW, May ST** (2008) Evidence of neutral transcriptome evolution in plants. *New Phytol* **180**(3):587-93
- Brodersen P, Voinnet O** (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet.* **22**: 268-280
- Bruce AB** (1910) The Mendelian theory of heredity and the augmentation of vigor. *Science* **32**: 627-628
- Brunner S, Fengler K, Morgante M, Tingey S, Rafalski A** (2005) Evolution of DNA sequence nonhomologies among maize inbreds. *Plant Cell* **17**: 343-360
- Bunting ES** (1972) Ripening in Maize - Interrelationships between Time, Water-Content and Weight of Dry Material in Ripening Grain of a Flint X Dent Hybrid (Inra 200). *J. Agric. Sci.* **79**: 225-233
- Burstin J, Charcosset A, Barriere Y, Hebert Y, deVienne D, Damerval C** (1995) Molecular markers and protein quantities as genetic descriptors in maize .2. Prediction of performance of hybrids for forage traits. *Plant Breeding* **114**: 427-433
- Campenot MK, Zhang GC, Cutler AJ, Cass DD** (1992) Zea-Mays Embryo Sacs in Culture .1. Plant-Regeneration from 1 Day after Pollination Embryos. *Am. J. Bot.* **79**: 1368-1373
- Cebolla A, Vinardell JM, Kiss E, Olah B, Roudier F, Kondorosi A, et al.** (1999) The mitotic inhibitor *ccs52* is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. *EMBO J.* **18**: 4476-84
- Chan SWL, Zilberman D, Xie ZX, Johansen LK, Carrington JC, Jacobsen SE** (2004) RNA silencing genes control de novo DNA methylation. *Science* **303**: 1336-1336
- Cheikh N, Jones RJ** (1994) Disruption of Maize Kernel Growth and Development by Heat Stress (Role of Cytokinin/Abscisic Acid Balance). *Plant Physiol.* **106**(1): 45-51
- Chen ZJ** (2007) Genetic and Epigenetic Mechanisms for Gene Expression and Phenotypic Variation in Plant Polyploids. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**: 377-406
- Chen ZJ** (2010) Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends Plant Sci.* **15**: 57-71
- Choi IR, Horken KM, Stenger DC, French R** (2002) Mapping of the P1 proteinase cleavage site in the polyprotein of Wheat streak mosaic virus (genus Tritimovirus). *J. Gen. Virol.* **83**: 443-450
- Choi IR, Stenger DC, French R** (2000) Multiple interactions among proteins encoded by the mite-transmitted wheat streak mosaic tritimovirus. *Virology* **267**: 185-198
- Christian M, Steffens B, Schenck D, Burmester S, Böttger M, Lüthen H** (2006) How does auxin enhance cell elongation? Roles of auxin-binding proteins and potassium channels in growth control. *Plant Biol.* **8**(3): 346-52
- Cockerham CC** (1967) Prediction of double crosses from single crosses. *Der Zuechter* **37**: 160-169
- Cockerham CC, Zeng ZB** (1996) Design III with marker loci. *Genetics* **143**: 1437-1456
- Cosgrove DJ** (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 850-861
- Crow JF** (1998) 90 years ago: The beginning of hybrid maize. *Genetics* **148**: 923-928
- Crow JF** (2000) The Rise and Fall of Overdominance. *In Plant Breeding Reviews*. John Wiley & Sons, Inc., p 225-257

- Darwin CR** (1876) The Effects of Cross- and Self-fertilization in the Vegetable Kingdom. John Murray
- Davenport CB** (1908) Degeneration, albinism and inbreeding. *Science* **28**: 454-455
- Diehl F, Grahlmann S, Beier M, Hoheisel JrD** (2001) Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal. *In*, Vol 29, p e38
- Ding SW, Voinnet O** (2007) Antiviral Immunity Directed by Small RNAs. *Cell* **130**: 413-426
- Dudley JW, Saghai MA, Rufener GK** (1991) Molecular markers and grouping of parents in maize breeding programs. *Crop Sci.* **31**: 718-723
- Duvick DN** (1999) Heterosis: feeding people and protecting natural resources. In: Coors J G, Pandey S, eds. The Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops. New York: Crop Sci Society of America, p 19-30
- Duvick DN, Smith JSC, Cooper M** (2004) Long-term selection in a commercial hybrid maize breeding program. *Plant Breeding Reviews* 24(2): 109-151
- East EM** (1908) Inbreeding in corn. *Rep ConnAgric Exp Stn*: 419-428
- East EM** (1936) Heterosis. *Genetics* **21**: 375-397
- Evers AD, O'Brien L, Blakeney AB** (1999) Cereal structure and composition. *Australian J. Agri. Sci.* 50(5): 629-650
- Focks N, Benning C** (1998) wrinkled1: A Novel, Low-Seed-Oil Mutant of Arabidopsis with a Deficiency in the Seed-Specific Regulation of Carbohydrate Metabolism. *Plant Physiol.* **118**: 91-101
- Frascaroli E, Cane MA, Landi P, Pea G, Gianfranceschi L, Villa M, et al.** (2007) Classical genetic and quantitative trait loci analyses of heterosis in a maize hybrid between two elite inbred lines. *Genetics* **176**: 625-644
- Frascaroli E, Cane MA, Pe ME, Pea G, Morgante M, Landi P** (2009) QTL detection in maize testcross progenies as affected by related and unrelated testers. *Theor. Appl. Genet.* **118**: 993-1004
- Frisch M, Thiemann A, Fu JJ, Schrag TA, Scholten S, Melchinger AE** (2010) Transcriptome-based distance measures for grouping of germplasm and prediction of hybrid performance in maize. *Theor. Appl. Genet.* **120**: 441-450
- Fu HH, Dooner HK** (2002) Intraspecific violation of genetic colinearity and its implications in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 9573-9578
- Fu J, Thiemann A, Schrag TA, Melchinger AE, Scholten S, Frisch M** (2010) Dissecting grain yield pathways and their interactions with grain dry matter content by a two-step correlation approach with maize seedling transcriptome. *BMC Plant Biol.* **10**:63
- Gambín BL, Borrás L, Otegui ME** (2007) Kernel water relations and duration of grain filling in maize temperate hybrids. *Field Crops Res.* **101**: 1-9
- Garcia AAF, Wang SC, Melchinger AE, Zeng ZB** (2008) Quantitative Trait Loci Mapping and The Genetic Basis of Heterosis in Maize and Rice. *Genetics* **180**: 1707-1724
- Gardner CO** (1963) Estimates of genetic parameters in cross fertilizing plants and their implications to plant breeding, Vol 982. NAS-NRC, Washington.
- Gene Ontology Consortium** (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics* **25**: 25-29
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al.** (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* **5**: 16
- Goff SA** (2011) A unifying theory for general multigenic heterosis: energy efficiency, protein metabolism, and implications for molecular breeding. *New Phytologist* **189**: 923-937
- Goldberg AL, Dice JF** (1974) Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. *Annual Review of Biochemistry* **43**: 835-869

- Goldberg AL, St John AC** (1976) Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells: part 2. *Annual Review of Biochemistry* **45**: 747-803
- Goodnight CJ** (1999) Epistasis and heterosis. In JG Coors, S Pandey, eds, Genetic and Exploitation of Heterosis in Crops. ASACSSA, Madison, p 59-67
- Gore MA, Chia JM, Elshire RJ, Sun Q, Ersoz ES, Hurwitz BL, Peiffer JA, McMullen MD, Grills GS, Ross-Ibarra J, et al.** (2009) A first-generation haplotype map of maize. *Science* **326**: 1115-1117
- Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Williams TD, Nueda MJ, Robles M, Talón M, Dopazo J, Conesa A** (2008) High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res.* **36**(10): 3420-3435
- Graham GI, Wolff DW, Stuber CW** (1997) Characterization of a yield quantitative trait locus on chromosome five of maize by fine mapping. *Crop Sci.* **37**: 1601-1610
- Griffing B** (1956) Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Australian J. Biol. Sci.* **9**: 463-493
- Groszmann M, Greaves IK, Albertyn ZI, Scofield GN, Peacock WJ, Dennis ES** (2011) Changes in 24-nt siRNA levels in Arabidopsis hybrids suggest an epigenetic contribution to hybrid vigor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 2617-2622
- Guo M, Rupe MA, Danilevskaya ON, Yang XF, Hut ZH** (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 MA, Yang XF, Crasta O, Zinselmeier C, Smith OS, et al.** (2006) Genome-wide transcript analysis of maize hybrids: allelic additive gene expression and yield heterosis. *Theor. Appl. Genet.* **113**: 831-845
- Guo M, Rupe MA, Zinselmeier C, Habben J, Bowen BA, Smith OS** (2004) Allelic variation of gene expression in maize hybrids. *Plant Cell* **16**: 1707-1716
- Ha M, Lu J, Tian L, Ramachandran V, Kasschau KD, Chapman EJ, et al.** (2009) Small RNAs serve as a genetic buffer against genomic shock in Arabidopsis interspecific hybrids and allopolyploids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 17835-17840
- Hall AHS, Wan J, Spesock A, Sergueeva Z, Shaw BR, Alexander KA** (2006) High potency silencing by single-stranded boranophosphate siRNA. *Nucleic Acids Res.* **34**: 2773-2781
- Hallauer AR, Miranda JB** (1988) Quantitative genetics in maize breeding. 2nd ed. Iowa State Univ. Press, Ames, IA.
- Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, Baulcombe D** (2002) Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *Embo J.* **21**: 4671-4679
- Hammond SM** (2005) Dicing and slicing - The core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett.* **579**: 5822-5829
- He GM, Zhu XP, Elling AA, Chen LB, Wang XF, Guo L, et al.** (2010) Global Epigenetic and Transcriptional Trends among Two Rice Subspecies and Their Reciprocal Hybrids. *Plant Cell* **22**: 17-33
- Heidel AJ, Clarke JD, Antonovics J, Dong XN** (2004) Fitness costs of mutations affecting the systemic acquired resistance pathway in Arabidopsis thaliana. *Genetics* **168**: 2197-2206
- Hitzemann R, Malmanger B, Reed C, Lawler M, Hitzemann B, Coulombe S, et al.** (2003) A strategy for the integration of QTL, gene expression, and sequence analyses. *Mamm. Genome* **14**: 733-747
- Hochholdinger F, Hoecker N** (2007) Towards the molecular basis of heterosis. *Trends Plant Sci.* **12**: 427-432
- Hoecker N, Lamkemeyer T, Sarholz B, Paschold A, Fladerer C, Madlung J, et al.** (2008) Analysis of nonadditive protein accumulation in young primary roots of a maize (*Zea mays* L.) F-1-hybrid compared to its parental inbred lines. *Proteomics* **8**: 3882-3894

- Huang Y, Zhang LD, Zhang JW, Yuan DJ, Xu CG, Li XH, et al.** (2006) Heterosis and polymorphisms of gene expression in an elite rice hybrid as revealed by a microarray analysis of 9198 unique ESTs. *Plant Mol.Biol.* **62**: 579-591
- Inoue N, Kasuga S** (1989) Agronomic traits and nutritive value of stover in brown midrib-3 maize hybrids. *Grassl Sci* **35**: 220-227
- Iqbal M, Khan K, Sher H, Rahman H, Al-Yemeni MN** (2011) Genotypic and phenotypic relationship between physiological and grain yield related traits in four maize (*Zea mays* L.) crosses of subtropical climate. *Scientific Research and Essays* **6**(13): 2864-2872
- Ishihara A, Miyagawa H, Matsukawa T, Ueno T, Mayama S, Iwamura H** (1998) Induction of hydroxyanthranilate hydroxycinnamoyl transferase activity by oligo-N-acetylchitoooligosaccharides in oats. *Phytochemistry* **47**: 969-974
- Jahnke S, Scholten S** (2009) Epigenetic Resetting of a Gene Imprinted in Plant Embryos. *Current Biology* **19**: 1677-1681
- Jiménez-Bremont JF, Ruiz OA, Rodríguez-Kessler M** (2007) Modulation of spermidine and spermine levels in maize seedlings subjected to long-term salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **45**: 812-821
- Jones DF** (1917) Dominance of linked factors as a means of accounting for heterosis. *Genetics* **2**: 466-479
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B** (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 19-53
- Kapoor M, Arora R, Lama T, Nijhawan A, Khurana JP, Tyagi AK, et al.** (2008) Genome-wide identification, organization and phylogenetic analysis of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA Polymerase gene families and their expression analysis during reproductive development and stress in rice. *BMC Genomics* **9**: 17
- Karper RE** (1932) A Dominant Mutation of Frequent Recurrence in Sorghum. *The American Naturalist* **66**: 511-529
- Kasschau KD, Carrington JC** (1998) A counterdefensive strategy of plant viruses: Suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* **95**: 461-470
- Kasschau KD, Xie ZX, Allen E, Llave C, Chapman EJ, Krizan KA, et al.** (2003) P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev. Cell* **4**: 205-217
- Keeble F, Pellew C** (1910) The mode of inheritance of stature and of time of flowering in peas (*Pisum sativum*). *J Genet* **1**: 47-56
- Kerr MK, Churchill GA** (2001) Experimental design for gene expression microarrays. *In*, Vol 2, p 183-201
- King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW** (1996) How proteolysis drives the cell cycle. *Science* **274**: 1652-1659
- Komili S, Silver PA** (2008) Coupling and coordination in gene expression processes: a systems biology view. *Nature Reviews Genetics* **9**: 38-48
- Korn M, Gartner T, Erban A, Kopka J, Selbig J, Hinch DK** (2010) Predicting Arabidopsis Freezing Tolerance and Heterosis in Freezing Tolerance from Metabolite Composition. *Mol. Plant.* **3**: 224-235
- Kozumplik V, Pejic I, Senior L, Pavlina R, Graham GI, Stuber CW** (1996) Molecular markers for QTL detection in segregating maize populations derived from exotic germplasm. *Maydica* **41**: 211-217
- Krieger U, Lippman ZB, Zamir D** (2010) The flowering gene SINGLE FLOWER TRUSS drives heterosis for yield in tomato. *Nature Genetics* **42**: 459-463
- LeDeaux JR, Graham GI, Stuber CW** (2006) Stability of QTL involved in heterosis in maize when mapped under several stress conditions. *Maydica* **51**: 151-167

- Lee M, Godshalk EB, Lamkey KR, Woodman WW** (1989) Association of Restriction Fragment Length Polymorphisms among Maize Inbreds with Agronomic Performance of Their Crosses. *Crop Sci.* **29**: 1067-1071
- Li F, Ding SW** (2006) Virus counterdefense: Diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**: 503-531
- Li J, Pandeya D, Nath K, Zulfugarov IS, Yoo SC, Zhang HT, et al.** (2010) ZEBRA-NECROSIS, a thylakoid-bound protein, is critical for the photoprotection of developing chloroplasts during early leaf development. *Plant J.* **62**: 713-725
- Li Z, Larson-Rabin Z, Masson PH, Day CD** (2009) FZR2/CCS52A1 mediated endoreduplication in Arabidopsis development. *Plant Signal Behav.* **4**(5):451-3
- Li ZK, Luo LJ, Mei HW, Wang DL, Shu QY, Tabien R, et al.** (2001) Overdominant epistatic loci are the primary genetic basis of inbreeding depression and heterosis in rice. I. Biomass and grain yield. *Genetics* **158**: 1737-1753
- Lippman ZB, Zamir D** (2007) Heterosis: revisiting the magic. *Trends Genet.* **23**: 60-66
- Lisec J, Römisch-Margl L, Nikoloski Z, Piepho HP, Giavalisco P, Selbig J, Gierl A, Willmitzer L** (2011) Corn hybrids display lower metabolite variability and complex metabolite inheritance patterns. *Plant J.* doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04689.x. [Epub ahead of print]
- Liu S, Yeh CT, Ji T, Ying K, Wu H, et al.** (2009) Mu Transposon Insertion Sites and Meiotic Recombination Events Co-Localize with Epigenetic Marks for Open Chromatin across the Maize Genome. *PLoS Genet* **5**(11): e1000733. doi:10.1371/journal.pgen.1000733
- Liu XH, Fu JJ, Gu D, Liu WX, Li TS, Peng YL, et al.** (2008) Genome-wide analysis of gene expression profiles during the kernel development of maize (*Zea mays* L.). *Genomics* **91**: 378-387
- Llave C, Kasschau KD, Rector MA, Carrington JC** (2002) Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* **14**: 1605-1619
- Lu H, Romero-Severson J, Bernardo R** (2003) Genetic basis of heterosis explored by simple sequence repeat markers in a random-mated maize population. *Theor. Appl. Genet.* **107**: 494-502
- Luo LJ, Li ZK, Mei HW, Shu QY, Tabien R, Zhong DB, et al.** (2001) Overdominant epistatic loci are the primary genetic basis of inbreeding depression and heterosis in rice. II. Grain yield components. *Genetics* **158**: 1755-1771
- Marçon A, Kaeppler SM, Jensen SG** (1997) Genetic variability among maize inbred lines for resistance to the high plains virus-wheat streak mosaic virus complex. *Plant Dis.* **81**: 195-198
- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T** (2002) Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* **110**: 563-574
- Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD** (2005) Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* **123**: 607-620
- McGaw BA, Horgan R** (1983) Cytokinin oxidase from *Zea mays* kernels and *Vinca rosea* crown-gall tissue. *Planta* **159** :30-37
- McMullen MD, Kresovich S, Villeda HS, Bradbury P, Li HH, Sun Q, et al.** (2009) Genetic Properties of the Maize Nested Association Mapping Population. *Science* **325**: 737-740
- Melchinger AE** (1999) Genetic diversity and heterosis. In: Coors JG, Pandey S (eds) The genetics and exploitation of heterosis in crops. ASA-CSSA, Madison, p 99-118
- Melchinger AE, Boppenmaier J, Dhillon BS, Pollmer WG, Herrmann RG** (1992) Genetic Diversity for Rflps in European Maize Inbreds .2. Relation to Performance of Hybrids

- within Versus between Heterotic Groups for Forage Traits. *Theor. Appl. Genet.* **84**: 672-681
- Melchinger AE, Geiger HH, Seitz G, Schmidt GA** (1987) Optimum prediction of three-way crosses from single crosses in forage maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* **74**: 339-345
- Melchinger AE, Lee M, Lamkey KR, Hallauer AR, Woodman WL** (1990) Genetic Diversity for Restriction-Fragment-Length-Polymorphisms and Heterosis for 2 Diallel Sets of Maize Inbreds. *Theor. Appl. Genet.* **80**: 488-496
- Melchinger AE, Utz HF, Schon CC** (1998) Quantitative trait locus (QTL) mapping using different testers and independent population samples in maize reveals low power of QTL detection and large bias in estimates of QTL effects. *Genetics* **149**: 383-403
- Merai Z, Kerenyi Z, Kertesz S, Magna M, Lakatos L, Silhavy D** (2006) Double-Stranded RNA Binding May Be a General Plant RNA Viral Strategy To Suppress RNA Silencing. In, Vol 80, p 5747-5756
- Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJM** (2000) Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J* **19**: 5194-5201
- Meyer RC, Torjek O, Becher M, Altmann T** (2004) Heterosis of Biomass production in Arabidopsis. Establishment during early development. *Plant Physiol.* **134**: 1813-1823
- Meyer S, Pospisil H, Scholten S** (2007) Heterosis associated gene expression in maize embryos 6 days after fertilization exhibits additive, dominant and overdominant pattern. *Plant Mol.Biol.* **63**: 381-391
- Mihaljevic R, Schön CC, Utz HF, Melchinger AE** (2005) Correlations and QTL Correspondence between Line Per Se and Testcross Performance for Agronomic Traits in Four Populations of European Maize. *Crop Sci.* **45**: 114-122
- Moissiard G, Voinnet O** (2004) Viral suppression of RNA silencing in plants. *Mol. Plant Pathol.* **5**: 71-82
- Moll RH, Lindsey MF, Robinson HF** (1964) Estimates of Genetic Variances and Level of Dominance in Maize. *Genetics* **49**: 411-423
- Morris DA, Arthur ED** (1984) An association between acid invertase activity and cell growth during leaf expansion in *Phaseolus vulgaris* L. *J Exp Bot* **35**: 1369-1379
- Mosher RA, Melnyk CW, Kelly KA, Dunn RM, Studholme DJ, Baulcombe DC** (2009) Uniparental expression of PolIV-dependent siRNAs in developing endosperm of Arabidopsis. *Nature* **460**: 283-286
- Murashige T, Skoog F** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497
- Neuffer MG, Sheridan WF** (1980) Defective Kernel Mutants of Maize. I. Genetic and Lethality Studies. *Genetics* **95**: 929-944
- Niderman T, Genetet I, Bruyère T, Gees R, Stintzi A, Legrand M, Fritig B, Möisinger E** (1995) Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.* **108**(1): 17-27
- Nielsen TH, Rung JH, Villadsen D** (2004) Fructose-2,6-bisphosphate: a traffic signal in plant metabolism. *Trends Plant Sci.* **9**: 1360-1385
- Qi X, Li ZH, Jiang LL, Yu XM, Ngezhayo F, Liu B** (2010) Grain-Yield Heterosis in *Zea mays* L. Shows Positive Correlation with Parental Difference in CHG Methylation. *Crop Sci.* **50**: 2338-2346
- Quigg A, Beardall J** (2003) Protein turnover in relation to maintenance metabolism at low photon flux in two marine microalgae. *Plant, Cell & Environment* **26**: 693-703

- Ribaut JM, Jiang C, GonzalezdeLeon D, Edmeades GO, Hoisington DA** (1997) Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize .2. Yield components and marker-assisted selection strategies. *Theor. Appl. Genet.* **94**: 887-896
- Ritchie SW, Hanway JJ, Benson GO** (1993). How a corn plant develops. Special Report No. 48, Iowa State University, Ames. IA.
- Rood SB, Buzzell RI, Mander LN, Pearce D, Pharis RP** (1988) Gibberellins - a Phytohormonal Basis for Heterosis in Maize. *Science* **241**: 1216-1218
- Ruepp A, Zollner A, Maier D, Albermann K, Hani J, Mokrejs M, et al.** (2004) The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *In*, Vol 32, p 5539-5545
- Sakamoto T, Matsuoka M** (2008) Identifying and exploiting grain yield genes in rice. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**: 209-214
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989). Molecular Cloning – A Laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Saumet A, Lecellier C-H** (2006) Anti-viral RNA silencing: do we look like plants? *In*, Vol 3, p 3
- Scheets K** (1998) Maize Chlorotic Mottle Machlomovirus and Wheat Streak Mosaic Rymovirus Concentrations Increase in the Synergistic Disease Corn Lethal Necrosis. *Virology* **242**: 28-38
- Schmalstig JG, Hitz WD** (1987) Contributions of sucrose synthase and invertase to the metabolism of sucrose in developing leaves: estimation by alternative substrate utilization. *Plant Physiol* **85**: 407-412
- Schmitt HD** (2010) Dsl1p/Zw10: common mechanisms behind tethering vesicles and microtubules. *Trends Cell Biol.* 20(5): 257-68
- Schnell FW, Cockerham CC** (1992) Multiplicative vs. Arbitrary Gene Action in Heterosis. *In*, Vol 131, p 461-469
- Schön C, Dhillon B, Utz H, Melchinger A** (2010) High congruency of QTL positions for heterosis of grain yield in three crosses of maize. *Theor. Appl. Genet.* **120**: 321-332
- Schrag T, Möhring J, Maurer H, Dhillon B, Melchinger A, Piepho H-P, et al.** (2009) Molecular marker-based prediction of hybrid performance in maize using unbalanced data from multiple experiments with factorial crosses. *Theor. Appl. Genet.* **118**: 741-751
- Schrag TA, Maurer HP, Melchinger AE, Piepho HP, Peleman J, Frisch M** (2007) Prediction of single-cross hybrid performance in maize using haplotype blocks associated with QTL for grain yield. *Theor. Appl. Genet.* **114**: 1345-1355
- Schrag TA, Melchinger AE, Sorensen AP, Frisch M** (2006) Prediction of single-cross hybrid performance for grain yield and grain dry matter content in maize using AFLP markers associated with QTL. *Theor. Appl. Genet.* **113**: 1037-1047
- Semel Y, Nissenbaum J, Menda N, Zinder M, Krieger U, Issman N, et al.** (2006) Over-dominant quantitative trait loci for yield and fitness in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 12981-12986
- Sentner U** (2008) P1/HC-Pro aus dem Weizenstrichelmosaikvirus als Suppressoren des RNA silencing in Weizen. Dissertation, Universität Bayreuth: 149 S.
- Shoresh M, Harman GE** (2008) Genome-wide identification, expression and chromosomal location of the genes encoding chitinolytic enzymes in *Zea mays*. *Mol. Genet. Genomics* **280**: 173-185
- Shull GH** (1908) The composition of a field of maize. *Ann Breed Assoc* **4**: 296-301
- Shull GH** (1914) Duplicated genes for capsule from in *Bursa bursapastoris*. *Z Indukt Abstammungs u Vererbungslehre* **12**: 97-149
- Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L, et al.** (2001) On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* **107**: 465-476

- Smith OS, Smith JSC, Bowen SL, Tenborg RA, Wall SJ** (1990) Similarities among a Group of Elite Maize Inbreds as Measured by Pedigree, F1 Grain-Yield, Grain-Yield, Heterosis, and Rflps. *Theor. Appl. Genet.* **80**: 833-840
- Song RT, Messing J** (2003) Gene expression of a gene family in maize based on noncollinear haplotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 9055-9060
- Spillane C, Vielle-Calzada JP, Grossniklaus U** (2000) Parent-of-origin effects and seed development: Genetics and epigenetics. In: Hui TH, Khachatourians GG, McHughen A, Nip WK, Scorza R (eds) *Transgenic Plants and Crops*, New York:Marcel-Dekker Inc.
- Sprague GF** (1983) Heterosis in maize: theory and practice. *Monogr. Theor. Appl. Genet.* **6**: 47-70
- Sprague GF, Russell WA** (1956) Some evidence on type of gene action involved in yield heterosis in maize. Tokyo & Kyoto: Proc Int Genet Symp: 522-526
- Sprague GF, Tatum LA** (1942) General vs. specific combining ability in single crosses of corn. *J. Amer. Soc. Agron.* **34**: 923-932
- Springer NM, Stupar RM** (2007) Allelic variation and heterosis in maize: How do two halves make more than a whole? *Genome Res.* **17**: 264-275
- Steinfath M, Gärtner T, Lisek J, Meyer R, Altmann T, Willmitzer L, et al.** (2010) Prediction of hybrid biomass in *Arabidopsis thaliana* by selected parental SNP and metabolic markers. *Theor. Appl. Genet.* **120**: 239-247
- Stenger DC, Hall JS, Choi IR, French R** (1998) Phylogenetic relationships within the family Potyviridae: wheat streak mosaic virus and brome streak mosaic virus are not members of the genus Rymovirus. *Phytopathology* **88**: 782-787
- Stenger DC, Young BA, Qu F, Morris TJ, French R** (2007) Wheat streak mosaic virus lacking helper component-proteinase is competent to produce disease Synergism in double infections with Maize chlorotic mottle virus. *Phytopathology* **97**: 1213-1221
- Stokes D, Fraser F, Morgan C, O'Neill CM, Dreos R, Magusin A, et al.** (2010) An association transcriptomics approach to the prediction of hybrid performance. *Mol. Breed.* **26**: 91-106
- Stuber CW** (1994) Heterosis in plant breeding. *Plant Breed Rev* **12**: 227-251
- Stuber CW, Lincoln SE, Wolff DW, Helentjaris T, Lander ES** (1992) Identification of Genetic-Factors Contributing to Heterosis in a Hybrid from 2 Elite Maize Inbred Lines Using Molecular Markers. *Genetics* **132**: 823-839
- Stupar RM, Gardiner JM, Oldre AG, Haun WJ, Chandler VL, Springer NM** (2008) Gene expression analyses in maize inbreds and hybrids with varying levels of heterosis. *BMC Plant Biol.* **8**: 33
- Stupar RM, Springer NM** (2006) Cis-transcriptional variation in maize inbred lines B73 and Mo17 leads to additive expression patterns in the F-1 hybrid. *Genetics* **173**: 2199-2210
- Sun QX, Ni ZF, Liu ZY** (1999) Differential gene expression between wheat hybrids and their parental inbreds in seedling leaves. *Euphytica* **106**: 117-123
- Swanson-Wagner RA, Jia Y, DeCook R, Borsuk LA, Nettleton D, Schnable PS** (2006) All possible modes of gene action are observed in a global comparison of gene expression in a maize F-1 hybrid and its inbred parents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 6805-6810
- Thiemann A, Fu J, Schrag TA, Melchinger AE, Frisch M, Scholten S** (2010) Correlation between parental transcriptome and field data for the characterization of heterosis in *Zea mays* L. *Theor. Appl. Genet.* **120**: 401-413
- Thiemann A, Meyer S, Scholten S** (2009) Heterosis in plants: Manifestation in early seed development and prediction approaches to assist hybrid breeding. *Chinese Science Bulletin* **54**: 2363-2375

- Tollenaar M, Ahmadzadeh A, Lee EA** (2004) Physiological basis of heterosis for grain yield in maize. *Crop Sci.* **44**: 2086-2094
- Tracy WF, Chandler MA** (2008) The Historical and Biological Basis of the Concept of Heterotic Patterns in Corn Belt Dent Maize. In *Plant Breeding: The Arnel R. Hallauer International Symposium*. Blackwell Publishing, p 219-233
- Tran RK, Zilberman D, de Bustos C, Ditt RF, Henikoff JG, Lindroth AM, et al.** (2005) Chromatin and siRNA pathways cooperate to maintain DNA methylation of small transposable elements in Arabidopsis. *Genome Biol.* **6**: 11
- Tuberosa R, Salvi S** (2009) QTL for Agronomic Traits in Maize Production. In *Handbook of Maize: Its Biology* Edited by: Bennetzen JL, Hake SC. New York: Springer. p 501-541
- Uzarowska A, Keller B, Piepho HP, Schwarz G, Ingvaridsen C, Wenzel G, et al.** (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
- Vaistij FnE, Jones L, Baulcombe DC** (2002) Spreading of RNA Targeting and DNA Methylation in RNA Silencing Requires Transcription of the Target Gene and a Putative RNA-Dependent RNA Polymerase. In, Vol 14, p 857-867
- Valli A, Martin-Hernandez AM, Lopez-Moya JJ, Garcia JA** (2006) RNA silencing suppression by a second copy of the P1 serine protease of Cucumber vein yellowing Ipomovirus, a member of the family Potyviridae that lacks the cysteine protease HCPro. *J. Virol.* **80**: 10055-10063
- Vlieghe K, Inzé D, Veylder LD** (2007) Physiological Relevance and Molecular Control of the Endocycle in Plants. In *Cell Cycle Control and Plant Development* Edited by: Dirk Inzé. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 227-248
- Voinnet O** (2005) Induction and suppression of RNA silencing: Insights from viral infections. *Nat. Rev. Genet.* **6**: 206-220
- Vroh Bi I, McMullen MD, Sanchez-Villeda H, Schroeder S, Gardiner J, Polacco M, et al.** (2006) Single nucleotide polymorphisms and insertion-deletions for genetic markers and anchoring the maize fingerprint contig physical map. *Crop Sci.* **46**: 12-21
- Vuylsteke M, Kuiper M, Stam P** (2000) Chromosomal regions involved in hybrid performance and heterosis: their AFLP-based identification and practical use in prediction models. *Heredity* **85**: 208-218
- 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**: 1267-1275
- Wei G, Tao Y, Liu G, et al.** (2009) A transcriptomic analysis of superhybrid rice LYP9 and its parents. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 7695-7701
- Went FW** (1928). Wuchsstoff und Wachstum. *Rec. Trav. Bot. Neerland.* 24:1-116.
- White RE, Dickinson JR, Semple CA, Powell DJ, Berry C** (2011) The retroviral proteinase active site and the N-terminus of Ddi1 are required for repression of protein secretion. *FEBS Lett.* 585(1): 139-42
- Wittkopp PJ, Haerum BK, Clark AG** (2004) Evolutionary changes in cis and trans gene regulation. *Nature* **430**: 85-88
- Wu L, Zhang QQ, Zhou HY, Ni FR, Wu XY, Qi YJ** (2009) Rice MicroRNA Effector Complexes and Targets. *Plant Cell* **21**: 3421-3435
- Wu L, Zhou H, Zhang Q, Zhang J, Ni F, Liu C, et al.** (2010) DNA Methylation Mediated by a MicroRNA Pathway. *Molecular Cell* **38**: 465-475
- Xiao JH, Li JM, Yuan LP, Tanksley SD** (1995) Dominance Is the Major Genetic-Basis of Heterosis in Rice as Revealed by QTL Analysis Using Molecular Markers. *Genetics* **140**: 745-754

- Xie ZS, Wang JQ, Cao ML, Zhao CF, Zhao K, Shao JM, et al.** (2006) Pedigree analysis of an elite rice hybrid using proteomic approach. *Proteomics* **6**: 474-486
- Xie ZX, Johansen LK, Gustafson AM, Kasschau KD, Lellis AD, Zilberman D, et al.** (2004) Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol.* **2**: 642-652
- Xiong LZ, Xu CG, Maroof MAS, Zhang QF** (1999) Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Mol. Gen. Genet.* **261**: 439-446
- Ye KQ, Malinina L, Patel DJ** (2003) Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* **426**: 874-878
- Yu SB, Li JX, Tan YF, Gao YJ, Li XH, Zhang QF, et al.** (1997) Importance of epistasis as the genetic basis of heterosis in an elite rice hybrid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 9226-9231
- Zhang M, Yan H, Zhao N, Lin X, Pang J, Xu K, et al.** (2007) Endosperm-specific hypomethylation, and meiotic inheritance and variation of DNA methylation level and pattern in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) inter-strain hybrids. *Theor. Appl. Genet.* **115**: 195-207
- Zhao W, Canaran P, Jurkuta R, Fulton T, Glaubitz J, Buckler E, et al.** (2006) Panzea: a database and resource for molecular and functional diversity in the maize genome. *Nucleic Acids Res.* **34**: D752-D757
- Zhao X, Chai Y, Liu B** (2007) Epigenetic inheritance and variation of DNA methylation level and pattern in maize intra-specific hybrids. *Plant Science* **172**: 930-938
- Zhu Y, Fu JJ, Zhang JP, Liu TS, Jia ZW, Wang JS, et al.** (2009) Genome-wide analysis of gene expression profiles during ear development of maize. *Plant Mol. Biol.* **70**: 63-77
- Zilberman D, Cao XF, Jacobsen SE** (2003) ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* **299**: 716-719

7 Anhang

7.1 Neuannotation der 46k-Arrays durch Blast2GO

Die Neuannotation des 46k-Arrays des „Maize Oligonucleotide Array Projects“ ist bis zum Zeitpunkt ihrer geplanten Veröffentlichung unter folgenden Links als Excel-Tabelle (xls und xlsx-Format) verfügbar:

http://www.biologie.uni-hamburg.de/bzf/ebbt/46kArray_Blast2GO_Annotation.xls
http://www.biologie.uni-hamburg.de/bzf/ebbt/46kArray_Blast2GO_Annotation.xlsx

Die ursprüngliche Annotation befindet sich unter <http://www.maizearray.org>.

7.2 Hybridmerkmal korrelierte Gene

Eine Liste der Hybridmerkmal (MPH Kornertrag, Hybridleistung Kornertrag, Hybridleistung Korntockenmasse) korrelierten Gene findet sich im Anhang der Veröffentlichung Thiemann *et al.* (2010) (Supplementary material 2).

7.3 In silico Lokalisierung im Genom der Linie B73

Tabelle 11: Hybridleistung von Kornertrag korrelierte Gene, die mit genomischen Fragmenten mit statistisch erhöhter Gendichte korrelierter Gene, auf dem B73-Genom kolokalisieren.

Fragment	Oligo_ID	Chr.	Bit-score	E-Wert	Identität	Lücken	Start [bp]	End [bp]
qgyld1.12	MZ00024269	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	118876055	118876124
	MZ00025324	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	114917033	114917102
	MZ00027151	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	122731393	122731462
	MZ00030651	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	120360800	120360869
	MZ00036384	1	118 bits (130)	2.00E-25	68/70 (97%)	0/70 (0%)	119039534	119039603
qgyld1.14	MZ00038585	1	96.9 bits (106)	6.00E-19	53/53 (100%)	0/53 (0%)	114916966	114917018
	MZ00019488	1	93.3 bits (102)	7.00E-18	55/56 (98%)	1/56 (1%)	143890399	143890454
	MZ00022715	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	138718734	138718803
	MZ00024308	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	137046344	137046413
	MZ00030697	1	82.4 bits (90)	1.00E-14	61/71 (85%)	8/71 (11%)	139682533	139682600
qgyld1.16	MZ00035219	1	66.2 bits (72)	1.00E-09	38/39 (97%)	0/39 (0%)	143891710	143891748
	MZ00005096	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	156572388	156572457
	MZ00017387	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	162284436	162284505
	MZ00017483	1	120 bits (132)	5.00E-26	70/71 (98%)	1/71 (1%)	158732692	158732762
	MZ00025579	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	156198838	156198907
	MZ00042146	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	155669015	155669084
	MZ00043699	1	89.7 bits (98)	9.00E-17	70/88 (79%)	18/88 (20%)	164499376	164499463
	MZ00044238	1	66.2 bits (72)	1.00E-09	38/39 (97%)	0/39 (0%)	161563138	161563176
qgyld3.4	MZ00044652	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	155720099	155720168
	MZ00004234	3	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	36904908	36904977
	MZ00014509	3	122 bits (134)	1.00E-26	69/70 (98%)	0/70 (0%)	36132991	36133060
	MZ00015106	3	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	31062185	31062254
	MZ00016795	3	122 bits (134)	1.00E-26	67/67 (100%)	0/67 (0%)	32203818	32203884
	MZ00019360	3	122 bits (134)	1.00E-26	69/70 (98%)	0/70 (0%)	36260442	36260511
	MZ00021342	3	122 bits (134)	1.00E-26	69/70 (98%)	0/70 (0%)	32080930	32080999
	MZ00022017	3	114 bits (126)	2.00E-24	63/63 (100%)	0/63 (0%)	40288916	40288978
	MZ00023174	3	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	36766324	36766393
	MZ00024547	3	122 bits (134)	1.00E-26	69/70 (98%)	0/70 (0%)	33235377	33235446
	MZ00028741	3	69.8 bits (76)	8.00E-11	41/43 (95%)	0/43 (0%)	37027457	37027499
	MZ00029155	3	118 bits (130)	2.00E-25	68/70 (97%)	0/70 (0%)	32449528	32449597
	MZ00031268	3	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	33641608	33641677
MZ00036400	3	109 bits (120)	9.00E-23	65/68 (95%)	0/68 (0%)	35979336	35979403	

Fortsetzung Tabelle 11

Fragment	Oligo_ID	Chr.	Bit-score	E-Wert	Identität	Lücken	Start [bp]	Ende [bp]
qgyld3.13	MZ00005805	3	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	131075597	131075666
	MZ00013316	3	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	132445907	132445976
	MZ00013750	3	107 bits (118)	3.00E-22	67/71 (94%)	2/71 (2%)	130898673	130898743
	MZ00014953	3	100 bits (110)	5.00E-20	55/55 (100%)	0/55 (0%)	125513256	125513310
	MZ00018474	3	120 bits (132)	5.00E-26	70/71 (98%)	1/71 (1%)	131459304	131459374
	MZ00022007	3	75.2 bits (82)	2.00E-12	41/41 (100%)	0/41 (0%)	133581174	133581214
	MZ00022841	3	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	132623277	132623346
	MZ00025108	3	122 bits (134)	1.00E-26	69/70 (98%)	0/70 (0%)	131053900	131053969
	MZ00026205	3	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	127291527	127291596
	MZ00028488	3	107 bits (118)	3.00E-22	65/69 (94%)	0/69 (0%)	125711874	125711942
	MZ00029320	3	78.8 bits (86)	2.00E-13	45/46 (97%)	0/46 (0%)	131389927	131389972
	MZ00029615	3	122 bits (134)	1.00E-26	69/70 (98%)	0/70 (0%)	131236616	131236685
	MZ00035131	3	80.6 bits (88)	5.00E-14	44/44 (100%)	0/44 (0%)	125334839	125334882
	MZ00037910	3	69.8 bits (76)	8.00E-11	38/38 (100%)	0/38 (0%)	133926939	133926976
	MZ00039601	3	55.4 bits (60)	2.00E-06	53/68 (77%)	0/68 (0%)	131879573	131879640
	MZ00041750	3	69.8 bits (76)	8.00E-11	43/45 (95%)	2/45 (4%)	125334852	125334894
MZ00041857	3	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	130178205	130178274	
MZ00044305	3	82.4 bits (90)	1.00E-14	47/48 (97%)	0/48 (0%)	132446462	132446509	
MZ00055519	3	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	129027968	129028037	
qgyld7.2	MZ00001274	7	98.7 bits (108)	2.00E-19	58/59 (98%)	1/59 (1%)	11816045	11816103
	MZ00005939	7	114 bits (126)	2.00E-24	68/70 (97%)	1/70 (1%)	19471985	19472053
	MZ00013526	7	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	11461318	11461387
	MZ00015150	7	96.9 bits (106)	6.00E-19	53/53 (100%)	0/53 (0%)	19373913	19373965
	MZ00028261	7	122 bits (134)	1.00E-26	69/70 (98%)	0/70 (0%)	20191443	20191512
	MZ00035748	7	113 bits (124)	8.00E-24	67/70 (95%)	0/70 (0%)	19502008	19502077
	MZ00037595	7	95.1 bits (104)	2.00E-18	63/69 (91%)	1/69 (1%)	19225722	19225790
	MZ00038982	7	98.7 bits (108)	2.00E-19	62/67 (92%)	0/67 (0%)	11553254	11553320
	MZ00042709	7	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	16720294	16720363
	MZ00042990	7	102 bits (112)	1.00E-20	59/61 (96%)	0/61 (0%)	20160685	20160745
	MZ00043830	7	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	13857964	13858033
	MZ00043831	7	102 bits (112)	1.00E-20	70/81 (86%)	11/81 (13%)	13858025	13858105
	MZ00055863	7	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	12134048	12134117
	MZ00057208	7	91.5 bits (100)	1.00E-17	50/50 (100%)	0/50 (0%)	11073420	11073469
	MZ00057303	7	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	11460687	11460756
	qgyld8.15	MZ00014867	8	118 bits (130)	2.00E-25	68/70 (97%)	0/70 (0%)	145243611
MZ00015406		8	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	145511516	145511585
MZ00016641		8	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	151424316	151424385
MZ00018062		8	75.2 bits (82)	2.00E-12	41/41 (100%)	0/41 (0%)	150500364	150500404
MZ00020326		8	105 bits (116)	1.00E-21	66/70 (94%)	2/70 (2%)	148253743	148253810
MZ00020432		8	98.7 bits (108)	2.00E-19	66/70 (94%)	3/70 (4%)	149964181	149964247
MZ00022397		8	62.6 bits (68)	1.00E-08	42/46 (91%)	1/46 (2%)	151720500	151720544
MZ00025896		8	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	152261734	152261803
MZ00026928		8	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	152104196	152104265
MZ00027736		8	118 bits (130)	2.00E-25	67/68 (98%)	0/68 (0%)	153467033	153467100
MZ00030743		8	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	154678177	154678246
MZ00030919		8	96.9 bits (106)	6.00E-19	62/68 (91%)	0/68 (0%)	144730272	144730339
MZ00031150		8	120 bits (132)	5.00E-26	70/71 (98%)	1/71 (1%)	153279347	153279417
MZ00031307		8	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	145367041	145367110
MZ00032406		8	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	145229882	145229951
MZ00040498		8	120 bits (132)	5.00E-26	66/66 (100%)	0/66 (0%)	148253820	148253885
MZ00041353	8	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	145884997	145885066	
MZ00041708	8	91.5 bits (100)	2.00E-17	63/70 (90%)	6/70 (8%)	145243801	145243864	
MZ00044473	8	105 bits (116)	1.00E-21	60/61 (98%)	0/61 (0%)	145885158	145885218	

Die Tabelle zeigt die genomischen Fragmente (qgyld) mit erhöhter Dichte Hybridleistung von Kornerttrag korrelierter Gene. Ebenfalls gezeigt sind die Oligo-IDs (www.maizearray.org) der kolokalisierten Hybridleistung korrelierter Gene, sowie die Ergebnisse der Blastn-Suche der *in silico* Lokalisierung (Kapitel 2.2.7 und 3.6). Die gezeigten Blastn-Ergebnisse der Oligos umfassten unter Anderem deren genaue physikalische Position (Start [bp], Ende [bp]) auf dem entsprechenden Chromosom (Chr.) des B73 Genoms.

Tabelle 12: MPH von Kornertrag korrelierte Gene, die mit genomischen Fragmenten mit statistisch erhöhter Gendichte korrelierter Gene, auf dem B73-Genom kolokalisieren.

Fragment	Oligo_ID	Chr.	Bit-score	E-Wert	Identität	Lücken	Start [bp]	Ende [bp]
hgylid1.1	MZ00004146	1	73.4 bits (80)	7.00E-12	48/53 (90%)	5/53 (9%)	12852165	12852212
	MZ00005424	1	73.4 bits (80)	7.00E-12	40/40 (100%)	0/40 (0%)	6800998	6801037
	MZ00007100	1	118 bits (130)	2.00E-25	65/65 (100%)	0/65 (0%)	11216485	11216549
	MZ00012891	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	11814552	11814621
	MZ00012935	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	2848978	2849047
	MZ00014788	1	118 bits (130)	2.00E-25	68/70 (97%)	0/70 (0%)	6509563	6509632
	MZ00014841	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	7351430	7351499
	MZ00014842	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	7347998	7348067
	MZ00018016	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	3206394	3206463
	MZ00021226	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	11909149	11909218
	MZ00024567	1	122 bits (134)	1.00E-26	69/70 (98%)	0/70 (0%)	11211919	11211988
	MZ00026957	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	7263737	7263806
	MZ00027322	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	8260923	8260992
	MZ00027444	1	118 bits (130)	2.00E-25	67/68 (98%)	0/68 (0%)	11148183	11148250
	MZ00029251	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	12905753	12905822
	MZ00029709	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	2419999	2420068
	MZ00030283	1	122 bits (134)	1.00E-26	69/70 (98%)	0/70 (0%)	4975409	4975478
	MZ00030460	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	7157881	7157950
	MZ00030810	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	7322842	7322911
	MZ00032512	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	6220405	6220474
	MZ00039328	1	109 bits (120)	9.00E-23	66/70 (94%)	0/70 (0%)	6772411	6772480
	MZ00039473	1	82.4 bits (90)	1.00E-14	60/70 (85%)	0/70 (0%)	7829663	7829732
	MZ00042322	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	8510432	8510501
	MZ00044381	1	93.3 bits (102)	7.00E-18	63/70 (90%)	2/70 (2%)	5504942	5505009
MZ00044382	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	5505058	5505127	
MZ00055574	1	113 bits (124)	8.00E-24	67/70 (95%)	0/70 (0%)	12394476	12394545	
hgylid1.8	MZ00000784	1	118 bits (130)	2.00E-25	68/70 (97%)	0/70 (0%)	103493561	103493630
	MZ00015356	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	106293000	106293069
	MZ00015632	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	105748484	105748553
	MZ00016408	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	104510903	104510972
	MZ00032590	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	98856589	98856658
	MZ00036618	1	122 bits (134)	1.00E-26	69/70 (98%)	0/70 (0%)	101937859	101937928
hgylid1.14	MZ00043794	1	73.4 bits (80)	7.00E-12	40/40 (100%)	0/40 (0%)	104969246	104969285
	MZ00043871	1	82.4 bits (90)	1.00E-14	67/86 (77%)	18/86 (20%)	105687296	105687381
	MZ00004251	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	189631181	189631250
	MZ00020921	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	191842691	191842760
	MZ00027976	1	122 bits (134)	1.00E-26	69/70 (98%)	0/70 (0%)	181718473	181718542
	MZ00028245	1	104 bits (114)	4.00E-21	65/70 (92%)	0/70 (0%)	186861576	186861645
	MZ00031657	1	82.4 bits (90)	1.00E-14	45/45 (100%)	0/45 (0%)	182240973	182241017
	MZ00033202	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	190068385	190068454
	MZ00039034	1	66.2 bits (72)	1.00E-09	36/36 (100%)	0/36 (0%)	187944075	187944110
	MZ00041260	1	116 bits (128)	6.00E-25	64/64 (100%)	0/64 (0%)	192279844	192279907
	MZ00042074	1	82.4 bits (90)	1.00E-14	45/45 (100%)	0/45 (0%)	190548436	190548480
	MZ00043328	1	120 bits (132)	5.00E-26	70/71 (98%)	1/71 (1%)	184544882	184544952
	MZ00043904	1	118 bits (130)	2.00E-25	65/65 (100%)	0/65 (0%)	187944032	187944096
	MZ00044058	1	96.9 bits (106)	6.00E-19	55/56 (98%)	0/56 (0%)	180679450	180679505
hgylid2.6	MZ00055420	1	122 bits (134)	1.00E-26	69/70 (98%)	0/70 (0%)	187921221	187921290
	MZ00055925	1	118 bits (130)	2.00E-25	67/68 (98%)	0/68 (0%)	191771213	191771280
	MZ00057214	1	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	180200697	180200766
	MZ00004615	2	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	79377346	79377415
	MZ00017189	2	96.9 bits (106)	6.00E-19	64/70 (91%)	2/70 (2%)	69623425	69623492
	MZ00028659	2	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	76901573	76901642
hgylid3.7	MZ00040522	2	80.6 bits (88)	5.00E-14	64/78 (82%)	13/78 (16%)	77787831	77787903
	MZ00040530	2	104 bits (114)	4.00E-21	57/57 (100%)	0/57 (0%)	77787865	77787921
	MZ00017501	3	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	83891235	83891304
	MZ00018172	3	127 bits (140)	3.00E-28	70/70 (100%)	0/70 (0%)	86740057	86740126
	MZ00032961	3	123 bits (136)	4.00E-27	68/68 (100%)	0/68 (0%)	91887993	91888060
MZ00040180	3	68.0 bits (74)	3.00E-10	40/42 (95%)	0/42 (0%)	83196620	83196661	

Die Tabelle zeigt die genomischen Fragmente (hgylid) mit erhöhter Dichte allein MPH von Kornertrag korrelierter Gene. Ebenfalls gezeigt sind die Oligo-IDs (www.maizearray.org) der kolokalisierten MPH korrelierter Gene, sowie die Ergebnisse der Blastn-Suche der *in silico* Lokalisierung (Kapitel 2.2.7 und 3.6). Die gezeigten Blastn-Ergebnisse der Oligos umfassten unter Anderem deren genaue physikalische Position (Start [bp], Ende [bp]) auf dem entsprechenden Chromosom (Chr.) des B73 Genoms.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt zuallererst Dr. Stephan Scholten für die Möglichkeit ein solch spannendes Thema bearbeiten zu dürfen und für die herzliche, kompetente und hervorragende Betreuung die mir zu Teil wurde. Die Möglichkeit sich mit allen Anliegen, Ideen, und Sorgen an Herrn Dr. Scholten wenden zu können, machte die Arbeit mit Ihm zu einem großen Vergnügen.

Herrn Prof. Matthias Frisch möchte ich meinen besonderen Dank für die sehr gute Zusammenarbeit und für die Bereitschaft als Zweitgutachter zu fungieren aussprechen.

Dr. Junjie Fu danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Melchinger danke ich für die erfolgreiche Kooperation und für die Bereitstellung der Felddaten.

Bei Frau Dr. Heike Pospisil und Felix Seifert möchte ich mich für die hilfreichen Diskussionen bezüglich statistischer Fragestellungen bedanken.

Für die Bereitstellung der P1/HC-Pro Pflanzen möchte ich Herrn Dr. Jose Gutierrez-Marcos meinen Dank aussprechen.

Ein ganz besonderer Dank gebührt Sabina Miaskowska, Marlis Nissen, Dominika Rybka und Eva-Marina Kühnst und für ihre große Hilfe bei den Arbeiten im Gewächshaus und der Gewebekulturen im Labor. Ich danke ebenfalls der gesamten Arbeitsgruppe für die angenehme und zugleich kreative Atmosphäre. Die Arbeit, aber auch die kleinen Pausen und die gemeinsamen Ausflüge waren großartig und ich habe die gemeinsame Zeit sehr genossen.

Ein großer Dank geht natürlich auch an meine Eltern, meine Schwester und den Rest meiner Familie, deren Unterstützung mir bei der Bewältigung dieser Arbeit sehr geholfen hat. Ein großer Dank gilt meiner Freundin Annika Slavetic, die mich während der gesamten Zeit meines Studiums begleitet hat und der ich für diese gemeinsamen Jahre unendlich dankbar bin.

Zum Schluss möchte ich mich bei der Universität Hamburg für die Bereitstellung eines Promotionsstipendiums bedanken.