

ABA-Immunmodulierung sich entwickelnder Gerstenkaryopsen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von
Nicole S. Staroske
geboren am 18. Dezember 1981 in Quedlinburg

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. Klaus Humbeck
2. PD Dr. habil. Udo Conrad
3. Prof Dr. Eva Stöger

Halle, 10. November 2011

Verteidigungsdatum: 30.05.2012

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis

Tabellen und Abbildungen

1. Einleitung	1
1.1. Wichtige physiologische Funktionen von Abscisinsäure in vegetativen Organen	1
1.2. Die Karyopsenentwicklung der Gerste	3
1.3. Funktionen von Abscisinsäure in Samen	4
1.4. ABA-Biosynthese und -Katabolismus	6
1.5. ABA-Perzeption und -Signalweiterleitung	7
1.6. Strategien der ABA-Funktionsanalyse	9
1.7. Die scFv-vermittelte Immunmodulierung in Pflanzen	10
1.8. Zielstellung der Arbeit	13
2. Material	14
2.1. Pflanzenmaterial	14
2.2. Bakterienstämme	14
2.3. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	14
2.4. Medien und Antibiotika	15
2.5. Antikörper	15
2.6. Plasmide	16
2.7. Oligonukleotide	16
3. Methoden	18
3.1. Transformationstechniken	18
3.1.1. Transformation von Bakterien	18
3.1.2. Transformation von <i>Hordeum vulgare</i> und Regeneration transgener Pflanzen	18
3.2. Pflanzenanzucht und Materialentnahme	19
3.3. Keimungsanalysen	19
3.4. Analyse von Promotoraktivitäten in Karyopsen	19
3.5. DNA- und RNA-Analysetechniken	20
3.5.1. Isolierung genomischer DNA	20
3.5.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	20
3.5.3. Restriktionsspaltung, Dephosphorylierung und Ligation von DNA	21
3.5.4. Agarosegelelektrophorese und Elution von DNA-Fragmenten	21
3.5.5. Southern-Analyse	21
3.5.6. Quantitative Real-Time (qRT) PCR	22
3.5.7. Microarray-Analyse	23

3.6. Proteinbiochemische Arbeiten	26
3.6.1. Herstellung pflanzlicher Proteinextrakte	26
3.6.2. SDS-PAGE und Western Blot	26
3.6.3. Quantifizierung von Proteinen	27
3.6.4. Reinigung des anti-ABA scFv-Antikörpers aus Gerstenblättern	27
3.6.5. Überprüfen der Spezifität des anti-ABA scFv mittels ELISA	28
3.6.6. Kompetitiver ELISA zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D des anti-ABA scFv	29
3.7. Inhaltsstoffanalysen	29
3.7.1. Extraktion und Quantifizierung von Speicherproteinen	29
3.7.2. Bestimmung des Gesamtkohlenstoff- und -stickstoffgehaltes	29
3.7.3. Extraktion von Stärke und löslichen Zuckern und Aminosäuren	30
3.7.4. Bestimmung des Stärkegehaltes einer Probe	30
3.7.5. Glukose-, Fruktose- und Saccharosebestimmung	30
3.7.6. Aminosäurebestimmung in Gesamtkaryopsen	31
3.7.7. ABA-Messung	32
3.7.8. Metabolitbestimmung in maternalen und filialen Gewebefractionen	32
4. Ergebnisse	33
4.1. Die zur ABA-Immunmodulierung verwendeten Promotoren	33
4.1.1. Begründung für die Wahl der zur ABA-Immunmodulierung verwendeten Promotoren	33
4.1.2. Die Aktivität der verwendeten Promotoren	33
4.2. Konstruktion der Kassetten für die Expression des anti-ABA scFv in Gerste	34
4.3. Transformation und Regeneration primärtransgener Pflanzen	36
4.4. Bestimmung der Kopienzahl des anti-ABA scFv-Gens im Genom der Primärtransformanden	36
4.5. Expression des anti-ABA scFv in reifen Körnern	39
4.6. Expression des anti-ABA scFv in sich entwickelnden Karyopsen	41
4.7. Auswahl von Linien für weiterführende Analysen	41
4.8. Isolierung und funktionelle Charakterisierung des anti-ABA scFv Antikörpers aus Gerste	42
4.8.1. Spezifität der ABA-Bindung durch den anti-ABA scFv aus Gerste	42
4.8.2. Nachweis der Bindung des anti-ABA scFv aus Gerste an freie Abscisinsäure und Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D des scFv	42
4.9. Der vegetative Phänotyp der ABA-immunmodulierten T1-Gerstenpflanzen	43
4.10. Beeinflussung der ABA-Akkumulation in den Karyopsen durch die Expression des anti-ABA Antikörpers	44

4.11. Bestimmung von freier Abscisinsäure in den Karyopsen der immunmodulierten Gerstenlinien	45
4.11.1. Quantifizierung der anti-ABA scFv-Akkumulation während der Gerstenkaryopsenentwicklung	45
4.11.2. ABA-Bestimmung in sich entwickelnden Gerstenkaryopsen	46
4.11.3. Berechnung von freier Abscisinsäure in den immunmodulierten Karyopsen	48
4.12. Phänotyp der ABA-immunmodulierten Karyopsen	48
4.13. Keimung der ABA-immunmodulierten Karyopsen	50
4.14. Tausendkorngewicht und Speicherstoffe der reifen ABA-immunmodulierten Karyopsen	51
4.14.1. Das Tausendkorngewicht	51
4.14.2. Der Stärke- und Gesamtkohlenstoffgehalt	52
4.14.3. Der Protein- und Gesamtstickstoffgehalt	53
4.15. Metabolitgehalte sich entwickelnder ABA-immunmodulierter Karyopsen	54
4.15.1. Veränderte Aminosäuregehalte in den ABA-immunmodulierten Karyopsen am 14. DAF	54
4.15.2. Die Zuckergehalte und –verhältnisse in den sich entwickelnden Karyopsen	56
4.15.3. Bestimmung von Metabolitgehalten in der maternalen und filialen Gewebefraktion sich entwickelnder Karyopsen	58
4.16. Genexpressionsanalyse in der maternalen und filialen Gewebefraktion immunmodulierter Gerstenkaryopsen	61
4.16.1. Differentielle Expression einiger ABA-Biosynthesegene in der filialen Fraktion der Linie 363	62
4.16.2. Spezifische Reaktionen auf die ABA-Immunmodulierung in der maternalen und der filialen Gewebefraktionen	63
4.16.3. Differentielle Expression von Genen der Signalweiterleitung in beiden Gewebefraktionen	65
4.16.4. Differentielle Expression von stressassoziierten Genen in beiden Gewebefraktionen	66
4.16.5. Differentielle Expression von Genen des Primärmetabolismus in der filialen Fraktion	66
4.16.6. Differentielle Expression von Genen der Speicherstoffbiosynthese in der filialen Fraktion	67
4.16.7. Differentielle Expression von Genen der Stärkeremobilisierung in der maternalen Fraktion	68
4.16.8. Differentielle Expression von zellteilungsassoziierten Genen in der maternalen Fraktion	68
4.16.9. Differentielle Expression von zellstreckungsassoziierten Genen in der maternalen Fraktion	70
5. Diskussion	81
5.1. Wie lässt sich der starke Überschuss an freier Abscisinsäure in den immunmodulierten Karyopsen erklären?	81

5.1.1 Die immunmodulierten Gerstenkaryopsen zeigen eine verstärkte ABA-Biosynthese	82
5.1.2. Die Regulation der ABA-Biosynthese und des ABA-Abbaus	83
5.1.3. Möglicherweise initiiert ein frühes ABA-Mangelsignal die verstärkte ABA-Akkumulation in den immunmodulierten Gerstenkaryopsen.	85
5.2. Veränderte Signalweiterleitung in Reaktion auf den erhöhten ABA-Gehalt	86
5.3. Reaktionen der filialen Kornteile auf den erhöhten ABA-Gehalt	88
5.4. Einfluss der ABA-Immunmodulierung auf die maternalen Gewebe der Karyopse	90
5.4.1. Warum reagieren die maternalen Gewebe auf die ABA-Immunmodulierung unter Kontrolle des 1Ax1-Prototors?	90
5.4.2. Im Perikarp wirken erhöhte ABA-Mengen offenbar wachstumsfördernd	92
5.4.3. Das Perikarp der Linie 363 zeigt eine dem programmierten Zelltod entgegenwirkende Genexpression	93
5.4.4. Die Stärkeremobilisierung in den maternalen Geweben wird vermutlich durch ABA gefördert	95
5.5. Die Sensitivität gegenüber ABA ist in den immunmodulierten Karyopsen während der späten Kornentwicklung möglicherweise verringert.	96
6. Zusammenfassung	99
7. Literatur	103
8. Anhang	128
8.1. Semiquantitative Western Blots zur Einschätzung der anti-ABA scFv-Akkumulation in sich entwickelnden Karyopsen verschiedener immunmodulierter Linien	128
8.2. Absolutwerte der Microarray-Signalintensitäten von zwischen Linie 363 und Wildtyp differentiell exprimierten Genen	133

Abkürzungsverzeichnis

Chemikalien (z.B. NaCl), Enzymbezeichnungen (z.B. EcoRI), Länder (u.a. USA), Maßeinheiten (z.B. ml, s, °C), Rechenoperationen (z.B. log), Akronyme (u.a. MADS-Box) sowie Puffer und Medien, die im Text näher erläutert werden, befinden sich nicht im Abkürzungsverzeichnis. Für ein besseres Verständnis werden aus dem Englischen und dem Latein übernommene Begriffe nicht übersetzt und in der Arbeit kursiv hervorgehoben.

AAO	Abscisinaldehydoxidase	DXP	D-1-Deoxyxylulose-5-Phosphat
ABA	Abscisinsäure	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ABA8H	ABA-8'-hydroxylase	engl.	englisch
Abb.	Abbildung	ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ABI	ABA-insensitiv	ELP	elastinähnliches Polypeptid
Ac	Acetat	EM	<i>early methionine</i>
ACC	1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure	engl.	englisch
ACS	ACC Synthase	ER	Endoplasmatisches Reticulum
ad.	lat. »zu«	EST	<i>expressed sequence tag</i>
ADC	Arginindecarboxylase	et al.	lat. »und andere« (<i>et alii</i>)
ADP	Adenosindiphosphat	Feb	Februar
<i>AGPase</i>	ADP-Glucose-Pyrophosphorylase	FW	Frischgewicht
Ah	<i>Arachis hypogaea</i>	fwd	engl. »vorwärts«
Amp ^r	Ampicillin-Resistenz	Fv	variables Fragment
ANOVA	Varianzanalyse	g	Erdbeschleunigung
AO	Aldehydoxidase	G6P	Glukose-6-Phosphat
AP2/EREBP	engl. <i>Apetala2/Ethylene-responsive element binding protein family</i>	GA	Gibberellinsäure
Arm	<i>armadillo</i>	GABA	γ-Aminobuttersäure
AQC	6-Aminoquinolyl-N-Hydroxy-Succinimidylcarbammat	GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
AS	Aminosäure	GC-NCIMS	<i>Gas Chromatographic-Negative-Ion Chemical Ionization Mass Spectrometry</i>
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GFP	Grünfluoreszierendes Protein
AtABA1	At Zeaxanthin-Epoxidase-Gen	H ₂ O _d	deionisiertes Wasser
bHLH	engl. <i>basic-helix-loop-helix</i>	H ₂ O _{dd}	doppelt deionisiertes Wasser
bp	Basenpaare	HAB	hypersensitiv gegenüber ABA
BR	Brassinosteroid	HR	Hypersensitive Reaktion
BSA	Rinderserumalbumin	HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i>
bZIP	engl. <i>basic leucine zipper</i>	HSF	Hitzschockfaktor
bzw.	beziehungsweise	HSP	Hitzschockprotein
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>	Hv	<i>Hordeum vulgare</i>
CCD	engl. <i>carotenoid cleavage dioxygenase</i>	ICA	engl. <i>independent component analysis</i>
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>	ID	Identifikationsnummer
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat	IgG	Immunglobulin G
c-myc	AS 408 - 439 des humanen Proto-Oncogens p62	Jun	Juni
cv.	Kultivar	Jul	Juli
Cy3	Carbocyanin 3	K _D	Dissoziationskonstante
DAF	engl. »Tage nach der Blüte« (<i>days after flowering</i>)	L.	Linnaeus, Carl von (1707–1778)
DH	Dehydrogenase	lat.	lateinisch
DNA	Desoxyribonukleinsäure	LB	engl. <i>left border</i>
DNase	Deoxyribonuclease	LEA	<i>late embryogenesis abundant</i>
		LeB4	LeguminB4
		LOB	<i>lateral organ boundaries</i>

LRR	<i>leucine-rich repeat</i>	T	Terminator
Lys	Lysin	T0	primärtransgene Pflanze
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>	T1	Nachkomme von T0-Pflanze
MAPKKK	MAPK Kinasekinase	T2	Nachkomme von T1-Pflanze
MCM	<i>mini chromosome maintenance</i>	T6P	Trehalose-6-phosphat
MCSU	Molybdenkofaktor-Sulfurase	Tab.	Tabelle
MEP	2-C-Methyl-D-Erythritol4-Phosphat	T-DNA	Transfer-DNA
MFT	<i>Mother of FT</i>	Tet ^r	Tetracyclin-Resistenz
min	Minuten	TF	Transkriptionsfaktor
MoCo	Molybdenkofaktor	TK	Topfkultur
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>	TNF	Tumornekrosefaktor
MW	Molekulargewicht	TPP	Trehalosephosphat-Phosphatase
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>	TPS	Trehalosephosphat-Synthase
NADP	Nicotinamidadenindinukleotid-phosphat	T _m	Schmelztemperatur
NCED	9-Cis-Epoxycarotenoid-Dioxygenase	TSP	gesamtlösliches Protein
NO	Stickstoffmonoxid	u.a.	unter anderem
Nos	Nopalinsynthase	Ubi	Ubiquitin
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm	UPLC	<i>Ultra performance liquid chromatography</i>
Os	<i>Oryza sativa</i>	Vf	<i>Vicia faba</i>
PAA	Polyarcylamid	UV	ultraviolett
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	vgl.	vergleiche
PAO	Polyaminoxidasen	V _H	variabler Teil der schweren Kette eines Antikörpers
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung	V _H H	Fragment eines Kamelidenantikörpers, der nur aus einem Paar schwerer Ketten besteht
PCA	Hauptkomponentenanalyse	V _L	variabler Teil der leichten Kette eines Antikörpers
PCD	programmierter Zelltod	Vol.	Volumen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	v/v	Volumen pro Volumen
pH	pH-Wert	WT	Wildtyp
PP2C	Typ-2C-Proteinphosphatase	w/v	Gewicht pro Volumen
PYL	engl. <i>PYR1-like proteins</i>	YEB	<i>yeast extract and beef</i>
PYR	engl. <i>pyrabactin resistance</i>	z.B.	zum Beispiel
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR	ZEP	Zeaxanthin Epoxidase
RB	engl. <i>right border</i>	Zm	<i>Zea mays</i>
RCAR	engl. <i>regulatory component of ABA receptor</i>	® und TM	registrierte Warenzeichen/Handelsmarken
rev	engl. »rückwärts« (<i>reverse</i>)	1x	einfach
RT	Raumtemperatur	2x	zweifach
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>	♂ / ♀	männlich / weiblich
RNA	Ribonucleinsäure	∞	unendlich
RNase	Ribonuclease		
ROS	reaktive Sauerstoffspezies		
scFv	<i>Single chain variable fragment</i>		
SDR	engl. <i>short-chain dehydrogenase/reductase</i>		
Sm ^r /Sp ^r	Streptomycin-/Spectinomycin-Resistenz		
SnRK	<i>SNF1-Related Protein Kinase</i>		
SNP	engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>		
SOC	<i>Super optimal broth with catabolite repression</i>		
SuSy	Saccharosesynthase		

Tabellen und Abbildungen

Tabelle	Seite
Tab. 1: Konzentrationsangaben der verwendeten Antibiotika.	15
Tab. 2: Antikörper für Western Blot und ELISA.	15
Tab. 3: Herkunft der verwendeten Plasmide und deren bakterielle Resistenz.	16
Tab. 4: Sequenzen der für Klonierungsarbeiten und zur Kopienzahlbestimmung verwendeten Oligonukleotide.	16
Tab. 5: Sequenzen der zur Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR verwendeten Oligonukleotide.	17
Tab. 6: Übersicht über die Ergebnisse der Kopienzahlbestimmung des anti-ABA scFv-Gens bei den Primärtransformanten durch Southern Blot und qRT-PCR.	38
Tab. 7: Übersicht über die für weitere Analysen ausgewählten transgenen Linien.	42
Tab. 8: Durch die Microarray-Analyse identifizierte differentiell exprimierte Gene in den Karyopsen der ABA-immunmodulierten Linie 363 im Vergleich zum Wildtyp.	72
Tab. 9: Durch die Microarray-Analyse identifizierte differentiell exprimierte Histongene in den Karyopsen der ABA-immunmodulierten Linie 363 im Vergleich zum Wildtyp.	80
Tab. 10: Normalisierte Absolutwerte der Genexpression von den durch die Microarray-Analyse identifizierten differentiell exprimierten Genen in den Karyopsen der ABA-immunmodulierten Linie 363 und dem Wildtyp.	133
Tab. 11: Normalisierte Absolutwerte der Genexpression von jeweils einem repräsentativen Histongen jeder Klasse, die durch die Microarray-Analyse als differentiell exprimiert identifiziert wurde.	145
Abbildung	Seite
Abb. 1: Effekt der Quantilnormalisierung.	25
Abb. 2: Enzymatische Reaktionen, die zur Bestimmung des Stärke- (A), Glukose-, Fruktose- und Saccharose-Gehaltes (B) einer Probe genutzt werden.	31
Abb. 3: Aktivität des Ubiquitin-Promotors und des 1Ax1-Promotors in sich entwickelnden Gerstenkaryopsen.	34
Abb. 4: Schematische Darstellung der Kassetten für die Expression des anti-ABA scFv.	36
Abb. 5: Southern Blot Analyse der genomischen DNA der Primärtransformanten.	37
Abb. 6: Semiquantitative Bestimmung des Expressionsniveaus des anti-ABA scFv in reifen Karyopsen der Primärtransformanten.	40
Abb. 7: Menge des anti-ABA scFv in reifen Karyopsen der Primärtransformanten.	40
Abb. 8: Gegenüberstellung der anti-ABA scFv-Akkumulation in sich entwickelnden Karyopsen und in reifen trockenen Körnern (R) einer konstitutiv (Ubi) bzw. einer endospermspezifisch exprimierenden Linie (1Ax1).	41
Abb. 9: Bindung des anti-ABA scFv an ABA-BSA bzw. Oxazolone-BSA im direkten ELISA.	42
Abb. 10: Kompetitiver ELISA zur Darstellung der Bindung des gereinigten anti-ABA scFv an freie Abscisinsäure.	43
Abb. 11: Phänotypische Gegenüberstellung von im Gewächshaus kultivierten Wildtyp-Pflanzen und ABA-immunmodulierten T1-Pflanzen zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten.	44
Abb. 12: Abb. 12: ABA-Gehalt in reifen Wildtyp- bzw. immunmodulierten T2-Karyopsen.	44
Abb. 13: Anti-ABA scFv-Akkumulation in den sich entwickelnden Karyopsen der ABA-immunmodulierten Gerstenlinien bei scFv-Expression unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors (A) bzw. des 1Ax1-Promotors (B).	45

Abb. 14:	Gegenüberstellung der Akkumulation von anti-ABA scFv und ABA in reifen T2-Karyopsen der immunmodulierten Linien (Ernte Februar 2009).	46
Abb. 15:	ABA-Konzentration in sich entwickelnden WT-Karyopsen aus der Ernte im Februar 2009.	46
Abb. 16:	ABA-Gehalte von sich entwickelnden Wildtyp- und immunmodulierten T2-Karyopsen aus der Ernte Februar 2009.	47
Abb. 17:	Gehalte freier bzw. im Komplex mit dem anti-ABA scFv vorliegender Abscisinsäure in sich entwickelnden Karyopsen der immunmodulierten Gerstenlinien und des Wildtyps.	48
Abb. 18:	Handschnitte zur makroskopischen Darstellung des Knick-Phänotyps in Karyopsen der ubiquitär ABA-immunmodulierten Linie 337 (D, E, F) im Vergleich zu Wildtyp-Karyopsen (A, B, C).	49
Abb. 19:	Darstellung des Knick-Phänotyps in Cryoquerschnitten durch sich entwickelnde Karyopsen vom 14. DAF.	49
Abb. 20:	Penetranz des Knick-Phänotyps bei reifen ABA-immunmodulierten Karyopsen aus verschiedenen Ernten.	50
Abb. 21:	Keimfähigkeiten von ABA-immunmodulierten und Wildtyp-Karyopsen.	51
Abb. 22:	Tausendkorngewicht der reifen Karyopsen bei zwei unabhängig voneinander angezogenen Pflanzengruppen.	52
Abb. 23:	Stärke- (A.) und Gesamtkohlenstoffgehalt (B.) pro Einwaage in reifen Karyopsen bei drei unabhängig voneinander angezogenen Pflanzengruppen.	52
Abb. 24:	Prolamine (A), Albumine/Globuline (B) und Gesamtstickstoffgehalt (C) pro Einwaage in reifen immunmodulierten T2-Karyopsen im Vergleich zum Wildtyp bei drei unabhängig voneinander angezogenen Pflanzengruppen.	53
Abb. 25:	Hauptkomponentenanalyse der Aminosäuregehalte sich entwickelnder Gesamtkaryopsen von den ABA-immunmodulierten Linien und dem Wildtyp.	54
Abb. 26:	Übersicht über die im Vergleich zum Wildtyp veränderten Aminosäuregehalte in den Gesamtkaryopsen von immunmodulierten T1-Linien am 14. DAF.	55
Abb. 27:	Saccharose/Hexose-Verhältnis in den sich entwickelnden Karyopsen der immunmodulierten Linien sowie des Wildtyps.	57
Abb. 28:	Hexosegehalt (A.) bzw. Saccharosegehalt (B.) von Gesamtkaryopsen am 14. DAF bei drei unabhängig voneinander angezogenen Pflanzengruppen.	58
Abb. 29:	ICA basierend auf median-zentrierten und log ₁₀ -transformierten Metabolitdaten.	59
Abb. 30:	Zusammenfassung von im Vergleich zum Wildtyp veränderten Metabolitkonzentrationen in den maternalen und filialen Gewebefraktionen der endospermspezifisch ABA-immunmodulierten Gerstenlinie 363 (Ernte Februar 2009).	60
Abb. 31:	Saccharose-Hexose-Verhältnis in der maternalen und der filialen Fraktion sich entwickelnder Karyopsen der 1Ax1-Promotor Linie 363 und des Wildtyps.	61
Abb. 32:	Expressionsprofile von Genen der ABA-Biosynthese, die in der Linie 363 zu mindestens einem Entwicklungszeitpunkt eine im Vergleich zum Wildtyp veränderte Expression zeigen.	62
Abb. 33:	Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Genexpression in maternalen und filialen Geweben sich entwickelnder Karyopsen der ABA-immunmodulierten 1Ax1-Promotor Linie 363 und des Wildtyps.	63
Abb. 34:	Übersicht über die Anzahl der Microarray-Sequenzen, die in der Linie 363 eine im Vergleich zum Wildtyp veränderte Signalintensität zeigen.	64
Abb. 35:	Anzahl der zwischen der Linie 363 und dem Wildtyp differentiell exprimierten Gene in der filialen bzw. maternalen Gewebefraktion und deren Beteiligung an verschiedenen zellulären Prozessen.	65

Abb. 36:	Semiquantitativer Western Blot zur Einschätzung der anti-ABA scFv-Akkumulation in sich entwickelnden Karyopsen der in Tab. 2 gelisteten immunmodulierten Gerstenlinien am 7. DAF.	128
Abb. 37:	Semiquantitativer Western Blot zur Einschätzung der anti-ABA scFv-Akkumulation in sich entwickelnden Karyopsen der in Tab. 2 gelisteten immunmodulierten Gerstenlinien am 10. DAF.	129
Abb. 38:	Semiquantitativer Western Blot zur Einschätzung der anti-ABA scFv-Akkumulation in sich entwickelnden Karyopsen der in Tab. 2 gelisteten immunmodulierten Gerstenlinien am 14. DAF.	129 -130
Abb. 39:	Semiquantitativer Western Blot zur Einschätzung der anti-ABA scFv-Akkumulation in sich entwickelnden Karyopsen der in Tab. 2 gelisteten immunmodulierten Gerstenlinien am 20. DAF.	130
Abb. 40:	Abb. 40: Semiquantitativer Western Blot zur Einschätzung der anti-ABA scFv-Akkumulation in reifen Karyopsen der in Tab. 2 gelisteten immunmodulierten Gerstenlinien.	131 -132
Abb. 41:	Semiquantitativer Western Blot zur Einschätzung der anti-ABA scFv-Akkumulation in sich entwickelnden Karyopsen der immunmodulierten Gerstenlinie 335.	132

1. Einleitung

Im Jahre 1963 isolierten Ohkuma und Kollegen erstmals die Substanz Abscisin II. Ihre Applikation führte zur Abscission von Baumwollfrüchten von der Mutterpflanze (Ohkuma *et al.*, 1963). Nahezu zur gleichen Zeit isolierten Eagles und Wareing (1963) den Inhibitor Dormin aus Berg-Ahornblättern, der die Knospenruhe von Berg-Ahorn fördert und das apikale Wachstum von Birkenkeimlingen unterbindet. Chemische Analysen zeigten, dass es sich bei Abscisin II und Dormin um die gleiche Substanz handelte. Sie wird seit 1967 als Abscisinsäure (ABA) bezeichnet. ABA reguliert eine Vielzahl von physiologischen und entwicklungsbiologischen Prozessen und spielt während vieler Phasen des pflanzlichen Lebenszyklus eine bedeutende Rolle (Himmelbach *et al.*, 1998; Finkelstein *et al.*, 2002; Christmann *et al.*, 2006; Finkelstein *et al.*, 2008; Cutler *et al.*, 2010; Raghavendra *et al.*, 2010). Die wichtigsten Aufgaben dieses Hormons sollen im Folgenden vorgestellt werden.

1.1. Wichtige physiologische Funktionen von Abscisinsäure in vegetativen Organen

Eine der bedeutendsten Funktionen von ABA während des vegetativen Wachstums ist die Aufrechterhaltung der osmotischen Homöostase unter ungünstigen Umweltbedingungen. Stressfaktoren wie Trockenheit, Kälte und hohe Bodensalzkonzentrationen bergen die Gefahr der Dehydrierung und führen zu einer Erhöhung des endogenen ABA-Gehaltes in vegetativen Organen. Eine erhöhte ABA-Konzentration in den Schließzellen löst das Schließen der Spaltöffnungen aus und inhibiert deren lichtbedingte Öffnung (Sirichandra *et al.*, 2009b). Auf diese Weise wird der Wasserverlust durch die Transpiration vermindert. In Wurzeln zeigt ABA gewebespezifische Effekte. Ein unter Trockenstress erhöhter ABA-Gehalt erhält das Wachstum der Hauptwurzel aufrecht (Saab *et al.*, 1990), inhibiert aber die Bildung von Seitenwurzeln (Guo *et al.*, 2009). Der resultierende Phänotyp ist ein weniger dichtes aber tiefes Wurzelsystem, was günstig für die Wasseraufnahme bei Trockenheit ist. Weiterhin ist ABA an der Mykorrhizierung von Wurzeln beteiligt. Dies ist ökologisch sinnvoll, da Trockenstress die ABA-Produktion erhöht. Diese trägt wiederum durch die Förderung der Mykorrhiza-Bildung zur Anpassung der Pflanze an den Stress bei. Tomatenpflanzen, die nicht in der Lage sind ABA zu produzieren, zeigen eine signifikant verringerte Ausbildung arbuskulärer Mykorrhizae (Herrera-Medina *et al.*, 2007). Umgekehrt enthalten mykorrhizierte Pappelwurzeln mehr ABA als Wurzeln ohne Mykorrhiza (Luo *et al.*, 2009). Dieser Effekt verstärkt sich bei einem erhöhten Salzgehalt des Bodens. Können Wasseraufnahme und Wasserverlust nicht durch primäre adaptive Antworten ausbalanciert werden, so steuert ABA verschiedene Mechanismen, um eine Austrocknung zu vermeiden und/oder zu tolerieren. Hierzu gehört die Regulation stressresponsiver Gene. Besonders die Akkumulation osmokompatibler Substanzen und die regulierte Synthese von Dehydrinen und LEA-Proteinen spielen sowohl bei der Zurückhaltung von Wasser als auch beim Schutz von Proteinen und Membranen eine wichtige Rolle (Zhu, 2002). Transgene Pflanzen mit einem erhöhten ABA-Gehalt zeigen häufig eine größere Toleranz gegenüber abiotischen Stressfaktoren (Nambara und Marion-Poll, 2005).

Auch die pflanzliche Antwort auf biotischen Stress wird durch ABA moduliert. In Abhängigkeit von der individuellen Pflanze-Pathogen-Interaktion kann ABA sowohl ein positiver als auch ein negativer Regulator der pflanzlichen Abwehr von pathogenen Bakterien und Pilzen sein (Bari und Jones, 2009).

So reguliert das Hormon diverse Prozesse, die zur Pathogenabwehr beitragen, wie die Schließung der Stomata, die Expression von Abwehrgenen, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und die Initiation von Kalloseanlagerungen an die Zellwand (Bari und Jones, 2009). Andererseits kann ABA zu einer erhöhten Suszeptibilität führen, indem sie Abwehrreaktionen entgegenwirkt, die durch andere Signalwege vermittelt werden. Der exakte molekulare Mechanismus der ABA-Wirkung auf die pflanzliche Abwehr gegen diverse Pathogene ist zu großen Teilen noch ungeklärt (Bari und Jones, 2009).

Weiterhin spielt ABA eine wichtige Rolle bei der Feinregulation von Wachstums- und Entwicklungsprozessen in Abwesenheit von Stress. So zeigen ABA-defiziente Pflanzen auch bei ausreichender Wasserversorgung phänotypische Anomalien. In der *Arabidopsis* ABA-Biosynthesemutante *aba1* ist die Größe der Blätter, Infloreszenzen und Blüten reduziert (Barrero *et al.*, 2005). Auch in Pappel wirkt ABA positiv auf die Blattgröße (Arend *et al.*, 2009). Hingegen wird die Größe der Schließzellen und die Internodienlänge negativ durch ABA beeinflusst (Strauss *et al.*, 2001; Arend *et al.*, 2009). Weiterhin erfüllt ABA Funktionen bei der Regulation der Heterophyllie im aquatischen Farn *Marsilea quadrifolia* (Lin *et al.*, 2005), der Geschlechtsausprägung von *Cannabis sativa* (Ram und Jaiswal, 1972), der kompatiblen Bestäubung von *Petunia hybrida* (Kovaleva und Zakharova, 2003) sowie der Blatt- und Perianth-Seneszenz mehrerer Arten (Hunter *et al.*, 2004; Wasilewska *et al.*, 2008; Ay *et al.*, 2008).

Die Vielzahl der durch ABA vermittelten Prozesse wird zum Teil durch die Interaktion mit anderen Phytohormonen reguliert. Diese Interaktionen können auf der wechselseitigen Beeinflussung sowohl der Hormonbiosynthese als auch der Signalweiterleitung beruhen. Bereits kurz nach der Entdeckung von ABA wurde beobachtet, dass dieses Hormon vielen Effekten von Gibberellinsäure entgegenwirkt, wie der Förderung des Keimlingswachstums und der α -Amylase-Expression (Thomas *et al.*, 1965). Auch zwischen Ethylen und ABA existieren zahlreiche Wechselwirkungen (Acharya und Assmann, 2009; Wilkinson und Davies, 2010; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). So führt, anders als zunächst angenommen, ein hoher ABA-Gehalt allein nicht zur Abscission von Blättern und Früchten von der Mutterpflanze. Vielmehr ist die abszissionsfördernde Wirkung von ABA eine indirekte Folge der ABA-induzierten Ethylenbiosynthese (Taiz und Zeiger, 2002). Auch bei der Regulation der Blatt- (Wingler und Roitsch, 2008) und Blüten-Seneszenz (Trivellini *et al.*, 2011) interagieren ABA und Ethylen positiv miteinander. Hingegen zeigen beide Hormone entgegengesetzte Effekte auf die Stomataschließung in *Arabidopsis* (Tanaka *et al.*, 2005) und die Kornfüllungsrate in Weizen (Yang *et al.*, 2006a). Ebenso wirken sie antagonistisch auf die Samenkeimung und das frühe Keimlingswachstum von *Arabidopsis* (Cheng *et al.*, 2009). Weiterhin wird eine große Anzahl Brassinosteroid-responsiver Gene ebenso durch ABA reguliert (Goda *et al.*, 2008). Vor kurzem demonstrierten Zhang *et al.* (2009a) in einer umfassenden biochemischen und genetischen Studie, dass exogen applizierte ABA effektiv die Brassinosteroid-Signalweiterleitung inhibiert. Schließlich interagieren auch Cytokinine und Auxine mit ABA-Funktionen (Popko *et al.*, 2010). Sie reprimieren unter anderem die ABA-vermittelte Schließung der Spaltöffnungen in *Commelina communis* (Snaith und Mansfield, 1982) und *Arabidopsis* (Tanaka *et al.*, 2006).

1.2. Die Karyopsenentwicklung der Gerste

Bevor auf die Funktion von ABA im Samen näher eingegangen wird, soll die Samenentwicklung der Gerste kurz umrissen werden. Die Gerstenkaryopse ist eine einsamige Schließfrucht, bei der das Perikarp mit der Samenschale verwachsen ist. Ihre Entwicklung wird in drei bis vier Stadien eingeteilt: die Vorspeicher- oder Zellteilungsphase, die Speicher- oder Reifungsphase und die Austrocknungsphase. Aufgrund von drastischen Veränderungen der Genexpression und zahlreicher physiologischer Parameter zwischen der Vorspeicher- und der Speicherphase wurde diese Zeit zusätzlich als Übergangsphase definiert (Sreenivasulu *et al.*, 2004).

Zur Zeit der für Angiospermen typischen doppelten Befruchtung der Eizelle und des diploiden Embryosackkerns ist der Embryosack vom maternalen Nucellus umgeben. Dieser ist in die Integumente und das Perikarp eingebettet. Aus der Zygote entwickeln sich der Embryo und das Scutellum, welches, ähnlich den Kotyledonen zweikeimblättriger Samen, der embryonalen Versorgung dient. Bis zur intermediären Phase der Samenentwicklung umfassen diese embryonalen Strukturen nur wenige hundert Zellen.

Nach der Anthese vergrößert sich das Perikarp durch rege Zellteilung und Zellstreckung und differenziert sich am 2. Tag nach der Blüte (DAF) in zwei Gewebetypen: das innere chloroplastenenthaltende Chlorenchym und die äußeren nichtgrünen Zellschichten, in denen sich die Leitbündel bilden. Hauptsächlich um das ventrale Haupt- und die kleineren lateralen Nebenleitbündel herum findet eine transiente Akkumulation von Speicherstärke statt (Weschke *et al.*, 2000). Die im Perikarp zwischengespeicherte Stärke wird bereits ab dem 3. DAF remobilisiert (Radchuk *et al.*, 2009) und dient möglicherweise der Ernährung der wachsenden filialen Gewebe. Im Nucellus kommt es bereits kurz nach der Blüte zum programmierten Zelltod. Allein der Teil des Nucellus gegenüber dem Hauptleitbündel löst sich nicht auf, sondern differenziert zur nucellaren Projektion.

Das Endosperm beginnt seine Entwicklung als coenocytisches Gewebe. Aus dem triploiden Endospermkern geht durch kontinuierliche Teilungsprozesse eine große Zahl freier Kerne hervor. Diese liegen in einem wandständigen Plasma, denn das starke Wachstum des Embryosacks nach der Befruchtung geht mit der Bildung einer großen Zentralvakuole einher (Olsen, 2001). Am 3. DAF beginnt gegenüber der nucellaren Projektion die Zellularisierung des endospermalen Coenocyten. Sie breitet sich in die lateralen und zentralen Regionen des Endosperms aus. Am 4.-5. DAF ist das Endosperm vollständig zellularisiert. Ausgelöst durch Signale aus den maternalen Geweben differenzieren sich noch während der Endosperm-Zellularisierung die der nucellaren Projektion gegenüberliegenden Zellschichten in endospermale Transferzellen (Gruis *et al.*, 2006; Sabelli und Larkins, 2009). Die Differenzierung und Funktion der Transfergewebe ist eng mit einer Erhöhung der *Sink*-Stärke des Endosperms verbunden. Nährstoffe werden durch das Hauptleitbündel in die maternalen Gewebe der Karyopse transportiert und von Zellen der nucellaren Projektion in den apoplastischen Raum zwischen maternalen und filialen Kornteilen entlassen. Von dort werden sie von den spezialisierten endospermalen Transferzellen aufgenommen.

Das Ende der Endosperm-Zellularisierung kennzeichnet den Beginn der Übergangsphase (Sreenivasulu *et al.*, 2004). Während dieser Phase finden rege Zellteilungen im Endosperm statt. Gleichzeitig differenzieren sich die drei äußeren Zellreihen des Endosperms zum Aleuron. Die

Determinierung der Kerne findet bereits im Coenocyten-Stadium statt (Olsen, 2001) und wird durch Positionseffekte bestimmt (Gruis *et al.*, 2006).

Ein wichtiges Signal zur Regulation der Samenentwicklung ist das Saccharose/Hexose-Verhältnis (Weschke *et al.*, 2000; Borisjuk *et al.*, 2004). In den teilungsaktiven Geweben junger Karyopsen herrscht eine hohe Konzentration an Hexosen, die durch die Aktivität von löslichen und zellwandgebundenen Invertasen hervorgerufen wird. Diese spalten die in den Samen transportierte Saccharose irreversibel und verschieben dadurch aktiv das Saccharose/Hexose-Verhältnis zugunsten der Hexosen. Mit Beginn der Übergangsphase gewinnt die reversible Saccharose-Spaltung durch die Saccharose-Synthase an Bedeutung (Wobus *et al.*, 2005). Gleichzeitig erhöht sich das Saccharose/Hexose-Verhältnis in den filialen Organen. Dadurch kommt es zum Einstellen der Zellteilungsaktivitäten, während die zelluläre Differenzierung einsetzt (Borisjuk *et al.*, 2004).

Der Beginn der Speicherproduktakkumulation in den Zellen des Stärke-Endosperms beginnt ungefähr am 7. DAF. Er geht mit der Endoreduplizierung des Genoms in diesem Gewebe einher (Brunori *et al.*, 1993). Im Gerstenendosperm finden vier Runden der Endoreduplizierung statt, wodurch eine Ploidie von 48C erreicht wird (Sabelli und Larkins, 2009). Die Stärkeakkumulation beginnt im zentralen Teil des Stärke-Endosperms. Einem Differenzierungsgradienten von den inneren zu den äußeren Zellreihen folgend akkumuliert dieses Speichergewebe große Mengen an Stärke und verschiedene Klassen von Speicherproteinen (Weber *et al.*, 2010). Dabei vergrößert sich das Volumen der Karyopse hauptsächlich durch das Dickenwachstum des Stärke-Endosperms. Gleichzeitig kommt es im Perikarp zu massiven Remobilisierungsprozessen und zum programmierten Zelltod. Während der weiteren Entwicklung degeneriert nahezu das gesamte Perikarp mit Ausnahme der das Hauptleitbündel umgebenden Region und des Chlorenchyms. Beginnend um den 14. DAF findet während der späten Reifungs- und Austrocknungsphase auch im Stärke-Endosperm programmierter Zelltod statt. Nur das Aleuron und der Embryo erlangen Austrocknungstoleranz und gewährleisten die Fortsetzung des pflanzlichen Lebenszyklus.

1.3. Funktionen von Abscisinsäure in Samen

Abscisinsäure akkumuliert in allen Geweben des Samens (Nambara und Marion-Poll, 2003). Pfropfungsexperimente zwischen Wildtyp und ABA-defizienten Tabak-Mutanten sowie reziproke Kreuzungen demonstrierten, dass in vegetativen Geweben synthetisierte ABA in sich entwickelnde Embryonen eintransportiert wird (Frey *et al.*, 2004; Seo und Koshiba, 2011). Dadurch wird der Mutanten-Phänotyp von ABA-defizienten Tabaksamen teilweise aufgehoben. Kanno und Kollegen (2010) führten Kreuzungen zwischen einer ABA-defizienten *Arabidopsis*-Linie (♂) und dem Wildtyp (♀) durch und zeigten, dass sowohl in filialen als auch in maternalen Geweben synthetisierte ABA zum Gesamt-ABA-Gehalt sich entwickelnder Embryonen beiträgt.

In vielen Arten gibt es während der Samenentwicklung zwei *Peaks* des ABA-Gehaltes. Der Erste ist maternalen Ursprungs und findet bald nach der Anthese statt (Nambara und Marion-Poll, 2003). Das aus den maternalen Geweben in den sich entwickelnden Samen eintransportierte ABA fördert die frühe Samenentwicklung und das embryonale Wachstum. Eine ABA-Defizienz während der frühen Samenentwicklung kann in *Nicotiana plumbaginifolia* zum Abort der Samen führen (Frey *et al.*,

2004). Bleibt dieser aus, so kommt es zu einer stark verzögerten Entwicklung von Embryo und Endosperm und zu einer insgesamt verzögerten Samenentwicklung (Frey *et al.*, 2004).

In Gerste wurde zum Zeitpunkt der Befruchtung ein hoher ABA-Gehalt gemessen, der nach dem 4. DAF stark abfällt (Sreenivasulu *et al.*, 2010b). Der Gehalt dieser höchstwahrscheinlich maternalen ABA ist in der Perikarp- und Embryosack-Fraktion während der frühen Samenentwicklung vergleichbar hoch. Die Karyopsen der *seg8*-Mutante zeigen eine deregulierte ABA-Akkumulation und sind daher ein wertvolles Modell zur Untersuchung der ABA-Funktionen während der frühen Samenentwicklung (Sreenivasulu *et al.*, 2010b). Bis zum 6. DAF ist der ABA-Gehalt der *seg8*-Karyopsen deutlich niedriger als im Wildtyp. Dies führt zu anormalen Zellularisierungsmustern im Endosperm und den Transferzellen. Die mangelnde Zellularisierung des Endosperms hat ein geringes Tausendkorngewicht zur Folge (Sreenivasulu *et al.*, 2010b).

Das zweite Maximum der ABA-Akkumulation findet während der Reifungsphase der Samenentwicklung statt und ist von der ABA-Biosynthese in den filialen Samenteilern abhängig (Ravishankar *et al.*, 1995). Zu Beginn der Speicherphase induziert ABA die Akkumulation von Speicherproteinen und Stärke (Nambara und Marion-Poll, 2003). Durch die Aktivierung der Genexpression und der Aktivitäten mehrerer Enzyme des Stärkemetabolismus trägt ABA zur Etablierung und Aufrechterhaltung der *Sink*-Stärke sich entwickelnder Samen bei (Yang *et al.*, 2004a). Übereinstimmend damit korreliert der ABA-Gehalt mit der Kornfüllungsrate in Weizen und Reis (Yang *et al.*, 2006a; Yang *et al.*, 2006b). Eine ABA-Defizienz während der Samenentwicklung reduziert auch das Tausendkorngewicht bei Erbse (Radchuk *et al.*, 2010). Zudem stimuliert ABA die Fettsäurebiosynthese und Öllakkumulation in Rapsembryonen (Jadhav *et al.*, 2008). In *N. plumbaginifolia* fördert die in den reproduktiven Organen synthetisierte ABA außerdem die Entwicklung und Pigmentierung der Samenschale (Frey *et al.*, 2004). Während der späten Reifungsphase schließlich steuert ABA die Ausbildung der embryonalen Trockentoleranz und hemmt die vorzeitige Samenkeimung auf der Mutterpflanze (Karssen *et al.*, 1983; McCarty, 1995; Nambara und Marion-Poll, 2003). Ist die Samenentwicklung beendet, so schließt sich bei vielen höheren Pflanzen eine Phase der Dormanz an. Diese dient dazu, die Samenkeimung zu verzögern bis die äußeren Bedingungen optimal für das Überleben der nächsten Generation sind. Durch die große Anzahl der verfügbaren Mutanten wurden diese Prozesse in *Arabidopsis* und Mais detailliert untersucht (Nambara und Marion-Poll, 2003). Genetische Studien zeigten, dass die Initiation der Dormanz von der ABA-Synthese im Embryo oder Endosperm abhängig ist, da in den maternalen Geweben produzierte oder exogen applizierte ABA hierfür nicht ausreichen (Nambara und Marion-Poll, 2003). Auch in Gerste ist ABA der bestimmende Faktor für die Ausbildung der Dormanz (Jacobsen *et al.*, 2002; Millar *et al.*, 2006; Sreenivasulu *et al.*, 2010a).

Bei der Regulation der Keimung spielen ABA und Gibberellinsäure (GA) antagonistische Rollen. ABA fördert die Aufrechterhaltung der Keimruhe während eine hohe GA-Konzentration deren Aufhebung begünstigt und zur Keimung führt. Umweltsignale regulieren die ABA/GA-Balance durch die Modifikation der Hormonbiosynthese und des Hormonkatabolismus (Finkelstein *et al.*, 2008).

1.4. ABA-Biosynthese und -Katabolismus

ABA ist ein Sesquiterpenoid, das sich in höheren Pflanzen trotz seiner 15 Kohlenstoffatome nicht direkt von dem Sesquiterpen Farnesyldiphosphat ableitet. Sie entsteht stattdessen durch die Spaltung von C₄₀ Carotenoiden aus dem 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat (MEP) Stoffwechselweg. Dieser indirekte ABA-Syntheseweg soll im Folgenden kurz umrissen werden.

In Pflanzen gibt es zwei Wege der Isoprenoidbiosynthese, die in verschiedenen Kompartimenten lokalisiert sind (Rodriguez-Concepcion und Boronat, 2002). Der für die ABA-Biosynthese bedeutsame MEP-Syntheseweg findet in den Chloroplasten statt. Ausgehend von Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat wird zunächst D-1-Deoxyxylulose-5-Phosphat (DXP) gebildet. Die Umwandlung von DXP zur MEP ist der erste geschwindigkeitsbestimmende Schritt der plastidären Isoprenoidbiosynthese. Über mehrere Zwischenschritte entsteht das Isopren Isopentenyl-Pyrophosphat (Rodriguez-Concepcion und Boronat, 2002). Der weitere ABA-Biosyntheseweg ist eng mit der Carotenoidbiosynthese verknüpft und wurde von Fraser und Bramley (2004) zusammengefasst. Durch die Hydroxylierung von β -Carotin entsteht Zeaxanthin, welches durch die Zeaxanthin-Epoxidase (ZEP) weiter zu Violaxanthin umgewandelt wird. Das Gen der Neoxanthin-Synthase, welche Neoxanthin aus Violaxanthin synthetisiert, wurde in *Arabidopsis* erst vor wenigen Jahren entdeckt (North *et al.*, 2007). Die *cis*-Isomere von Violaxanthin und Neoxanthin sind alternative Substrate der 9-*cis*-Epoxy-carotenoid-Dioxygenasen (NCEDs). Sie werden in das C₁₅-Produkt Xanthoxin und ein C₂₅-Metabolit gespalten. Alle Reaktionsschritte bis zur Bildung des Xanthoxins finden in den Plastiden statt. Xanthoxin wird ins Cytosol transferiert und dort durch eine Kurzketten-Dehydrogenase/Reduktase in Abscisin-Aldehyd umgewandelt. Die Oxidation von Abscisin-Aldehyd zur Carboxylsäure ist der letzte Schritt der ABA-Biosynthese und wird durch eine Abscisinaldehyd-Oxidase (AAO) katalysiert. Aldehydoxidasen benötigen für ihre katalytische Aktivität einen Molybdänkofaktor (MoCo). Daher führen Mutationen in den Genen für die MoCo-Synthese (z.B. MoCo-Sulfurase) zur ABA-Defizienz.

Viele Enzyme der ABA-Biosynthese (z.B. NCED und AAO) werden durch Multigenfamilien kodiert und gewebe-, entwicklungs- bzw. stimulusspezifisch exprimiert (Schwartz *et al.*, 2003). So liegen im Endosperm, Embryo und Perikarp der Gerste während der Samenentwicklung die Transkripte unterschiedlicher Gene der ABA-Biosynthese vor, was eine voneinander unabhängige ABA-Produktion in diesen Geweben vermuten lässt (Seiler *et al.*, 2011). Als geschwindigkeitsbestimmender Schritt dieses Synthesewegs wurde die NCED-vermittelte C₄₀-Spaltung beschrieben (Nambara und Marion-Poll, 2005).

Der ABA-Katabolismus wird im Wesentlichen in Hydroxylierungs- und Konjugationsreaktionen eingeteilt (Nambara und Marion-Poll, 2005). Es gibt drei verschiedene ABA-Hydroxylierungswege, bei denen jeweils eine Methylgruppe der Ringstruktur oxidiert wird (C-7', C-8', C-9'). Die Hydroxylierung an der C-8'-Position ist der wichtigste ABA-Abbauweg. Durch die spontane Isomerisierung von 8'-Hydroxy-ABA entsteht die biologisch inaktive Phaseinsäure. Auch die durch Konjugation an Glukose entstehenden ABA-Glykosylester sind biologisch inaktiv. Ihnen kommt höchstwahrscheinlich eine Rolle beim Langstreckentransport von ABA zu (Jiang und Hartung, 2008).

1.5. ABA-Perzeption und -Signalweiterleitung

Die Suche nach ABA-Rezeptoren und -Perzeptionsorten beschäftigt die Wissenschaft bereits seit mehreren Jahrzehnten (Cutler *et al.*, 2010). Es gibt Anhaltspunkte für eine extrazelluläre wie auch intrazelluläre ABA-Perzeption.

Hinweise auf einen extrazellulären Rezeptor erbrachte unter anderem die Studie von Jeanette *et al.* (1999), die *Arabidopsis*-Zellkulturen mit einem nicht membrangängigen ABA-BSA-Konjugat versetzten. Diese extrazelluläre ABA führte zur Aktivierung eines ABA-regulierten Kaliumkanals in der Plasmamembran und stimulierte die Expression des ABA-responsiven Gens RAB18. Die Erhöhung der intrazellulären ABA-Konzentration durch direkte Mikroinjektion führte außerdem weder zu einer Veränderung der Spaltöffnungsapertur in *Commelina communis* noch zur Inhibition der GA-induzierten α -Amylase-Synthese in Aleuronprotoplasten von Gerste (Anderson *et al.*, 1994; Gilroy und Jones, 1994). Durch die Behandlung von Schließzellprotoplasten mit biotinylierter ABA und fluoreszierendem Avidin, einem biotinbindenden Protein, wurden zudem kleine Ansammlungen eines putativen ABA-Rezeptors auf der Oberfläche der Protoplasten visualisiert (Yamazaki *et al.*, 2003).

Andere Studien unterstützen eine intrazelluläre Lokalisation des ABA-Rezeptors. Die Applikation von ABA in das Cytosol von *Vicia faba*-Schließzellen durch die „Patch-Clamp“-Technik hemmt einwärts gerichtete Kaliumströme, ein Effekt der hinreichend ist, um die Öffnung der Stomata zu inhibieren (Schwartz *et al.*, 1994). Auch die direkte Mikroinjektion von ABA in das Cytosol von *C. communis* Schließzellen führt eine Schließung der Stomata herbei (Schwartz *et al.*, 1994). Allan *et al.* (1994) synthetisierten eine von einem molekularen Käfig umgebene inaktive Form von ABA und mikroinjizierten diese in Schließzellen von *C. communis*. Eine UV-Photolyse führte zur intrazellulären Freisetzung von ABA und löste die Schließung der Spaltöffnungen aus. Weiterhin hemmt extrazellulär applizierte ABA die Öffnung der Spaltöffnungen von *C. communis* bei einem pH von 6,15 fast doppelt so effektiv wie bei pH 8 (Anderson *et al.*, 1994). Bei saurem pH kann die protonierte ABA leicht von den Schließzellen aufgenommen werden, während sie bei pH 8 größtenteils dissoziiert vorliegt und in ihrer anionischen Form Biomembranen nicht überqueren kann (Hartung und Slovik, 1991). Es ist daher möglich, dass mehr als eine Klasse von ABA-Rezeptoren existiert und die ABA-Perzeption sowohl extrazellulär als auch intrazellulär stattfindet.

Durch genetische Studien wurden viele Komponenten der ABA-Signalweiterleitung entdeckt. Anders als bei anderen Phytohormonen scheiterten sie jedoch bei der Identifizierung eines Rezeptors (Cutler *et al.*, 2010). Biochemische Ansätze zur Reinigung von Proteinen, die ABA mit hoher Affinität binden, führten schließlich zur Identifizierung mehrerer putativer ABA-Rezeptoren, deren Identität jedoch in vielen Fällen umstritten ist (Cutler *et al.*, 2010; Weiner *et al.*, 2010).

Die Entdeckung einer neuen Familie von ABA-Rezeptoren im Jahr 2009 legte schließlich den Grundstein für ein Modell, das die ABA-Perzeption mit der Regulation bekannter Komponenten des ABA-Signalweges verknüpft. Die PYR/PYL/RCAR-Familie von ABA-Rezeptoren wurde von vier Forschungsgruppen unabhängig identifiziert (zusammengefasst in Cutler *et al.*, 2010). Sie besteht in *Arabidopsis* aus 14 Mitgliedern, von denen mindestens 13 an der ABA-Perzeption beteiligt sind (Fujii *et al.*, 2009). Vermutlich ist die funktionelle Redundanz zwischen den Proteinen der Grund dafür, dass

die Genfamilie in früheren genetischen Analysen nicht identifiziert wurde. Unterschiedliche Mitglieder dieser neuen Rezeptorfamilie wurden einerseits durch ihre physikalische Interaktion mit Typ-2C-Proteinphosphatasen (PP2Cs) in Hefedi-hybrid- (Ma *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2009) oder Immunopräzipitationsexperimenten (Nishimura *et al.*, 2010) identifiziert. Zur Klasse A der PP2Cs gehören unter anderem die gut charakterisierten negativen Regulatoren der ABA-Signalweiterleitung AtABI1, AtABI2 und AtHAB1 (Schweighofer *et al.*, 2004). Andererseits führte die Resistenz einer *Arabidopsis*-Mutante gegenüber dem rezeptorselektiven ABA-Agonisten Pyrabactin zur Entdeckung des PYR1-Gens (Park *et al.*, 2009). Da es noch immer keine einheitliche Namensgebung für die neue Rezeptorfamilie gibt, werden ihre Mitglieder sowohl als RCARs (regulatorische Komponenten des ABA-Rezeptors) als auch als PYR1/PYLs (Pyrabactin *Resistance* 1 und Pyrabactin *Resistance* 1-*Like*) bezeichnet. RCAR-Einzelmutanten unterscheiden sich in ihrem Phänotyp nicht von Wildtyp-Pflanzen (Park *et al.*, 2009). Die Quadrupel-Mutante *rcar10/rcar11/rcar12/rcar14* hingegen zeigt Defekte in verschiedenen ABA-Antworten wie der ABA-induzierten Genexpression, der ABA-vermittelten SnRK2-Aktivierung (Park *et al.*, 2009) sowie der ABA-gesteuerten Spaltöffnungsbewegung (Nishimura *et al.*, 2010). Die Überexpression von Mitgliedern der RCAR-Familie dagegen erhöht die Sensitivität gegenüber ABA (Ma *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2009).

RCARs sind die einzigen ABA-Rezeptoren, für die ein verifiziertes Modell zur Wechselwirkung mit anderen bekannten Komponenten der ABA-Signalweiterleitung vorliegt. Das ABA-Molekül bindet direkt an die RCAR-Proteine und verursacht eine Konformationsänderung der Rezeptoren. Diese versetzt die RCARs in die Lage, das aktive Zentrum von ABA-responsiven PP2Cs zu binden und ihre Phosphataseaktivität zu inhibieren (Melcher *et al.*, 2010). Interessanterweise steigt die Affinität der Rezeptoren für ABA durch die Anwesenheit von PP2Cs ungefähr auf das Zehnfache an (Ma *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2009; Szostkiewicz *et al.*, 2010). In Abwesenheit von ABA binden die PP2Cs an SnRK2-Kinasen und dephosphorylieren einen Phosphoserinrest in der Aktivierungsschleife der Kinase. Diese Phosphorylierung ist notwendig für die SnRK2-Kinaseaktivität (Park *et al.*, 2009; Fujii *et al.*, 2009). Die ABA/RCAR-induzierte PP2C-Inhibierung ermöglicht die erneute Phosphorylierung der SnRK2 Aktivierungsschleife durch Autophosphorylierung und/oder bisher noch nicht identifizierte Kinasen (Cutler *et al.*, 2010). Im aktiven Zustand phosphorylieren SnRK2s zahlreiche Zielproteine, die an der ABA-Antwort beteiligt sind. Hierzu gehört eine Gruppe von bZIP-Transkriptionsfaktoren, zu denen unter anderem der Transkriptionsregulator AtABI5 gehört (Raghavendra *et al.*, 2010; Yoshida *et al.*, 2010). Die Phosphorylierung dieser sogenannten ABFs (ABA-Box bindende Faktoren) ist eine Voraussetzung für deren Fähigkeit, die ABA-vermittelte Gentranskription zu aktivieren. Auch die Herstellung von H₂O₂ durch die Plasmamembran-NADPH-Oxidase (Sirichandra *et al.*, 2009a) und die Aktivität ABA-responsiver Ionenkanäle (Geiger *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2009) wird durch die SnRK2-vermittelte Phosphorylierung reguliert. Beide Prozesse spielen unter anderem eine bedeutende Rolle in der ABA-vermittelten Schließung der Spaltöffnungen (Sirichandra *et al.*, 2009b). Der Speichermetabolismus sich entwickelnder *Arabidopsis*-Samen wird ebenfalls durch eine ABA-abhängige SnRK2-Kinase reguliert (Zheng *et al.*, 2010). Die Inaktivierung des AtSnRK2.6-Gens führt zu einer reduzierten Fettsäurebiosynthese in den Embryonen, während die AtSnRK2.6-Überexpression eine verstärkte Saccharosesynthese und Fettsäuredesaturierung in den Blättern zur Folge hat. Es gibt

Hinweise darauf, dass die SnRK2.6 in Gersten-Karyopsen eine ähnliche Rolle spielt wie in *Arabidopsis* (Sreenivasulu *et al.*, 2006). Weiterhin untersuchten Nakashima *et al.* (2009) die Funktion dreier redundanter ABA-aktivierter SnRK2s während der Samenentwicklung und Keimung in *Arabidopsis*. Die Samen der *srk2.2/srk2.3/srk2.6*-Dreifachmutante zeigten neben schweren Wachstumsdefekten einen Verlust der Austrocknungstoleranz und der Dormanz.

In ihrer Funktion als Schlüsselregulatoren der ABA-Signalweiterleitung interagieren PP2Cs mit einer Reihe weiterer Zielproteine, die an der abiotischen Stressantwort beteiligt sind. Hierzu gehört die Glutathion-Peroxidase als Teil des redoxhomöostatischen Systems (Miao *et al.*, 2006), Fibrillin, das als Photosystem II-schützendes und lipidbindendes Protein in die Plastiden importiert wird (Yang *et al.*, 2006c), sowie Mitglieder der SnRK3-Klasse von Proteinkinasen (Ohta *et al.*, 2003).

Die Interaktionen von RCARs, PP2Cs und SnRK2s wird als „Kern“ des ABA-Signalnetzwerkes bezeichnet (Cutler *et al.*, 2010). Fujii und Kollegen (2009) demonstrierten, dass allein dieser „Kern-Signalweg“ hinreichend ist, um ABA-vermittelte Reaktionen im Zellkern zu steuern. Berichte über Unterschiede in der ABA-Sensitivität zwischen verschiedenen RCAR-PP2C-Kombinationen lassen vermuten, dass kombinatorische Interaktionen zwischen Rezeptoren und Proteinphosphatasen eine feinabgestimmte Antwort auf Stressfaktoren ermöglichen (Ma *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2009; Szostkiewicz *et al.*, 2010).

1.6. Strategien der ABA-Funktionsanalyse

Zur Untersuchung der ABA-Funktion während der Samenentwicklung werden verschiedene Versuchsstrategien eingesetzt. Im Allgemeinen wird dabei eine Veränderung des ABA-Gehaltes in den Versuchspflanzen hervorgerufen, welche anschließend mit Kontrollpflanzen verglichen werden. Die beobachteten Unterschiede lassen Schlüsse über die Funktionen von ABA zu. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über verschiedene Möglichkeiten zur Veränderung des ABA-Gehaltes sowie ihre Vor- und Nachteile gegeben werden.

Ein Ansatz die Funktion von ABA *in planta* aufzuklären ist die direkte Applikation von ABA oder von ABA-Biosyntheseinhibitoren wie Fluridon. Auf diese Weise wird in den pflanzlichen Geweben ein Überschuss oder Mangel an ABA erzeugt. Der Vorteil dieses Vorgehens besteht darin, dass Zeitpunkt und Dauer der Applikation frei wählbar sind. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass exogen applizierte Substanzen kompakte Strukturen wie Samen möglicherweise nicht vollständig und/oder nicht gleichmäßig penetrieren. Zudem kann bei einer exogenen ABA-Zuführung die ABA-Konzentration im Gewebe zeitlich veränderlich sein. Weiterhin kann ein Überangebot von freier ABA im Apoplasten zur Veränderung der natürlichen subzellulären ABA-Verteilung führen. Da es Hinweise auf unterschiedliche ABA-Perzeptionsorte gibt, kann sich die Wirkung von exogen applizierter ABA gegebenenfalls von der Wirkung der endogenen ABA unterscheiden.

Während der letzten 15 Jahre wurden besonders für *Arabidopsis*, Tomate und Mais zahlreiche ABA-defiziente Mutanten isoliert (Nambara und Marion-Poll, 2005). Durch die Untersuchung definierter Mutanten ist es möglich, die ABA-Funktion in Pflanzen unabhängig von der exogenen ABA-Applikation bzw. Biosynthesehemmung durch Inhibitoren zu untersuchen. Ein Nachteil der meisten

Mutanten ist allerdings, dass gewebespezifische Effekte nicht isoliert untersucht werden können, da der Mutanteneffekt in der ganzen Pflanze wirksam ist.

Die Nachteile beider Ansätze können durch die gezielte Herstellung transgener Pflanzen umgangen werden. So kann der ABA-Gehalt pflanzlicher Gewebe durch die Überexpression von Schlüsselgenen der ABA-Biosynthese oder des ABA-Katabolismus manipuliert werden. Eine andere Möglichkeit ist die Immunmodulierung des Hormongehaltes durch die Expression eines Antikörpermoleküls, welches spezifisch an ABA bindet und ihre Funktion blockiert. Durch die Immunmodulierung wird ein direkter Eingriff in die Biosynthese und den Katabolismus von ABA vermieden, was zu einer geringeren Beeinflussung anderer Biosynthesewege mit gemeinsamen Vorstufen führen könnte. Da die Expression aller Transgene unter die Kontrolle spezieller Promotoren gestellt werden kann, ist eine zeitliche und räumliche Veränderung der ABA-Verfügbarkeit in der Pflanze möglich. Der Vorteil dieses Ansatzes liegt somit in der Möglichkeit, organ- und entwicklungsspezifische Veränderungen der ABA-Verfügbarkeit gezielt hervorzurufen.

1.7. Die scFv-vermittelte Immunmodulierung in Pflanzen

Rekombinante monoklonale Antikörper und Antikörperfragmente finden vielfältige Anwendungen in den Biowissenschaften, der Medizin und den Materialwissenschaften (Floss *et al.*, 2008; Gebauer und Skerra, 2009; Zhao *et al.*, 2010). Die enorme Variabilität der Antikörperbindestellen erlaubt theoretisch die Erkennung jeder Oberflächenstruktur (Murphy *et al.*, 2009). Seit Hiatt *et al.* (1989) demonstrierten, dass funktionelle Antikörper auch in Pflanzen produziert werden können, gewannen immunologische Studien *in planta* fortwährend an Bedeutung. Häufig finden hierbei kleine rekombinante Immunglobuline wie die scFvs (*single chain variable fragment*) Anwendung. Ein scFv-Molekül ist ein synthetisches Antikörperderivat, das aus den variablen Regionen der schweren und der leichten Kette eines Immunglobulins besteht. Beide sind durch ein flexibles Polypeptid miteinander verbunden. Dabei sind die Konstrukte V_H -linker- V_L und V_L -linker- V_H möglich. Beide Proteine weisen die gleiche Stabilität auf (Kontermann, 2010). Das scFv ist das kleinste Antikörperfragment, das die gesamte Antikörperbindestelle des vollständigen IgG enthält. In den meisten untersuchten Fällen sind die Affinitäten der scFv-Proteine identisch zum vollständigen Antikörper (Artsaenko *et al.*, 1995; Conrad und Fiedler, 1998; Kontermann, 2010). Der Einsatz solch kleiner Antikörperfragmente birgt verschiedene Vorteile. Die V_H - und V_L -Sequenzen werden durch ein einziges Gen codiert und als zusammenhängendes Polypeptid synthetisiert. Dadurch werden beide Ketten in äquimolaren Konzentrationen exprimiert. Weiterhin erleichtert die Verbindung beider Ketten die korrekte räumliche Positionierung der V_H - und V_L -Domänen nach der Faltung. Durch die Expression des scFv in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten kann zudem die Stabilität des Antikörpermoleküls beeinflusst werden (Artsaenko *et al.*, 1995; Eto *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2008).

Als Immunmodulierung wird die ektopische Expression rekombinanter Antikörper gegen spezifische zelluläre Antigene, regulatorische Faktoren oder Pathogene in einem Zielorganismus bezeichnet. Die Bildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes *in vivo* behindert die Funktion des Antigens und beeinflusst den Phänotyp des transgenen Organismus. Eine Voraussetzung für die Immunmodulierung ist die starke Expression eines hochaffinen Antikörpers (Conrad und Manteuffel, 2001). Im Falle einer

kompetitiven Inhibierung muss die Affinitätskonstante des exprimierten Antikörpers hoch genug sein, um erfolgreich mit Substraten, Liganden oder Rezeptoren zu konkurrieren.

Die erste erfolgreiche Immunmodulierung einer Pflanze durch die Expression eines Einzelketten-Fv-Antikörpers wurde von Owen *et al.* (1992) berichtet. Tabakpflanzen, die ubiquitär ein scFv gegen Phytochrom produzierten, zeigten eine verminderte Lichtantwort im Keimungsprozess, an dessen Regulation Phytochrom als Rotlichtrezeptor beteiligt ist. Seither wurde die Technik der Immunmodulierung erfolgreich auf eine Vielzahl physiologischer Prozesse angewandt. Durch die Expression von Antikörpern gegen metabolische Enzyme gelang die Modulierung der Stärkebiosynthese (Jobling *et al.*, 2003) und des Pigmentmetabolismus (De Jaeger *et al.*, 1999). Die Produktion eines scFv gegen ein Signalprotein für die Phytoalexinbiosynthese führte zu einer Beeinträchtigung der Alkaloidsynthese in Goldmohn (*Escholzia californica*, Viehweger *et al.*, 2006). Weiterhin verhinderten Antikörper gegen kleine Hitzeschockproteine die normale Hitzestressantwort in Tabak (Miroshnichenko *et al.*, 2005). ScFvs, die gegen Hüll- und Effektorproteine phytopathogener Viren (Tavladoraki *et al.*, 1993; Nölke *et al.*, 2009; Safarnejad *et al.*, 2009; Cervera *et al.*, 2010; Di Carli *et al.*, 2010) und Pilze (Yajima *et al.*, 2010) gerichtet sind, können der transgenen Pflanze Resistenz gegenüber dem entsprechenden Pathogen verleihen. Schließlich umfasst das Spektrum der exprimierten Antikörper auch solche gegen kleine Moleküle wie Phytohormone und Pestizide. Durch die Expression spezifischer anti-Herbizid-Antikörper wurden herbizidtolerante Pflanzen hergestellt (Eto *et al.*, 2003; Horsman *et al.*, 2007). Die Verleihung solcher Toleranzen durch eine Immunmodulierung ist auch dann möglich, wenn weder die Zielmoleküle noch die katabolischen Enzyme der Herbizide bekannt sind (Suzuki *et al.*, 2008).

Das erste Phytohormon, dessen Wirkung *in planta* immunmoduliert wurde, war ABA (Artsaenko *et al.*, 1995). Ein hochspezifischer und hochaffiner monoklonaler Antikörper als wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Immunmodulierung existierte bereits (Hybridomzelllinie15-I-C5, Mertens *et al.*, 1983). Artsaenko *et al.* (1995) exprimierten den daraus abgeleiteten Einzelkettenantikörper gegen ABA ubiquitär in Tabakpflanzen. Die transgenen Pflanzen welkten unter normalen Wachstumsbedingungen. Dies wurde zunächst als Folge einer verminderten ABA-Wirkung auf die Spaltöffnungsbewegung interpretiert. Später konnte jedoch gezeigt werden, dass ABA bereits bei der Entwicklung der Schließzellen eine wichtige Rolle spielt (Wigger *et al.*, 2002). Das Welken der immunmodulierten Pflanzen ist auf die Blockierung der ABA-Wirkung während dieses Prozesses zurückzuführen. Die Spaltöffnungen der transgenen Pflanzen zeigten eine irreguläre Form und waren unfähig sich in Reaktion auf Trockenheit zu schließen. Transgene Kartoffelpflanzen, die den anti-ABA scFv ebenfalls ubiquitär exprimierten, zeigten einen altersabhängigen Phänotyp (Strauss *et al.*, 2001). Die Blätter der jungen Transformanten waren ABA-defizient, während ältere Blätter einen Überschuss an freier ABA aufwiesen. Vier Wochen alte Kartoffelpflanzen zeigten ein verzögertes Wachstum und hatten weniger und kleinere Blätter als die Kontrollpflanzen. Die stomatale Leitfähigkeit der Blätter war aufgrund der Entwicklung ungewöhnlich großer Spaltöffnungen erhöht. Anders als beim Tabak zeigten die Stomata der immunmodulierten Kartoffelpflanzen jedoch keine anormale Morphologie. Die phänotypischen Anomalien, die während der frühen Entwicklung bei den immunmodulierten Pflanzen zu beobachten waren, verschwanden in älteren Pflanzen teilweise.

Auch zur Untersuchung der ABA-Wirkung während der Samenentwicklung fand die Technik der Immunmodulierung Anwendung. Tabakpflanzen, die den anti-ABA scFv unter Kontrolle des samenspezifischen USP-Promotors aus *V. faba* exprimierten, zeigten eine Verschiebung ihres Entwicklungsprogrammes von der Samenreifung hin zu Keimung und vegetativem Wachstum (Phillips *et al.*, 1997). In den Samen dieser Pflanzen herrschte bis zum 21. DAF ein starker Mangel an freier ABA. Dieser führte dazu, dass die immunmodulierten Embryonen photosynthetische Pigmente akkumulierten und grüne Kotyledonen entwickelten. Sie produzierten außerdem weniger Samenspeicherproteine und Ölkörper. Wurden die immunmodulierten Samen während ihrer Entwicklung aus den Kapseln entfernt, so keimten sie frühzeitig. Nach der Austrocknung hingegen verloren sie ihre Keimfähigkeit. In Erbse führte die Expression des anti-ABA scFv unter Kontrolle des samenspezifischen USP-Promotors (Saalbach *et al.*, 2001) zu einem reduzierten Gehalt an freier ABA während der Übergangsphase der Samenentwicklung (Radchuk *et al.*, 2010). Die immunmodulierten Erbsensamen waren insgesamt kleiner als Wildtyp-Samen und hatten ein geringeres Trockengewicht. Sie enthielten weniger Globuline, zeigten eine verzögerte Differenzierung und eine generelle Herunterregulation der transkriptions- und translationsassoziierten Genexpression. Die Expression des anti-ABA scFv führte auf Transkriptionsebene zu einer Repression der Glykolyse, des Zitronensäurezyklus und der Saccharosemobilisierung. Auch Gene, die an der Stärke-, Aminosäure- und Speicherproteinbiosynthese beteiligt sind, waren in den immunmodulierten Erbsenembryonen herunterreguliert, was insgesamt auf eine generelle Verlangsamung von metabolischen Flüssen hindeutet (Radchuk *et al.*, 2010). Die Autoren schlussfolgerten, dass ABA während der Embryodifferenzierung eine breite Hochregulation der Genexpression verursacht.

Auch die Funktion einiger anderer Phytohormone wurde mit Hilfe von scFv-Molekülen immunmoduliert. Vor einigen Jahren wurde die erfolgreiche Immunmodulation von Jasmonat (JA) berichtet (ten Hoopen *et al.*, 2007). Die Expression eines anti-JA scFv führte zu JA-defizienten Phänotypen in Tabak. Die Pflanzen zeigten eine geringere Sensitivität gegenüber Methyljasmonat und daher eine Inhibition der verletzungsinduzierten Genexpression und der Samenkeimung. Dieser Studie folgte der Bericht über die Immunmodulierung der Gibberelline GA₁₉ und GA₂₄, welche die Vorstufen der bioaktiven Moleküle GA₁ und GA₄ sind (Urakami *et al.*, 2008). Das Ziel der Autoren war es, die Umwandlung der Vorstufen in bioaktive Hormone zu behindern. Die immunmodulierten Tabakpflanzen prägten einen Zwergenphänotyp aus und enthielten weniger GA₄ als die Kontrollpflanzen. Zusätzlich wurde in *Arabidopsis* ein scFv gegen bioaktive GA₄ exprimiert (Suzuki *et al.*, 2008). Obwohl die transgenen Pflanzen 15 bis 40 Mal mehr endogene GA₄ als Wildtyp-Pflanzen enthielten, zeigten sie GA-defiziente Phänotypen mit im Vergleich zum Wildtyp kleineren Blättern, kürzeren Infloreszenzen, einer verzögerten Blüte und einer verringerten Keimungsrate. Ihre Reaktion auf exogen appliziertes GA₄ war hingegen nicht eingeschränkt.

Mehrere immunmodulatorische Studien an kleinen Molekülen haben gezeigt, dass eine besonders effektive Inhibition der Zielfunktion durch die Produktion von Antikörpermolekülen im Endoplasmatischen Retikulum (ER) erreicht werden kann (Artsaenko *et al.*, 1995; Eto *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2008). Im ER scheinen Antikörper stabiler zu sein als in jedem anderen Zellkompartiment. Möglicherweise begünstigt die Retention im ER die korrekte Faltung der

überexprimierten Proteine und führt dadurch zu einer höheren scFv-Stabilität und –Akkumulation (Conrad und Fiedler, 1998). Des Weiteren ist die Abbaurate der scFv in anderen Zellkompartimenten möglicherweise höher als innerhalb des ER. Antigene Zielmoleküle mit geringem Molekulargewicht und einer relativ hohen Hydrophobie sind in der Lage, die ER-Membran zu überqueren und den Antikörper zu erreichen. Auf diese Weise bietet die Immunmodulierung die Möglichkeit, durch den Aufbau kompartimentspezifischer *Sinks* die Funktionen von kleinen Molekülen in Zellkompartimenten und Zellen bis hin zu ganzen Pflanzen zu beeinflussen (Strauss *et al.*, 2001; Übersicht bei Conrad und Manteuffel, 2001).

1.8. Zielstellung der Arbeit

ABA beeinflusst sowohl die Speicherstoffakkumulation als auch die Stresstoleranz sich entwickelnder Samen (Finkelstein *et al.*, 2002; Raghavendra *et al.*, 2010). Da beide Faktoren den Ertrag von Getreiden direkt beeinflussen, ist ein gutes Verständnis der ABA-Wirkung in sich entwickelnden Karyopsen sowohl agronomisch als auch wirtschaftlich bedeutsam. Studien über die ABA-Wirkung in Getreidekörnern betrachteten bisher meist die Gesamtkaryopse oder konzentrierten sich auf das Aleuron und dessen Rolle während der Keimung (Ritchie *et al.*, 2000; Fath *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2003; An und Lin, 2011). Da die filialen und maternalen Gewebe der Getreidekaryopse jedoch spezialisierte Funktionen während der Karyopsenentwicklung erfüllen, liegt die Vermutung nahe, dass ABA-vermittelte Signale eine unterschiedliche Wirkung auf die maternalen und filialen Gewebe ausüben. Dies wurde bereits für die frühe Karyopsenentwicklung am Modell der Gersten-Mutante *seg8* bestätigt (Sreenivasulu *et al.*, 2010b). Da der deutlich verringerte ABA-Gehalt zwischen dem 0. und 4. DAF in dieser Mutante jedoch zu einer massiven Störungen der Endosperm-Zellularisierung führt, ist sie zur Untersuchung der ABA-Funktionen während der Speicherphase nicht geeignet. Daher ist ein Ziel dieser Arbeit, transgene Gerstenpflanzen zu generieren, deren natürliche ABA-Akkumulation in den Karyopsen erst mit dem Beginn der Speicherproduktbiosynthese gestört wird. Hierzu soll ein Einzelketten-Fv-Antikörper unter der Kontrolle eines Speicherproteinpromotors exprimiert werden. Anschließend werden die Folgen der ABA-Immunmodulierung auf den endogenen Gehalt freier Abscisinsäure in den sich entwickelnden Gerstenkaryopsen untersucht. Durch Inhaltsstoff- und Metabolitbestimmungen sowie eine umfassende Analyse der Genexpression werden Erkenntnisse über den Einfluss endogener Abscisinsäure auf den Primär- und Speichermetabolismus und die Entwicklungsphysiologie sich entwickelnder Karyopsen während der Speicherphase angestrebt. Eine getrennte Analyse maternaler und filialer Gewebe soll Aufschluss über die für beide Gewebefraktionen typischen ABA-Antworten geben.

2. Material

2.1. Pflanzenmaterial

Gerste (*Hordeum vulgare* L.) cv. 'Igri'

- Für die vorliegende Arbeit wurde die Wintergerstensorte 'Igri' ausgewählt, da sie sich für die Herstellung und Transformation androgenetischer Pollenkulturen in besonderem Maße eignet (Kumlehn *et al.*, 2006). In Verbindung mit der Doppelhaploidentechnik können daher bereits in der T0-Generation Pflanzen hergestellt werden, die in Bezug auf das Transgen homozygot sind. Mit zehn Monaten ist die Generationszeit dieser Gerste jedoch wesentlich länger als die der Sommergerste 'Golden Promise'.

Gerste (*Hordeum vulgare* L.) cv. 'Golden Promise':

- Linie 6U1Ax1GFP13: Expression von GFP unter der Kontrolle des 1Ax1-Promotors aus Weizen (Halford *et al.*, 1992), zur Verfügung gestellt von Dr. Volodymyr Radchuk, IPK Gatersleben, unpubliziert
- Linie 6U-UBIi-GFP: Expression von GFP unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors aus Mais (Cornejo *et al.*, 1993), hergestellt von Dr. Sylvia Boeders und zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe „Pflanzliche Reproduktionsbiologie“ am IPK Gatersleben, unpubliziert

2.2. Bakterienstämme

Escherichia coli

Der *E. coli* Stamm XL1-blue {*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB+ lacIq lacZΔM15 Tn10 (Tet^r)*]; Stratagene, La Jolla, CA, USA} wurde als Wirtszelle für die Vermehrung rekombinanter DNA-Moleküle verwendet.

Agrobacterium tumefaciens

Für den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer in embryogene Pollenkulturen wurde der *A. tumefaciens* Octopin-Stamm LBA4404pSB1 verwendet (Kumlehn *et al.*, 2006). Dieser Stamm enthält das Ti-Plasmid pAL4404. Zusätzlich trägt er den Vektor pSB1 (Japan Tobacco Inc., Higashibara, Japan), der verschiedene Rekombinationsschnittstellen für die Integration der gewünschten T-DNA sowie die Hypervirulenzgene VirB, VirC und VirG besitzt (Komari *et al.*, 1996).

2.3. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders angegeben, stammen die eingesetzten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien von den Firmen Merck (Darmstadt, D), Carl Roth (Karlsruhe, D), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Duchefa Biochemie (Haarlem, Niederlande) und Schütt Labortechnik (Göttingen, D). Lösungen und Puffer wurden nach Standardprotokollen (Sambrook und Russell, 2001) in H₂O_{dd} angesetzt und bei Bedarf autoklaviert (20 min; 121°C; 2 bar).

2.4. Medien und Antibiotika

Die Zusammensetzung der Nährmedien für Bakterien erfolgte nach Sambrook & Russell (2001). Alle Medien wurden sterilisiert (20 min; 121°C; 2 bar). Antibiotika sowie weitere Reagenzien (z.B. Glukose) wurden steril filtriert (Spritzenfilter, CA-Membran, 0,20 µm, Heinemann Labortechnik GmbH, Duderstadt, D) und nach dem Abkühlen der Medien auf 50°C zugegeben.

Medien zur Anzucht von Bakterien

Luria-Bertani Medium (Galbraith <i>et al.</i> , 1983)	1,0% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1,0% (w/v) NaCl 1,5% (w/v) Agar*
SOC-Medium	2,0% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 10,0 mM NaCl 2,5 mM KCl 1,0 mM MgCl ₂ ** 1,0 mM MgSO ₄ ** 2,0 mM Glucose** 1,5% (w/v) Agar*
YEB-Medium (pH 7,0)	0,5% (w/v) Rinderextrakt 0,1% (w/v) Hefeextrakt 0,5% (w/v) Pepton 0,5% (w/v) Saccharose 2,0 mM MgSO ₄ **

*Zusatz nur bei Nährmedium für Platten

**Zusatz nach dem Autoklavieren

Antibiotika

Tab. 1: Konzentrationsangaben der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin (Amp)	100 g/l	100 mg/l
Hygromycin (Hyg)	50 g/l	12,5 - 50 mg/l
Spectinomycin (Sp)	50 g/l	100 mg/l
Tetracyclin (Tet)	5 g/l*	12,5 mg/l
Timentin (Tim)	100 g/l	200 mg/l

*in Ethanol, ohne Filtersterilisation

2.5. Antikörper

Der im Western Blot und im ELISA verwendete monoklonale anti-c-myc Antikörper, der einen Bereich des humanen Proto-Oncogens p62 (c-myc) erkennt (AS 408 bis 439; Ramsay *et al.*, 1984), wurde aus dem Überstand der Hybridomzelllinie 9E10 gewonnen (Evan *et al.*, 1985). Der c-myc-Antikörper wurde als Konzentrat nach Ammoniumsulfatfällung und Dialyse gegen PBS (8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7,5) gewonnen. Weitere im Rahmen dieser Arbeit verwendete Antikörper sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tab. 2: Antikörper für Western Blot und ELISA

Antikörper	Epitop	Charakteristika
Schaf-anti-Maus IgG (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)	IgGs von Mäusen	Peroxidasekonjugat, polyklonal
Kaninchen-anti-Maus IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)	IgGs von Mäusen	Alkalische Phosphatase-Konjugat, polyklonal

2.6. Plasmide

Der Vektor pRTRA7/3 (Artsaenko *et al.*, 1995) diene als *template* für die Amplifizierung des codierenden Bereiches des anti-ABA scFv einschließlich der Sequenzen des LeB4-Signalpeptides, des c-myc *tags* und des KDEL-ER-Retentionssignals. Der intermediäre Vektor pNOS-BM enthält die Sequenz des Nopalinsynthase-Terminators aus *A. tumefaciens*.

Die Sequenzen der Promotoren (1Ax1- und Ubiquitin-Promotor) wurden den Plasmiden pUC1Ax1 (He *et al.*, 1999; zur Verfügung gestellt von F. Altpeter, University of Florida-IFAS, USA) und pAHC25 (Christensen und Quail, 1996) entnommen. Der binäre Vektor p6U diene als Zielvektor für die Expressionskassetten und wurde zur *Agrobacterium*-vermittelten Transformation der embryogenen Pollenkulturen verwendet. Eine Übersicht aller verwendeten Plasmide liefert Tabelle 3.

Tab. 3: Herkunft der verwendeten Plasmide und deren bakterielle Resistenz

Plasmid	Resistenz	Herkunft
pRTRA7/3	Amp ^r	Artsaenko <i>et al.</i> (1995)
pNOS-BM	Amp ^r	DNA Cloning Service, Hamburg, D
pUC1Ax1	Amp ^r	F. Altpeter, University of Florida-IFAS, USA
p6U	Sm ^r /Sp ^r ,	DNA Cloning Service, Hamburg, D
pAHC25	Amp ^r	Christensen und Quail (1996)

2.7. Oligonukleotide

Für die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurden Oligonukleotide der Firma Metabion (Martinsried, D) verwendet. Die Sequenzen der einzelnen *Primer* finden sich in den Tabellen 4 und 5.

Tab. 4: Sequenzen der für Klonierungsarbeiten und zur Kopienzahlbestimmung verwendeten Oligonukleotide. Schnittstellen der Restriktionsenzyme, die zur Klonierung verwendet wurden (*EcoRI*, *HindIII*), sind hervorgehoben. fwd: *forward*; rev: *reverse*; T_m: Schmelztemperatur.

Primernamen	Sequenz
<i>Primer für Klonierungsarbeiten</i>	
αABAHindIII fwd1	5'-CG AAG CTT ATG GCT TCC AAA CCT TTT C-3'
αABAHindIII rev1	5'-CGG AAG CTT CTA GAG TTC GTC TTT G-3'
αABAEcoRI fwd2	5'-CG GAA TTC ATG GCT TCC AAA CCT TTT C-3'
αABAHindIII rev2	5'-A CGG AAG CTT CTA GAG TTC GTC TTT G-3'
<i>Primer zur Herstellung der Hybridisierungssonde für die Southern-Analyse</i>	
αABA-291 fwd	5'-AGA CAC ATC CTC CAA CAC AG-3'
αABA-738 rev	5'-ATC CTC AGC CTC CAC TCT AC-3'
<i>Primer für Kopienzahlbestimmung durch qRT-PCR</i>	
Actin1211 rev	5'-AGC ACT TCC GGT GGA CAA T-3'
Actin1153 fwd	5'-GTG GAT CTC GAA GGG TGA GT-3'
αABA-681 fwd	5'-TGG CAG TGG GTC AGG AAC TA-3'
αABA-738 rev	5'-ATC CTC AGC CTC CAC TCT AC-3'

Tab. 5: Sequenzen der zur Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR verwendeten Oligonukleotide. Eine Übersicht über die Gene der an der ABA-Biosynthese bzw. dem ABA-Katabolismus in Gerste beteiligten Enzyme geben Seiler *et al.* (2011).

Gen	Primer fwd	Primer rev
<i>Referenzgene zur Normalisierung der Genexpressionsdaten</i>		
Cyclophilin (EST HF02J07)	3'-GCGCCTTGGAAGTATTCAGA-5'	3'-ACAGTCCGCAGGATTTTCAC-5'
Clathrin-Adaptorkomplex Untereinheit (EST HZ38A11)	3'-CGTGTCTGTTTGTGTCATAGG-5'	3'-GGGGTGTATTGATCAACGAGAA-5'
<i>Gene der ABA-Biosynthese und des ABA-Katabolismus</i>		
ZEP1	3'-AGTTCTGCAGGCAGCATGAGT-5'	3'-CTACAGTGGCTGGTGACAAGG-5'
NCED1	3'-CAGAGGAGCCACAGAGAG-5'	3'-GTAACCGCCGCTAACTGTTTC-5'
NCED2	3'-GCTTGTAGTAAAACCTAGCCGT-5'	3'-CTCTAATCCTCCCTCCCTGC-5'
CCD3	3'-AATTGCTAGTATTTCCCCTCGA-5'	3'-CGCGTGAAATTTACAGTGTGTC-5'
CCD4	3'-TCCGGTCACAGCACCAATGAT-5'	3'-ATAGAACGTGCTGGTGTATCTG-5'
CCD5	3'-CCTATGGCTTTCATGGAGCAT-5'	3'-TCTGTTAATCAAGCAAGGCACAT-5'
SDR1	3'-AACGAAGCGAGCTTGAGCATT-5'	3'-TTATGCAGCCGTTGTAGATGC-5'
SDR2	3'-GGGACATCAACGAGATGGAG-5'	3'-GTTGTGCCCGTTGACGTACT-5'
SDR3	3'-GGCACCTGTAACAGTAGTTGT-5'	3'-TGAAGCAGCAAGTGGATACAAA-5'
SDR4	3'-GAACGCGAGCGAATGAGTAAA-5'	3'-GGGAACAGCTGATGAGACCA-5'
SDR5	3'-GTCCTCGCCGACATCAATTC-5'	3'-GAGTTCCTCCGCTGTTTGA-5'
SDR6	3'-GCCGCATGCATGAACTCTAC-5'	3'-ATTCACCGGACGGAGGTACT-5'
SDR7	3'-CGGATGAGCGTCCTCTACT-5'	3'-GCAGCAGCAGGAAATACAATG-5'
AO1	3'-GTGAAGGAAATGTGTGGCTTG-5'	3'-CGCAGCTCGATACTGATGTTC-5'
AO2	3'-CTGCGGCGTGATACAAGAATA-5'	3'-TACCGCTCAACGTCACACAC-5'
AO3	3'-AGCTGTGTGCGAAATGTGGGTA-5'	3'-ACAGGCAAACCGGTCATTGTC-5'
AO4	3'-TGGCATGAAGCTGAGTACGTT-5'	3'-TGTGCGCGCATTTATAGAGATG-5'
AO5	3'-ACCGCAAAGGCTATTATTCC-5'	3'-AATCATCGCTGGCAACCTTAC-5'
AO7	3'-CATTGGTTCTGCTAGTTCTTTGT-5'	3'-ACATATACCGCCTCCCCAGA-5'
MCSU1	3'-ACGCGGAGAGATGTCTATATGT-5'	3'-GGTGTGAAAGGCAGGCTGT-5'
MCSU2	3'-TGAGCGAGGGCTTGGTAGTA-5'	3'-CGACGCACACATAAACACAGA-5'
MCSU3	3'-ACGTCCTCGGGTAGATTTTCA-5'	3'-TGAGCGTGGTCACCATCATAT-5'
ABA8H1	3'-GGAGAGAAGACAGCAGACTGA-5'	3'-GCGGGCAACCTATCTTACATC-5'
ABA8H2	3'-CTCGAGATGCTGGTGCTCAT-5'	3'-CCAACAACCTCCACCTGTAG-5'
ABA8H3	3'-CGCTCGTCGCAAATACTTCTA-5'	3'-TCGTTGAGCCCATTACAATACAT-5'

3. Methoden

3.1. Transformationstechniken

3.1.1. Transformation von Bakterien

Escherichia coli

Die Transformation von *E. coli* XL1-*blue* Zellen erfolgte durch Elektroporation (Inoue *et al.*, 1990). Für die Herstellung der elektrokompenten Zellen wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml einer Bakterienvorkultur beimpft. Unter Schwenken (140 rpm) wurde die Kultur bei 37°C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,8 kultiviert. Nach dem Zentrifugieren (1750 g; 15 min; 4°C) wurden die Zellen mehrmals in sterilem H₂O_{dd} (4°C) gewaschen und in 10% (v/v) Glycerin aufgenommen. Aliquots wurden bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

Zur Transformation wurde ein Aliquot elektrokompenter Zellen mit 300 ng Plasmid-DNA vermischt und in eine Küvette (Gene Pulser[®] Cuvette, 0,2 cm, BIO-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) gegeben. Nach dem Auslösen eines elektrischen Pulses (25 µF; 2,5 kV; 200 Ohm; Gene Pulser[®], BIO-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) wurde dem Transformationsansatz 1 ml SOC-Medium zugesetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienlösung auf LB-Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Identifizierung von Klonen mit dem gewünschten Vektor erfolgte durch eine Restriktionsspaltung der isolierten Plasmid-DNA.

Agrobacterium tumefaciens

Elektrokompente *A. tumefaciens* Zellen wurden entsprechend dem bereits für *E. coli* beschriebenen Protokoll hergestellt. Die Inkubationstemperatur betrug jedoch 28°C. Als Nährmedium wurde YEB eingesetzt. Die Transformation der Zellen mit 300 ng Plasmid-DNA erfolgte ebenfalls durch Elektroporation (25 µF; 2,5 kV und 200 Ohm; Gene PulserR, BIO-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA; Mersereau *et al.*, 1990). Anschließend wurde der Transformationsansatz mit 1 ml SOC-Medium versetzt und 1 h bei 28°C inkubiert, bevor die Bakterienlösung auf YEB-Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum gestrichen und für zwei Tage bei 28°C kultiviert wurde. Durch Restriktionsspaltung der isolierten Plasmid-DNA wurden Klone mit dem gewünschten binären Vektor identifiziert.

3.1.2. Transformation von *Hordeum vulgare* und Regeneration transgener Pflanzen

Die genetische Transformation der Wintergerste *H. vulgare* cv. 'Igrì' erfolgte wie von Kumlehn *et al.* (2006) beschrieben und wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe „Pflanzliche Reproduktionsbiologie“ am IPK Gatersleben durchgeführt. Die Methode basiert auf der Infektion androgenetischer Pollenkulturen mit dem *A. tumefaciens* Stamm LBA4404, der ein Vektorsystem mit einer Hypervirulenz trägt (vgl. 2.2.).

Um nach der Regeneration haploide von doppelthaploiden Pflanzen zu unterscheiden, wurde eine Durchflussscytometrie (PA Ploidy Analyser) unter Verwendung der CyStain UV Ploidy Staining

Solution (beides Partec GmbH, Münster, D) nach Herstellerangaben durchgeführt. Haploide Pflanzen wurden zur Aufdopplung des Genoms einer Colchizinbehandlung unterzogen. Hierzu wurden die Pflanzen über Nacht bei 4°C inkubiert, bevor die Blätter auf 5 cm und die Wurzeln auf 3 cm zurückgeschnitten wurden. Anschließend wurden die unterirdischen Pflanzenteile für 6 h bei 21°C in 0,1% (v/v) Colchizin; 0,8% (v/v) DMSO; 0,05% (v/v) Tween 20 getaucht. Nach dem Waschen der Pflanzen mit H₂O_{dd} wurden sie erneut in Pflanztöpfe mit Erde überführt.

3.2. Pflanzenanzucht und Materialentnahme

Um die Dormanz zu brechen, wurde das Saatgut zunächst für fünf Tage bei -20°C gelagert und anschließend bei 4°C auf Filterpapier zum Auskeimen gebracht. Die Keimlinge wurden bis zum Zwei- bis Dreiblatt-Stadium im Gewächshaus (15/12°C Tag/Nacht; 16 h Licht pro Tag) in Pflanztöpfen (Ø 6 cm, Hermann Meyer KG, Rellingen, D) und Substrat 1 (Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste-Groß Hesepe, D) kultiviert. Es schloss sich eine sechswöchige Vernalisationsbehandlung an (4°C, 9 h Licht pro Tag). Anschließend wurden die Jungpflanzen in Pflanztöpfe (Ø 16 cm, Hermann Meyer KG, Rellingen, D) mit Substrat 2 (Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste-Groß Hesepe, D) überführt und bis zur Samenreife im Gewächshaus (18/15°C Tag/Nacht; 16 h Licht pro Tag) kultiviert. Eine künstliche Beleuchtung bei 200 W/m² erfolgte mit SON-TAgro Lampen (Philips, Hamburg, D). Die Düngung der Pflanzen und eine eventuelle Schädlingsbekämpfung erfolgten nach Bedarf.

Die Ähren der sich selbst bestäubenden Blüten wurden am Tag der Befruchtung etikettiert (0. DAF). Karyopsen wurden am 7., 10., 14. und 20. DAF geerntet. Ab dem 7. DAF wurde für einige der Analysen das maternale Perikarp per Handdissektion von den filialen Geweben (Endosperm und Embryo) getrennt. Alle geernteten Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

3.3. Keimungsanalysen

Acht Replikate von je 25 Gerstenkaryopsen wurden einem Standard-Keimungstest unterzogen (ISTA, 2008). Hierzu wurden die Körner zwischen zwei Lagen feuchten Filterpapiers gelegt, welche zu Rollen gewickelt in einem Lichtschrank (Percival CU-36L4, Percival Scientific Inc., Perry, IA, USA) inkubiert wurden (20/18°C Tag/Nacht; 14 h Licht pro Tag). In regelmäßigen Abständen wurde die Anzahl der gekeimten Samen bestimmt. Diese wurden aus dem Keimungsexperiment entfernt. Karyopsen, die nach 12 Tagen nicht gekeimt waren, wurden als dormant definiert.

3.4. Analyse von Promotoraktivitäten in Karyopsen

Von sich entwickelnden Karyopsen der Promotor-GFP-Pflanzen wurden mit einer Rasierklinge Handschnitte angefertigt. Diese wurden am konfokalen Laserscanning Mikroskop (LSM 510 Meta, Zeiss, Göttingen, D) auf GFP-Fluoreszenz untersucht (Anregung bei 488 nm). Zur besseren Übersicht wurde auch das Chlorophyll mit Licht der Wellenlänge 665 nm und phenolische Zellwand-

Komponenten mit Licht von 364 nm Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt. Die Beobachtungen wurden fotografisch festgehalten.

3.5. DNA- und RNA-Analysetechniken

3.5.1. Isolierung genomischer DNA

Circa 300-400 mg junges Blattmaterial wurden geerntet und zusammen mit zwei Stahlkugeln in einem Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das gefrorene Material wurde mit einer Schwingmühle (Retsch® Tissue Lyser, Qiagen, Hilden, D) zerkleinert. Nach Zugabe von 700 µl DNA-Extraktionspuffer (1% Lauryl-Sarcosin, 100 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 100 mM NaCl) und 700 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurden die Proben 2 min gut gemischt, um eine homogene Suspension zu erhalten, die anschließend zentrifugiert wurde (3 min, 8000 rpm, RT). Die wässrige obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 70 µl 3 M NaAc pH 5,2 (1/10 Vol.) und 700 µl Isopropanol (1 Vol.) gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4°C) wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl H₂O aufgenommen. Um RNA-Kontaminationen zu beseitigen, wurden die Proben zuletzt mit RNaseH behandelt (1,5 µg, 1 h, 37°C). Die DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

3.5.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion (Mullis und Faloona, 1987) unter Verwendung des Gene Amp® PCR Systems 9700 (Perkin Elmer, New Jersey, USA) eingesetzt. Ein Standard-Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

PCR Puffer mit 2 mM MgCl ₂	1x
dNTP-Mix	250 µM
<i>forward Primer</i>	0,5 µM
<i>reverse Primer</i>	0,5 µM
DNA Polymerase	0,025 U/µl
<i>template DNA</i>	0,5 pg Plasmid-DNA bzw. 300 ng genomische DNA
H ₂ O _{dd}	ad 20 oder 50 µl, je nach Ansatz

Alle PCR-Reaktionen liefen nach folgendem Standardprogramm ab:

Initiale Denaturierung	95°C	5 min
35 Zyklen:		
Denaturierung	95°C	30 s
<i>Annealing</i> der Oligonucleotide	T _{opt}	30 s
Elongation	72°C	30 bis 60 s
Finale Elongation	72°C	5 min
Kühlung	4°C	∞

Die Temperatur für das *Annealing* der Oligonukleotide (T_{opt}) lag 5°C unter deren Schmelztemperatur (T_m). Für die Dauer der Elongation war die Größe des zu amplifizierenden Fragments und die

verwendete Polymerase [Taq 1 kb/min, Pfu 1 kb/2 min; beide von Roche (Basel, Schweiz)] ausschlaggebend. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte im Agarosegel (vgl. 3.5.4.).

3.5.3. Restriktionsspaltung, Dephosphorylierung und Ligation von DNA

Restriktionsenzyme und die zur Reaktion benötigten Puffer stammten von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, D). Die Reaktionen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Isolation der gewünschten Fragmente erfolgte entweder durch eine Agarosegelelektrophorese mit anschließender Gelextraktion oder, im Fall der Linearisierung von Vektoren, direkt aus dem Reaktionsansatz mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, D).

Nach der Linearisierung eines Plasmids mussten die durch Restriktion entstandenen Phosphatreste an den 5'-Enden der DNA-Fragmente entfernt werden, um eine Religation zu verhindern. Für diese Reaktion wurde shrimp alkalische Phosphatase (SAP, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D) nach Herstellerprotokoll eingesetzt.

DNA-Fragmente wurden mit T4 DNA-Ligase (Invitrogen, Karlsruhe, D) nach Angaben des Herstellers verknüpft. Das molare Verhältnis von Vektor-DNA zu *Insert*-DNA betrug 1:5. Die Ligationen wurden für 2 h bei RT durchgeführt.

3.5.4. Agarosegelelektrophorese und Elution von DNA-Fragmenten

PCR-Fragmente wurden elektrophoretisch in Agarosegelen [1,0% (w/v) Agarose in 88 mM Tris; 88 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA; pH 8,0] mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid bei einer Spannung von 70 - 100 V getrennt. Die DNA wurde hierfür mit Ladepuffer [0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,2 M EDTA; 30% (v/v) Glycerin; pH 8,0] versetzt. Definierte Mengen an DNA-Marker (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas) wurden zur Abschätzung der Fragmentgröße aufgetragen. Die Auswertung der Agarosegele erfolgte mit einem UV-Transilluminator (Gel Jet Imager, Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, D) und wurde per Kamera dokumentiert. Zur Reinigung von PCR-Produkten wurden präparative Gele verwendet. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden hierbei mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und anschließend extrahiert (QIAquick® Gel Extraction Kit, Qiagen GmbH, Hilden, D).

3.5.5. Southern-Analyse

10 µg genomische DNA wurden in einem 200 µl-Ansatz mit 20 µl 10x Puffer, 20 µl 40 nM Spermidin, 15 µl Enzym (10 u/µl) und der entsprechenden Menge H₂O_{dd} für 2h bei 37°C gespalten. Anschließend wurde der Ansatz mit 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, gut suspendiert und zentrifugiert (13000 rpm, 3 min, RT). Zur Oberphase wurden 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gegeben, erneut gemischt und zentrifugiert (2 min, 13000 rpm, RT). Die wässrige obere Phase wurde über Nacht mit 1/10 Vol. 3 M NaAc und 2,5 Vol. 95% Ethanol bei -20°C gefällt. Anschließend wurde zentrifugiert (15 min, 13000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 15 µl H₂O aufgenommen. Die elektrophoretische Auftrennung der verdauten DNA erfolgte in einem 1%igen Agarosegel. Das Gel wurde 5 min in

0,25 M HCl, 2x 15 min in 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH und 2x 15 min in 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5), 3 M NaCl geschüttelt. Anschließend wurde die DNA unter Verwendung von 20x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0) über Nacht auf eine Hybond-N⁺ Membran (Amersham, Braunschweig, D) transferiert. Nach abgeschlossenem Transfer wurde die DNA durch UV-Crosslinking (0,12 J; UV-Stratalinker[®] 2400, Stratagene, Heidelberg, D) kovalent an die Nylon-Membran gebunden.

Die für die Southern-Analysen verwendete DNA-Sonde wurde mittels PCR amplifiziert. Hierzu wurden die Primer α ABA-291fwd und α ABA-738rev verwendet (vgl. Tab. 4). Der PCR-Ansatz wurde in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, das Amplifikat ausgeschnitten und anschließend mittels NucleoSpin[®] Extract II (Machery-Nagel, Düren, D) nach Herstellerangaben aus dem Gel eluiert. Die Sondenmarkierung erfolgte mittels Rediprime[™] II Random Prime Labelling System (Amersham, Braunschweig, D). Es wurden 20 ng des PCR-Fragments in einem Volumen von 45 μ l 5 min bei 95°C denaturiert und danach 5 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde die denaturierte DNA in den mitgelieferten Reaktionsansatz überführt. Nach Zugabe von 5 μ l (50 μ Ci) [α^{32} -P]dCTP (Amersham, Braunschweig, D) wurde vorsichtig gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurde der Reaktionsmix über MicroSpin S-200 HR Säulen gereinigt. Nach einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 5 min wurden die Proben für 5 min auf Eis gestellt, um eine Renaturierung zu vermeiden. Anschließend wurde die Sonde zur Hybridisierung eingesetzt.

Zur Vorbereitung der Hybridisierung wurden die Nylon-Membranen für mindestens 3 h bei 65°C in Church-Puffer (7% SDS, 1% BSA, 0,5 M Natriumphosphat, pH 7,2) mit 0,05 mg/ml gescherter Lachsspermien-DNA (Sonicated Salmon Sperm DNA Kit, Stratagene, Heidelberg, D) prähybridisiert, um unspezifische DNA-Bindungsstellen zu sättigen. Anschließend wurden die markierte Sonde zusammen mit frischem Puffer und Lachsspermien-DNA (0,05 mg/ml) zu der Membran gegeben. Nach mindestens 14-stündiger Hybridisierung bei 65°C wurden die Membranen dreimal für 30 min mit Spüllösung (2 mM EDTA, 1% SDS, 40 mM Natriumphosphat pH 7,0) gewaschen, in Folie eingeschweißt und 16 h in Kassetten auf „Fuji Imaging Plates“ (BAS-MS 2040, Fujifilm, Düsseldorf, D) exponiert. Anschließend wurden die Signale mit Hilfe des Phosphoimagers FLA 5100 (Raytest, Straubenhardt, D) digital eingelesen.

3.5.6. Quantitative Real-Time (qRT) PCR

Zur Verifizierung der im Southern Blot ermittelten Kopienzahl des anti-ABA scFv-Gens in den transformierten Pflanzen sowie zur Expressionsanalyse von Genen der ABA-Biosynthese wurden qRT-PCR-Analysen durchgeführt (Thermocycler 7900HT, Applied Biosystems, Foster City, USA). Als *template* zur Kopienzahlbestimmung dienten 5 ng genomische DNA. Für die Expressionsanalyse wurde mit Hilfe des Superscript[™]III First-Strand Synthesis Systems (Invitrogen, Karlsruhe, D) cDNA auf der Grundlage von 5 μ g extrahierter Gesamt-RNA hergestellt. Hierzu wurden Oligo(dT)-*Primer* verwendet und nach Herstellerprotokoll vorgegangen. Anschließend wurde die cDNA 1:8 verdünnt. Pro qRT-PCR-Reaktion wurde 1 μ l dieser Verdünnung als *template* eingesetzt. Genspezifische Primer wurden mit Hilfe des Programms Primer3 (Rozen und Skaletsky, 2000) abgeleitet. Alle Reaktionen wurden in einem Endvolumen von 10 μ l und unter Verwendung des

Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) in 384-*well* Platten (Quali PCR Platten 384 Loch, G. Kisker GbR, Steinfurt, D) durchgeführt. Ein Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Power SYBR Green PCR Master Mix (2x)	1x
<i>forward Primer</i>	200 nM
<i>reverse Primer</i>	200 nM
<i>template</i> DNA bzw. cDNA	5 ng genomische DNA bzw. 1 µl cDNA-Verdünnung (siehe Text)
H ₂ O _{dd}	ad 10 µl

Die qRT-PCR-Reaktionen liefen nach folgendem Standardprogramm ab:

Aktivierung der AmpliTaq Gold® DNA Polymerase	50°C	2 min
Initiale Denaturierung	95°C	5 min

35 Zyklen:		
Denaturierung	95°C	15 s
<i>Annealing</i> der Oligonucleotide und Elongation	60°C	1 min

Schmelzkurve	95°C	15 s
	60°C	15 s
	95°C	15 s

Kühlung	4°C	∞

Alle qRT-PCR-Reaktionen wurden in Triplikat durchgeführt. Die Auswertung der qRT-PCR Reaktion erfolgte mit dem Programm SDS 2.2.1 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Die Genexpressionsdaten wurden mit Hilfe des Expressionsniveaus der stabil exprimierten Gene Cyclophilin und Clathrin-Adaptorkomplex Untereinheit (EST-Klone HF02J07 und HZ38A11) normalisiert.

3.5.7. Microarray-Analyse

Für eine umfassende Genexpressionsanalyse der sich entwickelnden Karyopsen wurden Microarray-Analysen durchgeführt. In je drei Wiederholungen wurden Karyopsen vom 7., 10., 14. und 20. DAF untersucht, wobei für die drei erstgenannten Entwicklungszeitpunkte maternale Gewebe (Perikarp und Integumente) von der filialen Fraktion der Karyopse (Embryo, Endosperm, Aleuron) per Handdissektion getrennt wurde. Dabei verbleibt das maternale Chlorenchym bei den filialen Geweben.

RNA-Präparation

Die Isolierung der RNA für die Herstellung von Microarray-Sonden erfolgte mit dem Gentra RNA Isolation Kit (Biozym Scientific, Oldendorf, D) nach Herstellerangaben aus 200-300 mg Probenmaterial. Für die RNA-Extraktion aus Karyopsen vom 20. DAF wurde von allen Lösungen die doppelte angegebene Menge eingesetzt. Die extrahierte RNA wurde in 100 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und mit 1 µl RNase-Inhibitor (RNaseOUT, Invitrogen, Karlsruhe, D) gemischt. Zum Entfernen von Polysaccharid- und DNA-Kontaminationen wurden die extrahierten Nucleinsäuren auf RNeasy Mini Spin Columns (Qiagen, Hilden, D) immobilisiert. Anschließend wurde ein DNase-Verdau mit Hilfe des RNase-Free DNase Sets (Qiagen, Hilden, D) nach Herstellerprotokoll

durchgeführt. Die RNA wurde mit 50 µl DNase-freiem Wasser von der Säule eluiert. Anschließend wurde die RNA-Konzentration und -Reinheit an einem Spektralphotometer (Nanodrop ND1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt.

Markierung der Sonden für die Microarray-Analyse

Zur Hybridisierung der Microarray-Chips wurden Cyanin3-markierte cRNA-Sonden hergestellt. Dazu wurde das One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Quick Amp Labeling) Kit (Agilent Technologies GmbH & Co.KG, Böblingen, D) verwendet. Es wurden 500 ng Gesamt-RNA eingesetzt und nach Herstellerprotokoll verfahren. Die markierten cRNA-Sonden wurden, wie vom Hersteller empfohlen, über RNeasy Mini Spin Columns (Qiagen, Hilden, D) gereinigt. Anschließend wurde mit Hilfe eines Nanodrop Spektralphotometers die Ausbeute an markierter cRNA sowie deren spezifische Aktivität bestimmt bzw. berechnet. In allen Fällen waren die Ausbeute und spezifische Aktivität deutlich größer als vom Hersteller als Mindestanforderung für eine erfolgreiche Hybridisierung angegeben wurde (das heißt $>1,65 \mu\text{g}$ cRNA pro Reaktion mit einer spezifischen Aktivität $> 9,0 \text{ pmol Cy3}$ pro μg cRNA).

Microarray-Hybridisierung

Die Hybridisierung der Microarray-Chips wurde von der Firma Atlas Biolabs GmbH (Berlin, D) durchgeführt. Hierfür wurde der „Barley Gene Expression Microarray, 4x44K“ (Agilent Technologies GmbH & Co.KG, Böblingen, D) verwendet. Bei diesem Microarray-Format befinden sich je vier *Arrays* aus je 43.803 doppelt gespotteten 60-Meren auf einer Trägerglasplatte. Die 60-Mere sind von EST-Sequenzen aus den Datenbanken RefSeq (Version 31), UniGene (Version 52), TIGR Plant Transcript Assemblies (Version 2) und TIGR Gene Indices (Version 10) abgeleitet. Ein unikales Gen kann durch mehrere verschiedene Sequenzen auf dem Array repräsentiert sein.

Hintergrundkorrektur

Die Hintergrundkorrektur ist ein wichtiger Schritt vor der Normalisierung von Microarray-Daten. Hierbei werden die Rohdaten abhängig von der Intensität des lokalen Hintergrundsignals korrigiert. In dieser Arbeit wurde die Methode *normexp* des R-Paketes *limma* (Smyth, 2005) für das Programm Bioconductor (Gentleman *et al.*, 2004) verwendet. Die *normexp*-Methode modelliert die detektierten Intensitäten als die Summe exponentiell verteilter echter Signale und normalverteilter Hintergrundsignale. Auf diese Weise sind in den korrigierten Daten keine negativen Werte enthalten.

Normalisierung zwischen den Arrays

Für die Microarray-Analyse wurden insgesamt 42 Microarrays auf 11 Chips verwendet. Um die Arrays untereinander vergleichbar zu machen, wurde eine Quantil-Normalisierung durchgeführt (Bolstad *et al.*, 2003). Die Quantil-Normalisierung ist ein nicht-parametrisches Verfahren der Normalisierung, bei dem die Verteilungen der Signalintensitäten verschiedener Microarrays entsprechend ihrer Quantile aneinander angeglichen werden. Das geschieht, indem die ursprünglichen

Quantile durch das durchschnittliche Quantil aller Arrays ersetzt werden. Hierfür wurde das Agi4x44Preprocess-Paket zu Bioconductor verwendet. Abbildung 1 illustriert den Effekt der Quantilnormalisierung.

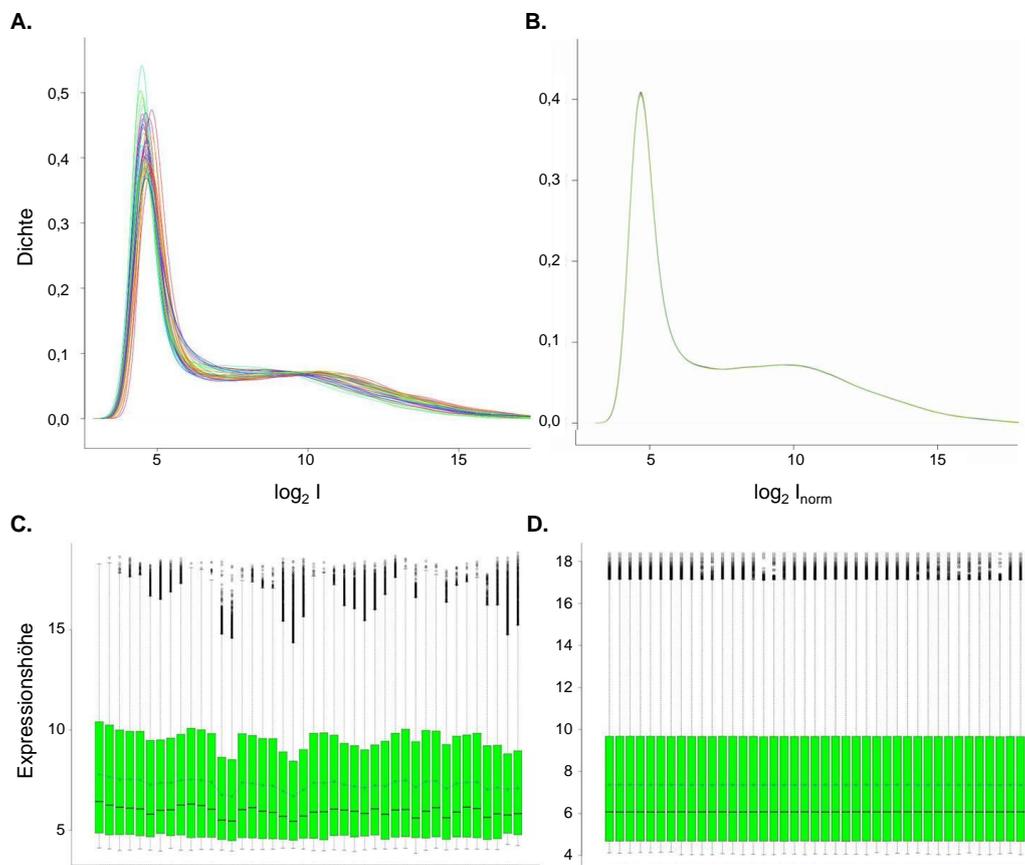


Abb. 1: Effekt der Quantilnormalisierung. Verwendet wurden die Daten aus 42 Microarray-Hybridisierungen. Die Daten sind in Abschnitt 3.5.7. näher beschrieben. A - Empirische Dichtefunktionen über die Signal-Intensitäten der Proben vor der Normalisierung. Jede Kurve repräsentiert eine Probe. B. - Empirische Dichtefunktionen nach der Quantilnormalisierung. Die Funktionen folgen jetzt einer annähernd gleichen Verteilung. C. und D. stellen in einem *Boxplot* die Verteilung der Genexpressionshöhe auf den 42 Chips vor bzw. nach der Quantilnormalisierung dar. Die Quantilnormalisierung und die Darstellung der Dichten wurden mit Funktionen des Bioconductor-Paketes Agi4x44Preprocess durchgeführt.

Datenauswahl

Die Microarray-*Spots*, deren Signalintensitäten sich zwischen den drei biologischen Wiederholungen um das Doppelte oder mehr unterschieden, wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Anschließend wurden die Werte der Wiederholungen gemittelt. Für diese Arbeit waren nur solche Gene von Interesse, die in der transgenen Linie 363 eine im Vergleich zum Wildtyp veränderte Expression aufweisen. Daher wurden zur Auswertung nur *Spots* herangezogen, deren Signalintensitäten sich zwischen Wildtyp- und transgener Linie zu mindestens einem Entwicklungszeitpunkt in mindestens einer Gewebefraktion signifikant um mindestens das Doppelte unterschieden ($t < 0,05$ bei Anwendung des "moderated t-test"; Benjamini und Hochberg, 1995; Smyth, 2005).

Alle Sequenzen, die die genannten Kriterien erfüllten, wurden zur Annotation einer BLASTX2-Suche

(Altschul *et al.*, 1990) gegen die NRPEP-Datenbank (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/FASTA/nr.gz>) unterzogen. Hierzu wurde das Programmpaket HUSAR verwendet (<http://genome.dkfz-heidelberg.de>, Devereux *et al.*, 1984).

3.6. Proteinbiochemische Arbeiten

3.6.1. Herstellung pflanzlicher Proteinextrakte

Die zu untersuchenden Gewebe wurden im Mörser unter Stickstoff (Karyopsen) oder mit einer Schwingmühle in bei -80°C vorgekühlten Einsätzen (Blätter) gemahlen (Retsch[®] TissueLyzer, Qiagen GmbH, Hilden, D). Reife Karyopsen wurden bei RT in der Schwingmühle zerkleinert. Für die Auftrennung der Proteine im reduzierenden SDS-PAA-Gel wurden circa 300 mg des Mehls in SDS-Probenpuffer [72 mM Tris (pH 6,8), 10% (v/v) Glycerin, 3% (w/v) SDS] aufgenommen und für 10 min bei 95°C inkubiert (Sambrook und Russell, 2001). Überschüssige Blattbestandteile wurden durch Zentrifugation (15000 g; 20 min; 4°C) entfernt.

Für die semiquantitative Bestimmung des scFv-Gehaltes einer Probe wurde diese zunächst mit 5 mM Tris pH 7,5, 1 mM CaCl_2 versetzt, gut gemischt und zentrifugiert (15000 g; 15 min; 4°C). Der Überstand wurde abgenommen. Anschließend wurde das Pellet mit SDS-Probenpuffer nachextrahiert (10 min, 95°C) und erneut zentrifugiert (15000 g; 15 min; 4°C). Der Proteingehalt beider Extraktionsschritte wurde bestimmt (vgl. 3.6.3.) und mit der Probeneinwaage ins Verhältnis gesetzt. Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass das Nachextrakt bei Blättern sowie Karyopsen vom 7. und 10. DAF nahezu keine Proteine enthält. Daher wurde für diese Proben nur ein Extraktionsschritt mit SDS-Probenpuffer durchgeführt.

3.6.2. SDS-PAGE und Western Blot

Die Trennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts erfolgte mittels SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Hierfür wurden 12%-ige (v/v) SDS-PAA-Gele verwendet. Zur Identifikation des Molekulargewichts der rekombinanten Proteine wurde ein Molekulargewichtsmarker (PageRuler[™] Prestained Protein Ladder, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D) genutzt.

Für die Immundetektion mit Hilfe peroxidasemarkierter Antikörper wurden die Proteine nach der Elektrophorese in 25 mM Tris, 0,1% (w/v) SDS, 192 mM Glycin und 20% (v/v) Methanol auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell, Dassel, D) transferiert (18 V, ca. 16 h). Zum Blockieren freier Bindestellen wurden die Membranen nach dem Transfer für 3 h in 5% (w/v) Magermilchlösung (Sprüh-Magermilchpulver J. M. Gabler-Saliter Milchwerke, Obergünzburg, D) in 180 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 7,8) unter Schütteln inkubiert. Die Detektion der rekombinanten Proteine erfolgte mit dem anti-c-myc Antikörper [vgl. 2.7.; 1:50 verdünnt in 5% (w/v) Magermilchlösung für 2 h] gefolgt von Schaf-anti-Maus IgG-Peroxidasekonjugat [vgl. 2.7.; 1:2000 verdünnt in 5% (w/v) Magermilchlösung für 1 h]. Zwischen beiden Inkubationsschritten wurde intensiv mit 1% (w/v) Magermilchlösung gewaschen. Nach Inkubation mit dem Detektionsantikörper (Peroxidasekonjugat) wurden die Membranen nochmals in 1% (w/v) Magermilchlösung, gefolgt von Tris-Puffer (180 mM NaCl; 20 mM Tris; pH 7,8) und abschließend PBS (150 mM NaCl; 8 mM

Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; pH 7,6) gewaschen. Die Peroxidaseaktivität wurde mit Hilfe des ECL Kits (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) und nachfolgender Exposition eines Röntgenfilmes detektiert.

3.6.3. Quantifizierung von Proteinen

Die Bestimmung der Konzentration von löslichen Proteinen in Blatt- und Samenextrakten erfolgte nach Bradford (1976) mit dem BIO-Rad Protein Assay (BIO-Rad Laboratories GmbH, München, D). Eine Eichgerade wurde mit BSA angefertigt und zur Berechnung der Proteinkonzentrationen verwendet. Für die Messungen wurde 1 µl der Proteinlösung eingesetzt und die Extinktion bei 595 nm bestimmt (SmartSpecTM Plus Spektralphotometer, BIO-Rad Laboratories GmbH, München, D). Zur Bestimmung des Nullwertes diente der jeweilige Extraktionspuffer.

Die Quantifizierung des anti-ABA scFv in pflanzlichen Proben erfolgte durch semiquantitativen Western Blot. Hierzu wurden zusätzlich zu definierten Mengen des pflanzlichen Proteinextraktes verschiedene Verdünnungen des c-myc markierten anti-TNFα-ELP V_HH Antikörpers (Conrad *et al.*, 2011) in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Western-Blot (vgl. 3.6.2.) wurden die entwickelten Röntgenfilme digital eingescannt (ScanJet 6300C, Hewlett Packard, Berlin, D). Anschließend wurde die Intensität der Banden wurden mit Hilfe der TINA *Software* (V. 2.0, Raytest, Straubenhardt, D) quantifiziert. Die Signale des anti-TNFα-ELP V_HH dienten zum Erstellen einer Eichgeraden, anhand derer der scFv-Gehalt der jeweiligen Probe ermittelt wurde.

3.6.4. Reinigung des anti-ABA scFv-Antikörpers aus Gerstenblättern

Zur Reinigung des anti-ABA Antikörpers aus Blattmaterial von Gerste wurde der an einer Sepharosematrix immobilisierte monoklonale anti-c-myc Antikörper verwendet (Ramsay *et al.*, 1984). Dieser Antikörper wurde aus dem Überstand der Hybridomzelllinie 9E10 gewonnen (Evan *et al.*, 1985).

Reinigen und Binden des c-myc Antikörpers an Sepharose

10 ml des „high density“ 9E10-Überstandes wurden unter Rühren tropfenweise mit 10 ml gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt und 2 h auf Eis inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (3000g, 10 min, 4°C) wurde das Pellet mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gewaschen und in 4 ml Couplingpuffer (0,1M NaHCO₃, 0,5M NaCl, pH 8,3) gelöst. Anschließend erfolgte über Nacht eine Dialyse (Spectra/Por[®] 2 – Dialysemembran, MWCO 12000-14000) der Proteinlösung gegen Couplingpuffer. 1g cyanogenbromid-aktivierte Sepharose (GE Healthcare, München, D) wurde für 20 min in 10 ml 1 mM HCl eingeweicht. Die gequollene Sepharose wurde anschließend auf eine Glasfritte gegeben, mit 200 ml 1 mM HCl gewaschen und mit 10 ml Couplingpuffer equilibriert. Die so vorbereitete Sepharose wurde in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und gemeinsam mit dem dialysierten c-myc Antikörper (4 ml) über Nacht bei 4°C geschwenkt. Dabei binden freie Aminogruppen des Antikörpers an die aktivierte Sepharose. Die Sepharose mit dem immobilisierten c-myc Antikörper wurde anschließend auf einer Fritte mit 10 ml Couplingpuffer gewaschen. Zur Absättigung freier

Bindestellen wurde die Sepharose in einen 15 ml Falcon überführt und 2 h bei RT in 10 ml 0,2 M Glycin in Couplingpuffer geschwenkt. Anschließend wurde sie erneut mehrmals auf der Fitte gespült: 1x mit 10 ml Acetatpuffer (0,1 M Na-acetat, 0,5 M NaCl; pH 4), 1x mit 10 ml Trispuffer (0,1 M Tris, 0,5 M NaCl pH 8) und 4x mit 10 ml Couplingpuffer. Bis zum nächsten Schritt wurde die Sepharose bei 4°C in PBS aufbewahrt. Eine Lagerung über längere Zeit kann in 30 % Ethanol in PBS erfolgen.

Herstellen eines Proteinrohextraktes zur Reinigung des anti-ABA scFv

Der anti-ABA scFv wurde aus Blättern der transgenen Linie 337 (vgl. Abb. 7), die den Antikörper unter Kontrolle des Ubiquitinpromotors aus Mais exprimiert, gereinigt. Hierzu wurden 10 g des unter flüssigem Stickstoff gemörserten Blattmaterials mit 30 ml PBS gemischt. Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass eine Ultraschallbehandlung der Probe zu größeren Proteinausbeuten führt. Daher wurde die Suspension 5 min in Fünfsekunden-Intervallen mit Ultraschall behandelt (Vibra Cell, Sonics & Materials, Danbury, CT, USA), bevor überschüssige Blattbestandteile durch zweimalige Zentrifugation (5000 g, 4°C, 15 min und 16000 g, 4°C, 30 min) entfernt wurden.

Reinigung des anti-ABA scFv über c-myc-Sepharose

Um den anti-ABA scFv an die c-myc-Sepharose zu binden, wurde die Sepharose ca. 16 h bei 4°C im Rohproteinextrakt geschwenkt. Anschließend wurde die Sepharose auf eine Polypropylen-Säule (5 ml, Qiagen, Hilden, D) gegeben und mit 200 µl PBS gespült. Der anti-ABA scFv wurde sauer eluiert (20 ml 0,1 M Glycin, 0,1 M NaCl, pH 2,2). Das Eluat wurde in 20 Fraktionen von je 1 ml aufgefangen und sofort mit 250 µl 1M Tris pH 8 neutralisiert. Mittels Western-Blot wurden die einzelnen Fraktionen auf ihren Gehalt an anti-ABA scFv überprüft.

3.6.5. Überprüfen der Spezifität des anti-ABA scFv mittels ELISA

ELISA-Platten (MaxiSorp™ Surface, Nunc A/S, Roskilde, Dänemark) wurden mit Abscisinsäure-4-BSA-Konjugat (hergestellt nach Quarrie und Galfre, 1985) beziehungsweise Oxazolone-BSA-Konjugat (jeweils 1:2000 in 0,05 M Karbonatpuffer; Fiedler und Conrad, 1995) bei 4°C über Nacht beschichtet. Nach dem Verwerfen dieser Lösungen wurden freie Bindestellen der ELISA-Platten mit 3% (w/v) BSA in PBST [150 mM NaCl; 8 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; 0,1% (v/v) Tween20; pH 7,6] blockiert (1,5 h, RT). Anschließend wurde die BSA-Lösung entfernt und Verdünnungen des aus Gerstenblättern gereinigten anti-ABA scFv in 1% (w/v) BSA in PBST zugegeben. Als Negativkontrolle diente 3% (w/v) BSA in PBST. Die ELISA-Platte wurde für 2 h bei 24°C inkubiert (Inkubator1000, Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, D). Nach Entfernen der Antikörperlösung wurde mehrmals mit PBST gewaschen. Anschließend wurde die Platte 2 h bei 24°C mit c-myc-Antikörper (1:50 in 1% BSA in PBST) inkubiert und erneut mit PBST gewaschen. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mit einem Kaninchen-anti-Maus IgG-Alkalische Phosphatase-Konjugat (vgl. Tab. 5), das 1:2000 in 1% (w/v) BSA in PBST verdünnt wurde (1 h, 24°C). Anschließend wurde nochmals intensiv mit PBST sowie PBS (150 mM NaCl; 8 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; pH 7,6) gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit 1 mg/ml

Paranitrophenylphosphat (SIGMA FASTTM pNPP-Substrattabletten, Sigma-Aldrich, Steinheim) in 10% Diethanolamin, 0,01% MgCl₂ und 3 mM Natriumazid (pH 9,8). Nach hinreichender Farbentwicklung wurde die Farbintensität bei 405 nm spektrophotometrisch ermittelt (ELISA Reader Infinite M200, Tecan, Crailsheim, D).

3.6.6. Kompetitiver ELISA zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D des anti-ABA scFv

Zur Ermittlung der Dissoziationskonstante des anti-ABA scFv wurde ein kompetitiver ELISA durchgeführt. Die ELISA-Platten wurden mit ABA-BSA-Konjugat beschichtet und mit 3% (w/v) BSA in PBST blockiert, wie im Absatz 3.6.5. beschrieben. 1 µl der Reinigungsfraction 2 (vgl. 3.6.4.) wurde für 2 h mit unterschiedlichen Konzentrationen freier (\pm)-ABA (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) in 3% (w/v) BSA in PBST vorinkubiert, bevor 90 µl der Mischung auf die ELISA-Platte gegeben wurden. Als Negativkontrolle diente 3% (w/v) BSA in PBST. Für jede Konzentration fand eine Doppelbestimmung statt. Nach zweistündiger Inkubation erfolgte der Nachweis des an das ABA-BSA-Konjugat gebundenen scFv wie unter 3.6.5. beschrieben.

3.7. Inhaltsstoffanalysen

Für die Inhaltsstoffanalyse wurden reife Gerstenkaryopsen in einer Schwingmühle gemahlen und das Pulver anschließend über Nacht bei 60°C nachgetrocknet. Unreife Samen verschiedener Entwicklungsstadien wurden drei Tage gefriergetrocknet (-15°C, 1,030 mbar; Gefriertrocknungsautomat Christ[®] LOC 1m alpha 1-4, Christ, Göttingen, D) bevor sie mit dem Mörser gemahlen wurden. Die für die Inhaltsstoffanalysen benötigten Enzyme stammten von der Firma Roche (Basel, Schweiz).

3.7.1. Extraktion und Quantifizierung von Speicherproteinen

Für die Extraktion der Speicherproteine wurden 20 mg der getrockneten gemahlene Probe mit 1,5 ml PBS (pH 7,6) versetzt und 25 min geschüttelt. Nach einer Zentrifugation (15 min, 13000 g, RT) wurde der Überstand abgenommen, in dem sich die Albumine und Globuline befinden. Das Pellet wurde mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend 20 min in 1,5 ml 18,5% Isopropanol geschüttelt. Nach einer Zentrifugation (15 min, 13000 g, RT) wurde der Überstand abgenommen. In ihm befinden sich die Prolamine. Die Konzentration der löslichen Proteine in den Überständen wurde mit dem 'BCA Protein Assay Kit' (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach Herstellerangaben bestimmt. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung vorgenommen. Als Blindwert diente der jeweilige Extraktionspuffer. Als Standardprotein wurde BSA verwendet.

3.7.2. Bestimmung des Gesamtkohlenstoff- und -stickstoffgehaltes

Der relative Gehalt der Karyopsen an Gesamtkohlenstoff und Gesamtstickstoff wurde mit einem Elementaranalysator nach der Dumas-Verbrennungsmethode bestimmt (Elementaranalysator Vario EL III, Elementar, Hanau, D). Diese basiert auf der vollständigen Oxidation einer Probe durch die Verbrennung in einer Sauerstoff-Atmosphäre bei Temperaturen um 1000°C. Es entstehen CO₂, H₂O,

N_xO_y und N_2 sowie Spuren anderer Gase. Die Verbrennungsgase werden über heißes Kupfer geleitet um den Sauerstoff zu entfernen und vorhandene Stickoxide in Stickstoff umzuwandeln. Das resultierende Gasgemisch wird anschließend durch eine H_2O -Falle geleitet. Das CO_2 der Probe wird an eine Absorbtionssäule gebunden um das verbliebene N_2 mittels eines Wärmeleitfähigkeitsdetektors zu quantifizieren. Nach der thermischen Desorption des CO_2 von der Säule wird dieses auf die gleiche Weise bestimmt.

Zur Analyse wurden 3 mg gemahlene Probenmaterial von gefriergetrockneten unreifen bzw. reifen Karyopsen eingesetzt. Jede Messung fand in sechs biologischen Wiederholungen statt.

3.7.3. Extraktion von Stärke und löslichen Zuckern und Aminosäuren

Zur Bestimmung des Gehaltes an Stärke, löslichen Zuckern und Aminosäuren wurden 10 mg der jeweiligen Probe eingewogen, mit 1 ml 80% Ethanol und 15 μ l 5 mM Norvalin versetzt und für 30 min bei 60°C geschüttelt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 13000 rpm, RT) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde weitere zwei Male in 500 μ l 80% Ethanol suspendiert und nachextrahiert. Nach dem Zentrifugieren (10 min, 13000 rpm, RT) wurden alle Überstände miteinander vereinigt und mittels Vakuumzentrifugation eingedampft. Die so extrahierten Zucker und Aminosäuren wurden anschließend in 400 μ l H_2O_{dd} aufgenommen und wie in wie in 3.7.5. und 3.7.6. beschrieben vermessen. Im verbleibenden Pellet befindet sich die Stärke.

3.7.4. Bestimmung des Stärkegehaltes einer Probe

Für die Stärkebestimmung wurde das Stärkpellet (vgl. 3.7.3.) in 1,5 ml 2 M HCl gelöst und 1 h bei 95°C geschüttelt. Dabei wurde die Stärke durch saure Hydrolyse in Glukose umgewandelt. Diese wird auf enzymatischem Wege quantifiziert, wie Abbildung 2 veranschaulicht: D-Glukose wird durch die Hexokinase unter ATP-Verbrauch phosphoryliert, wobei D-Glukose-6-phosphat und ADP entstehen. Glukose-6-phosphat wird durch die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase in Anwesenheit von NAD zu D-Glukonat-6-phosphat oxidiert. Es entsteht NADH. Die gebildete Menge an NADH ist proportional zu der durch die Stärkehydrolyse gebildeten D-Glukose-Menge und wird in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen.

Zur Bestimmung des Blindwertes wurden 5 μ l der Probe mit 750 μ l Bestimmungspuffer (100 mM Imidazol pH 6,9, 5 mM $MgCl_2 \times 6 H_2O$, 2 mM NAD, 1 mM ATP) und 2 U Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 7500 U Hexokinase zugegeben und die Extrakte weitere 25 min bei RT inkubiert, bevor sie erneut vermessen wurden.

3.7.5. Glukose-, Fruktose- und Saccharosebestimmung

10 μ l des Zucker-Extraktes (vgl. 3.7.3.) wurden mit 750 μ l Bestimmungspuffer (100 mM Imidazol pH 6,9, 5 mM $MgCl_2 \times 6 H_2O$, 2 mM NAD, 1 mM ATP) und 2 U G6P-DH in einer Küvette vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei RT wurde der Blindwert in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. Nach Zugabe von 3750 U Hexokinase und weiteren 10 min Inkubation wurde das entstandene NADH gemessen, das stöchiometrisch der eingesetzten

Glukosemenge entspricht. Anschließend wurden 17,5 U Glukose-6-Phosphat-Isomerase zugegeben, erneut 30 min inkubiert und das entstandene NADH gemessen, das der Fruktosemenge der Probe gleichkommt. Für die Bestimmung des Saccharosegehaltes wird schließlich der D-Glukosegehalt nach enzymatischer Hydrolyse der Saccharose bestimmt. Der Probe werden 18,12 U β -Fruktosidase zugesetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit wird erneut die Messgröße NADH bestimmt.

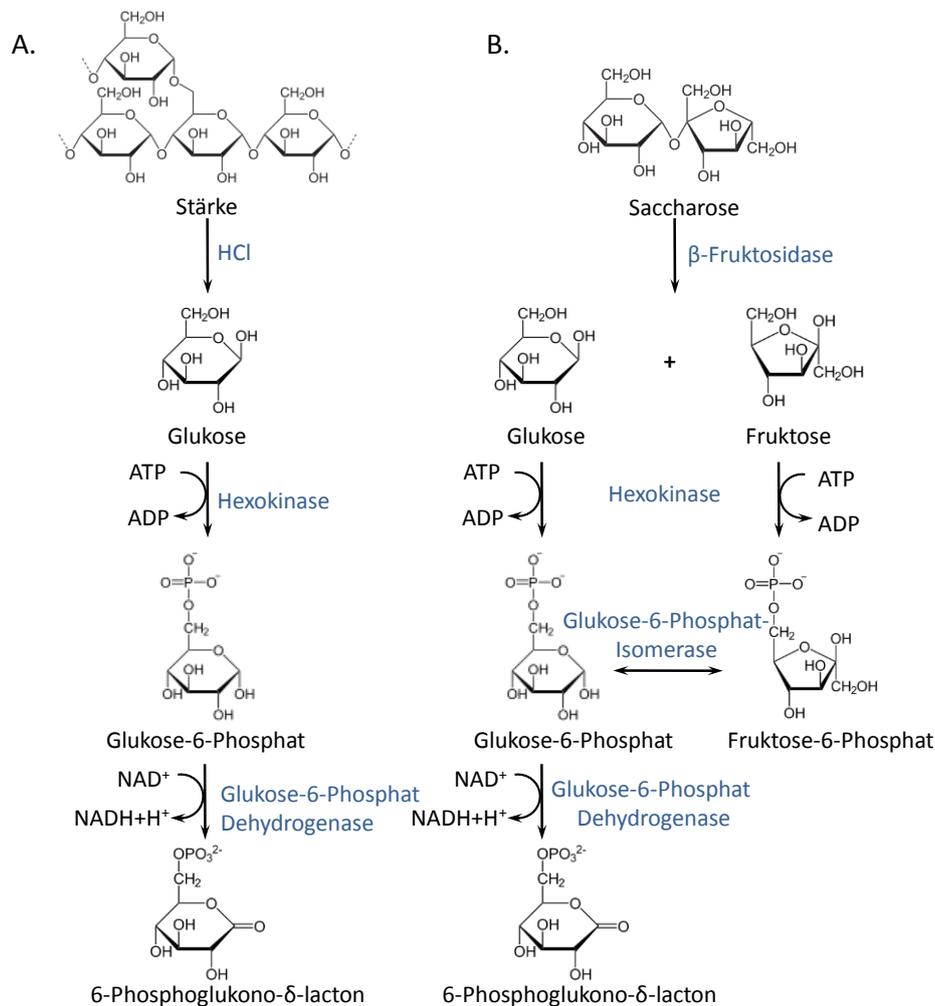


Abb. 2: Enzymatische Reaktionen, die zur Bestimmung des Stärke- (A), Glukose-, Fruktose- und Saccharose-Gehaltes (B) einer Probe genutzt werden. Das entstandene NADH wird im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 340 nm quantifiziert. Das NADH entspricht stöchiometrisch der Menge an Hexosen, die in 6-Phosphoglukono- δ -lacton umgewandelt wurden.

3.7.6. Aminosäurebestimmung in Gesamtkaryopsen

Die Bestimmung des Aminosäuregehaltes von Gesamtkaryopsen erfolgte mittels UPLC. Die Derivatisierung von 10 μ l des Aminosäureextraktes (vgl. 3.7.3.) erfolgte nach der AccQ[®]Tag Methode (Waters, Milford, MA, USA; <http://waters.com>) nach Herstellerangaben. Die Kalibrierung der UPLC-Anlage sowie die Messung der Aminosäuren erfolgte wie von Thiel und Kollegen (2009) beschrieben. Hierzu wurde eine AccQ[®]Tag Ultra Column (2,1 x 100 mm) in einem Waters Acquity UPLC[®] System verwendet (beides Waters, Milford, MA, USA).

3.7.7. ABA-Messung

Die Bestimmung des Abscisinsäuregehaltes von Gerstenkaryopsen wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe „Jasmonat-Wirkungsweise“ am Institut für Pflanzenbiochemie (IPB) Halle durchgeführt. Abscisinsäure wurde extrahiert und gemessen, wie von Miersch *et al.* (2008) beschrieben. Am Protokoll wurden folgende Modifikationen vorgenommen: Als interner Standard wurde 1 ng ($^2\text{H}_6$)-cis,trans-ABA je 5 mg Probenfrischeinwaage zugesetzt. Die Proben wurden auf eine DEAE-Sephadex A25 Säule (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) gegeben, die anschließend mit 3 ml 1 M Essigsäure in Methanol und 3 ml 1.5 M Essigsäure in Methanol gewaschen wurde. Die Fraktionen wurden vereinigt, eingedampft und durch eine präparative HPLC (Eurospher 100-C18, Knauer, Berlin, D) gereinigt. Die Fraktion mit einer Retentionszeit von 10 bis 12 min wurde aufgefangen, eingedampft und mit Pentafluorbenzylbromid (PBP) derivatisiert. Anschließend wurden die Proben über GC-NCIMS analysiert (Finnigan PolarisQ Massenspektrometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Die Retentionszeiten von ($^2\text{H}_6$)-cis,trans-ABA-PBP-Ester und cis,trans-ABA betragen 17,70 min bzw. 17,78 min. Fragmente mit einem Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) von 269 (ABA-Standard) und 263 (Proben-ABA) wurden quantifiziert.

3.7.8. Metabolitbestimmung in maternalen und filialen Gewebefraktionen

Die Metabolitmessungen in maternalen und filialen Gewebefraktionen von Karyopsen der Linie 363 und des Wildtyps wurden in Zusammenarbeit mit der Gruppe „Angewandte Metabolomanalyse“ am Max-Planck Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie (MPIP) in Potsdam Golm durchgeführt. Pro Entwicklungszeitpunkt und Linie wurden sechs Replikate vermessen. Der Extraktionspuffer wurde vor der Extraktion frisch angesetzt und enthält pro Probe 320 μl Methanol, 10 μl der internen Standardmischung für die polare Phase (0,2 mg/ml Sorbitol, 1 mg/ml 2,3,3,3-d $_4$ -DL-Alanin, 0,5 mg/ml D-(-)-Isoascorbinsäure) und 30 μl Nonadecansäure (2 mg/ml in Chloroform) als quantitativer interner Standard für die Lipidphase. Ca. 30 mg des unter flüssigem Stickstoff gemörserten Probenmaterials wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß eingewogen (die exakte Einwaage wurde festgehalten) und mit 360 μl Extraktionspuffer gut vermischt. Nach 15-minütigem Schütteln bei 70°C wurde die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 200 μl Chloroform gemischt. Anschließend wurde sie 5 min bei 37°C geschüttelt bevor 400 μl Wasser zugesetzt wurden. Nach einem guten Suspendieren der Probe wurde 5 min bei 22000 g und RT zentrifugiert. 500 μl der oberen polaren Phase wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und über Nacht getrocknet (Savant SPD131DDA SpeedVac Concentrator, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Die Derivatisierung der Proben sowie das Bestimmen der Metabolitgehalte mittels TOF-GC-MS wurde wie von Erban und Kollegen beschrieben (2007) durchgeführt.

4. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen tieferen Einblick in die Rolle des Phytohormons ABA während der Speicherphase der Karyopsenentwicklung von Gerste zu gewinnen. Hierzu wurden ABA-immunmodulierte Gerstenlinien hergestellt und im Hinblick auf die Kornentwicklung charakterisiert. Diese Arbeit ist der erste Bericht über eine Immunmodulierung bei einkeimblättrigen Pflanzen.

Einige Ergebnisse, die im Diskussionsteil nicht wieder aufgegriffen werden, werden bereits im Ergebnisteil kurz bewertet.

4.1. Die zur ABA-Immunmodulierung verwendeten Promotoren

4.1.1. Begründung für die Wahl der zur ABA-Immunmodulierung verwendeten Promotoren

Zur samenspezifischen ABA-Immunmodulierung von Wintergerste des Kultivars 'Igri' wurde der 1Ax1-Promotor verwendet (Halford *et al.*, 1992). Er kontrolliert im Weizen die Expression einer Untereinheit eines hochmolekularen Glutenins, welches als Samenspeicherprotein dient, und ist ab dem Beginn der Speicherphase der Samenentwicklung im Endosperm aktiv. Der 1Ax1-Promotor wurde bereits mehrfach für Studien eingesetzt, für die eine starke Expression im Endosperm notwendig ist (He *et al.*, 1999; Pandey *et al.*, 2008). Für den Fall, dass mit diesem Promotor keine ausreichend starke scFv-Expression für eine Immunmodulierung in sich entwickelnden Karyopsen erreicht werden kann, wurde zusätzlich ein zweiter Promotor für die Expression des anti-ABA scFv gewählt. Der Ubiquitin-Promotor aus Mais ist für eine starke ubiquitäre Expression von Transgenen in Einkeimblättrigen bereits etabliert. Er ist in Monokotylen signifikant aktiver als der zur Transformation von zweikeimblättrigen Pflanzen häufig verwendete CaMV 35S-Promotor (Christensen *et al.*, 1992; McElroy und Brettell, 1994), und zeigt auch im Vergleich zu anderen Monokotylen-Promotoren eine besonders starke Expression (Cornejo *et al.*, 1993). Des Weiteren wurde er bereits erfolgreich für die Expression eines funktionellen scFv in Weizen und Reis verwendet. In Weizenkaryopsen wurde von einer scFv-Akkumulation von bis zu 1,5 µg/g, in Reiskaryopsen von bis zu 30 µg scFv pro g Frischgewicht berichtet (Stöger *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2001).

4.1.2. Die Aktivität der verwendeten Promotoren

Yao und Kollegen (2006) bezeichneten den 1Ax1-Promotor als endospermspezifisch, nachdem die 1Ax1-Expression im Weizen-Endosperm mit der in verschiedenen vegetativen Geweben verglichen wurde. Jedoch wurde seine Aktivität nicht in unterschiedlichen Geweben der Karyopse verglichen. Der Ubiquitin-Promotor hingegen ist als ubiquitär und konstitutiv aktiv bekannt (McElroy und Brettell, 1994).

Die genaue Kenntnis darüber, in welchen Geweben der Karyopse die in dieser Arbeit verwendeten Promotoren aktiv sind, ist für die Interpretation der erhobenen Daten von großer Bedeutung. Aus diesem Grund wurden die Gerstenkaryopsen, die das Grün-Fluoreszierende Protein (GFP) unter der Kontrolle des 1Ax1- bzw. des Ubiquitin-Promotors exprimieren (vgl. 2.1.), unter einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop hinsichtlich ihrer GFP-Fluoreszenz untersucht.

Der 1Ax1-Promotor zeigt eine starke Aktivität im Endosperm (Abb. 3B). Zusätzlich ist eine GFP-Fluoreszenz im maternalen Chlorenchym und in den Integumenten zu erkennen, während im Perikarp keine GFP-Expression nachgewiesen werden konnte (Abb. 3D). Unter Beachtung dieser Ergebnisse soll der Einfachheit halber die Expression unter der Kontrolle des 1Ax1-Promotors in der vorliegenden Arbeit weiterhin als endospermspezifisch bezeichnet werden.

Der Ubiquitin-Promotor ist in allen filialen und maternalen Teilen der Karyopse aktiv (Abb. 3A und C), was die Ergebnisse von McElroy und Brettell (1994) bestätigt.

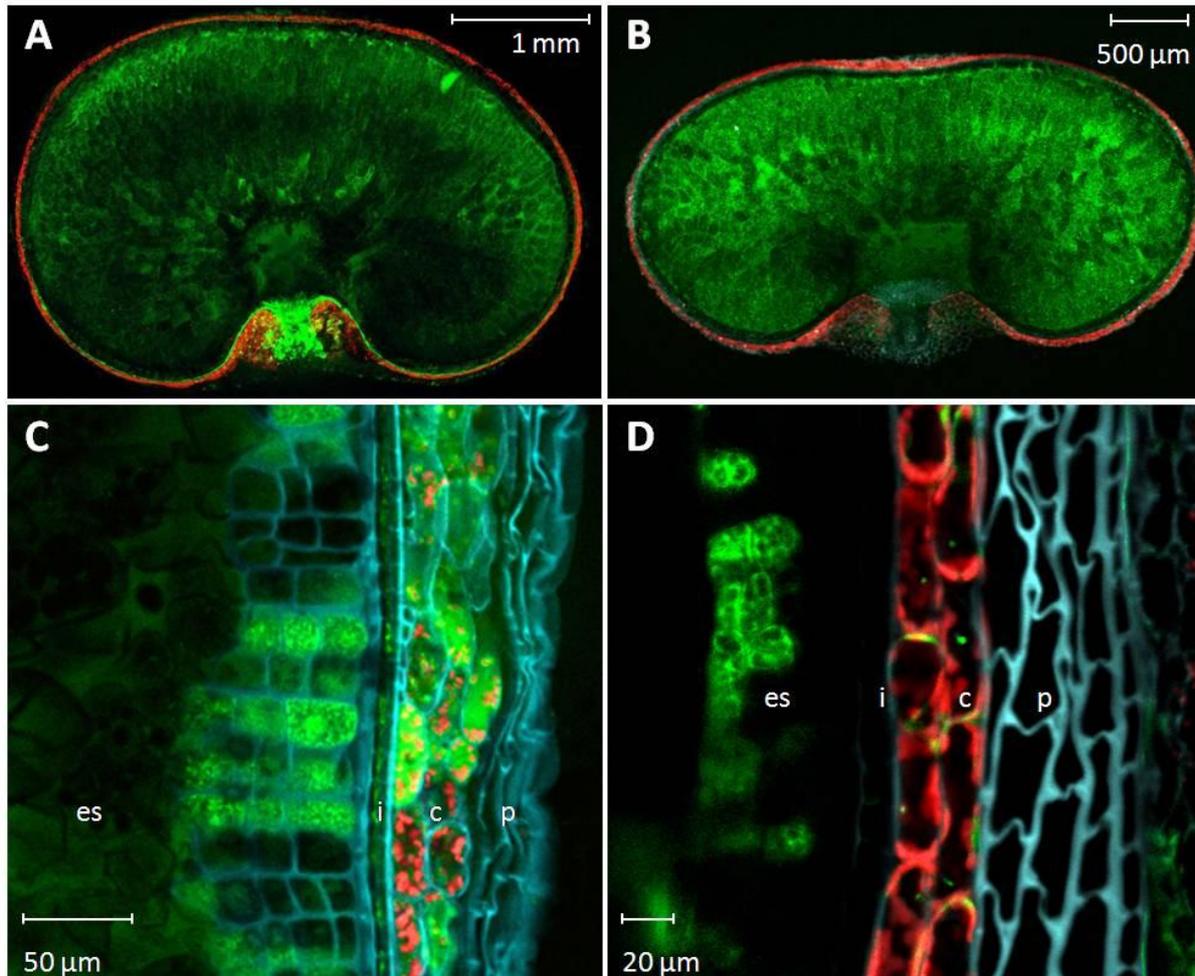


Abb. 3: Aktivität des Ubiquitin-Promotors und des 1Ax1-Promotors in sich entwickelnden Gerstenkaryopsen. Das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) wurde unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors (A und C) bzw. des 1Ax1-Promotors (B und D) exprimiert. Die GFP-Fluoreszenz (grün) zeigt die spezifische Aktivität des jeweiligen Promotors in verschiedenen Geweben der Karyopse während der Speicherphase der Samenentwicklung an. Rote Signale kennzeichnen die Chlorophyll-Fluoreszenz, hellblaue Signale die Autofluoreszenz von Zellwänden. es – Endosperm, i – Integumente, c - Chlorenchym, p – Perikarp.

4.2. Konstruktion der Kassetten für die Expression des anti-ABA scFv in Gerste

Neben Faktoren wie der Transkriptions- und Translationseffizienz ist die Akkumulation und Stabilität rekombinanter Proteine stark von dem Zellkompartiment abhängig, in dem der Antikörper akkumuliert. Sowohl in Blättern als auch in Samen wurde für verschiedene Pflanzenspezies einschließlich Luzerne (Wandelt *et al.*, 1992), *Arabidopsis* (Yang *et al.*, 2005; Lindh *et al.*, 2009), Tabak (Petruccioli *et al.*, 2006) und Raps (Peng *et al.*, 2006) gezeigt, dass eine Retention im

endoplasmatischen Retikulum zu einer stärkeren Akkumulation rekombinanter Proteine führt als die Anreicherung in anderen Zellkompartimenten. Dies gilt auch für die Akkumulation funktioneller Einzelkettenantikörper (Artsaenko *et al.*, 1995; Schouten *et al.*, 1996; Stöger *et al.*, 2000; Saalbach *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2008; Radchuk *et al.*, 2010).

Die Synthese des anti-ABA scFv in das Lumen des ER wurde durch das N-terminale Signalpeptid des *LeguminB4*-Gens aus *Vicia faba* (Bäumlein *et al.*, 1986) erreicht. Um den Nachweis des scFv im Western Blot zu ermöglichen, wurde die Sequenz des c-myc tags (EQKLISEEDLN; Munro & Pelham, 1986) als Translationsfusion an den 3'-Bereich des anti-ABA scFv angefügt. Den C-Terminus des anti-ABA scFv bildet das ER-Retentionssignal KDEL (Munro und Pelham, 1987). Die Terminatorsequenz entstammt dem Nopalinsynthase-Gen aus *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker *et al.*, 1982).

Im Folgenden wird auf die Herstellung der für die Gerstentransformation benötigten binären Plasmide näher eingegangen. Die resultierenden Expressionskassetten, die zur Transformation der Gerste verwendet wurden, sind in Abbildung 4 dargestellt.

Plasmid für die ubiquitäre Expression des anti-ABA scFv

Der Ubiquitin-Promotor wurde mit Hilfe der Restriktionsendonuclease *PstI* aus dem Vektor pAHC25 ausgeschnitten und in den *PstI*-Klonierungsort des Vektors pNOS-BM eingefügt. Die richtige Orientierung des Promotors wurde durch Verdau mit mehreren Enzymen bestätigt. Aus dem Plasmid pRTRA7/3 wurde die Sequenz der Expressionskassette (LeB4-Signalsequenz / codierende Sequenz des anti-ABA scFv / c-myc tag / KDEL ER-Retentionssignal) mit Hilfe der Primer α ABAHindIII_{fw}d1 und α ABAHindIII_{rev}1 amplifiziert (vgl. Tab. 4). Dabei wurden an beide Enden des Amplifikats *HindIII*-Restriktionsschnittstellen angefügt, mit deren Hilfe dieses hinter den Ubiquitin-Promotor in den Vektor pNOS-BM kloniert wurde. Die Expressionskassette einschließlich Ubiquitin-Promotor und Nos-Terminator wurde schließlich durch *SfiI*-Restriktionsspaltung ausgeschnitten und in den Vektor p6U (DNA Cloning Service, Hamburg, D) ligiert, welcher zuvor mit Hilfe des gleichen Enzyms linearisiert wurde. Das resultierende binäre Plasmid p6UubiABA wurde in *A. tumefaciens* transformiert und anschließend zur Gerstentransformation eingesetzt.

Plasmid für die endospermspezifische Expression des anti-ABA scFv

Zur endospermspezifischen Expression wurde der codierende Bereich des anti-ABA scFv einschließlich Signalpeptid, c-myc tag und ER-Retentionssignal mit den Primern α ABAEcoRI_{fw}d2 und α ABAHindIII_{rev}2 aus dem Vektor pRTRA7/3 amplifiziert. Dabei wurde am 5'-Ende eine *EcoRI*- und am 3'-Ende eine *HindIII*-Restriktionsschnittstelle angefügt. Mit Hilfe dieser Restriktionsschnittstellen wurde das gereinigte PCR-Fragment in den intermediären Vektor pNOS-BM eingefügt und dadurch vor die Sequenz des Nopalinsynthase-Terminators aus *A. tumefaciens* gesetzt. Der 1Ax1-Promotor wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* aus dem Plasmid pUC1Ax1 ausgeschnitten und vor die Expressionskassette kloniert. Nach der Kontrolle der Promotororientierung wurde die gesamte Kassette durch *SfiI*-Restriktionsspaltung aus dem pNOS-BM Plasmid isoliert und in den ebenfalls mit *SfiI* geschnittenen binären Vektor p6U überführt. Der resultierende Vektor p6U1Ax1ABA wurde zur Transformation der Gerste eingesetzt.

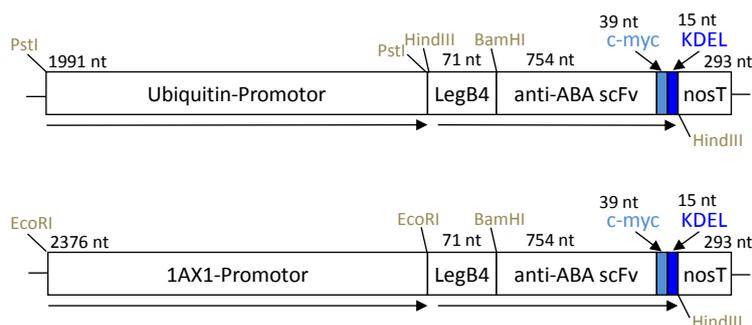


Abb. 4: Schematische Darstellung der Kassetten für die Expression des anti-ABA scFv. Zur ubiquitären Expression wurde der Ubiquitin-Promotor aus Mais, für die endospermspezifische Expression der 1Ax1-Promotor aus Weizen verwendet. Das LeguminB4-Signalpeptid (LegB4) und das ER-Retentionssignal (KDEL) erlauben die Akkumulation des scFv im ER von Pflanzenzellen. Zur Immundetektion des anti-ABA scFv wurde der c-myc tag eingefügt. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu. nt – Nucleotide.

4.3. Transformation und Regeneration primärtransgener Pflanzen

Durch *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer in embryogene 'gri'-Pollenkulturen wurden transgene Gerstenpflanzen (T0) erzeugt. Diese Arbeiten fanden in der Arbeitsgruppe „Pflanzliche Reproduktionsbiologie“ am IPK Gatersleben statt. Für die ubiquitäre bzw. endospermspezifische Expression des scFv wurden 9 bzw. 20 primärtransgene Pflanzen regeneriert.

Bei der Regeneration von Gerstenpflanzen aus androgenetischen Pollenkulturen entstehen neben haploiden auch diploide Pflanzen. Circa 60 % der Primärtransformanden gehen durch eine Verdopplung ihres Chromosomensatzes spontan in den diploiden Zustand über (Kumlehn *et al.*, 2006). Der genaue Zeitpunkt dieses Ereignisses ist jedoch unbestimmt. In Abhängigkeit davon, ob eine Zelle zum Zeitpunkt der Transformation haploid oder bereits diploid vorliegt, trägt die daraus regenerierte Pflanze das Transgen im homozygoten oder heterozygoten Zustand. Die Ploidie der regenerierten Pflanzen wurde per Durchflusscytometrie bestimmt.

Von 29 Pflanzen waren 15 haploid, während 14 als spontan diploid identifiziert wurden (vgl. Tab. 6). Alle haploiden Primärtransformanden wurden einer Colchizinbehandlung unterzogen. Bei den resultierenden doppelthaploiden Pflanzen ist keine Segregation des transformierten Konstruktes und somit in folgenden Generationen zu erwarten. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für eine stabile Transgenexpression in den Nachkommen der immunmodulierten Pflanzen. Bei den spontan diploiden Pflanzen sind ohne weitere Untersuchungen keine Aussagen über deren Zygotie in Bezug auf das scFv-Gen möglich.

4.4. Bestimmung der Kopienzahl des anti-ABA scFv-Gens im Genom der Primärtransformanden

Die Kopienzahl des anti-ABA scFv-Gens im Genom der primärtransformierten Pflanzen wurde zunächst per Southern Blot bestimmt. Zur Spaltung der genomischen DNA wurde für alle Linien das Restriktionsenzym *Bam*HI eingesetzt. Zusätzlich wurde für die 1Ax1-Promotor-Linien ein Southern mit dem Enzym *Hind*III durchgeführt. Das anti-ABA scFv-Gen enthält für beide Restriktionsendonucleasen keine Erkennungssequenz.

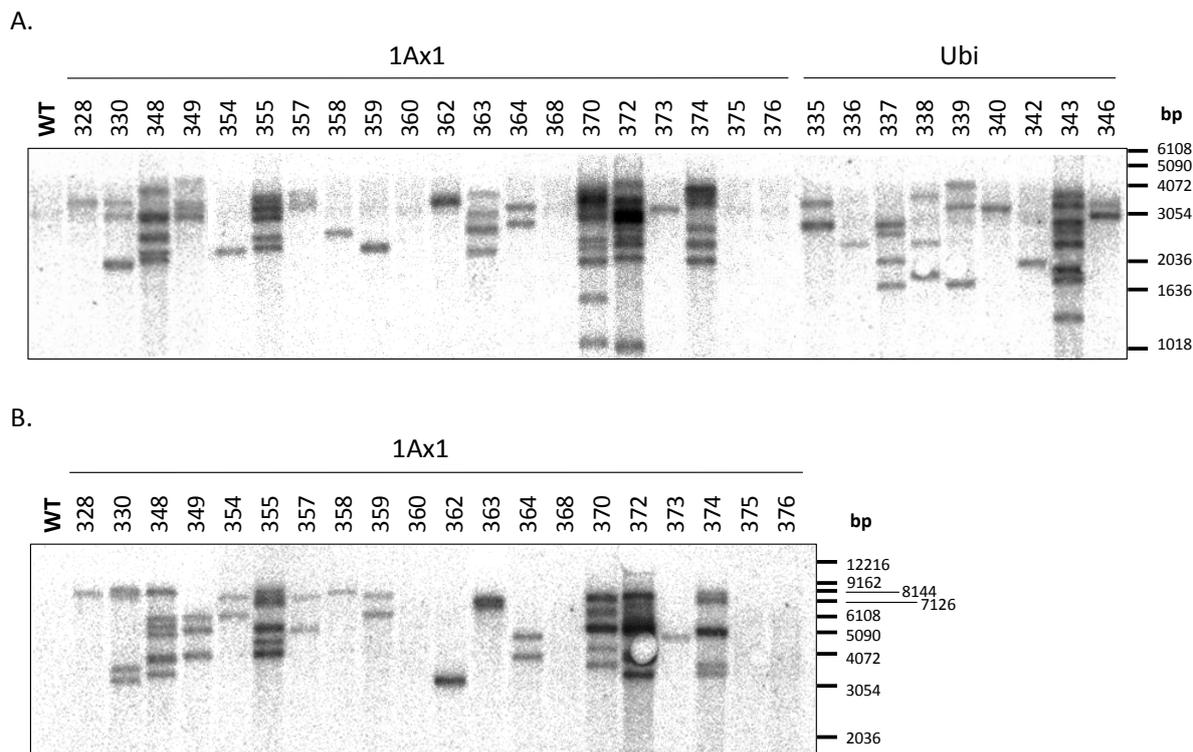


Abb. 5: Southern Blot Analyse der genomischen DNA der Primärtransformanden. 10 µg genomischer DNA aus Blättern wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI (A.) bzw. *Hind*III (B.) gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und auf einer Nylonmembran immobilisiert. Die Hybridisierung erfolgte unter stringenten Bedingungen mit einem 447 bp großen, radioaktiv markierten Fragment des anti-ABA scFv-Gens. Ubi bzw. 1Ax1 – Promotor für die Expression des anti-ABA scFv, bp – Basenpaare.

Die in beiden Southern Blots für die 1Ax1-Linien ermittelten Kopienzahlen stimmen für fast alle T0-Linien miteinander überein. Sie sind in der Tabelle 6 aufgeführt. Für einige Linien, wie die Linien 354 und 359, zeigen die Southern-Bilder jedoch nach einer DNA-Spaltung mit *Bam*HI bzw. *Hind*III eine voneinander abweichende Anzahl von Banden. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass beim *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer mehrere Kopien der T-DNA an den gleichen Locus des Wirtszellgenoms integriert wurden, was bei dieser Methode nicht ungewöhnlich ist. De Neve, De Buck und Kollegen (1997; 1999) berichten, dass T-DNA Loci häufig aus mehreren T-DNA-Kopien bestehen, die in komplexen T-DNA Strukturen miteinander verknüpft sein können. Die Fusion von T-DNAs findet noch vor der Integration in das pflanzliche Genom über die RB oder LB statt, wobei es auch zu Deletionen und Insertionen kommen kann. Die *Bam*HI-Schnittstelle des in dieser Arbeit verwendeten Transformationskonstruktes befindet sich zwischen den Sequenzen des LeB4-Signalpeptides und des scFv-Gens. Eine *Hind*III-Restriktionsschnittstelle wurde durch den verwendeten Klonierungsprimer zwischen die Sequenz des KDEL-Peptides und die Terminatorsequenz eingefügt. Beide Restriktionsschnittstellen umrahmen somit die zur Sonde komplementäre Sequenz des anti-ABA scFv-Gens (vgl. Abb. 4). In Abhängigkeit davon, ob es bei einer T-DNA Fusion zu einer *head-to-head*, *head-to-tail* oder *tail-to-tail*-Fusion kommt, kann sich die Anzahl der im Southern Blot nachgewiesenen Banden bei der Verwendung von unterschiedlichen Restriktionsenzymen unterscheiden.

Um Gewissheit über die Kopienzahl des anti-ABA scFv-Gens im Genom der betroffenen Linien zu erlangen und um auch die im Southern Blot bestimmte Kopienzahl für die Ubiquitin-Promotor-Linien

zu verifizieren, wurde zusätzlich eine qRT-PCR-Analyse durchgeführt. Mit dieser Methode lässt sich schnell und einfach das Auftreten einer Sequenz von Interesse in einer DNA-Probe quantifizieren. Befinden sich darüber hinaus mehrere Kopien eines Gens am gleichen Locus, so ist diese Methode dem Southern Blot überlegen. Jedoch liefert die qRT-PCR nur bis zu einer Kopienzahl von vier verlässliche Ergebnisse. Voraussetzung ist eine Referenz-DNA-Probe mit einer Kopie des Gens von Interesse. Als Referenz-DNA diente die DNA der 1Ax1-Promotor Pflanzen 328 und 358, für die in beiden Southern-Analysen nur eine Kopie des anti-ABA scFv-Gens nachgewiesen wurde. Zur Normalisierung der Proben untereinander wurde das Actin-Gen aus Gerste (Michalek *et al.*, 1999; GenBank Akzessionsnummer AJ234400) verwendet.

Für die Berechnung der Kopienzahl wurde zunächst angenommen, dass alle spontan diploiden Pflanzen das Transgen in heterozygotem Zustand tragen, wie es von Kumlehn und Mitarbeitern (2006) in 80 % aller untersuchten Fälle festgestellt wurde. Die nach der qRT-PCR berechneten Kopienzahlen sind in Tabelle 6 gelistet. Sie weichen auch bei den als spontan diploid identifizierten Pflanzen nicht von der im Southern Blot bestimmten Kopienzahl ab. Daher ist anzunehmen, dass diese Pflanzen tatsächlich sämtlich heterozygot in Bezug auf das Transgen sind. Dieses Ergebnis weicht von der Beobachtung von Kumlehn *et al.* (2006) ab. Die Autoren berichten jedoch, dass eine spontane Genomverdopplung bevorzugt während der frühen androgenetischen Entwicklung stattfindet, während die Transformation erst nach einer umfangreichen Pollenvorkultur durchführbar ist. Daher gibt es zum Zeitpunkt der Transformation nur noch wenige Zellen, die in der Lage sind, eine spontane Genomverdopplung einzugehen. Unterschiede von wenigen Stunden in der Dauer der Pollenvorkultur können somit zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

Aus den Southern Blots und qRT-PCR Analysen geht hervor, dass die Linien 360, 368, 375 und 376 keine Kopie des scFv-Gens tragen. Aus insgesamt 29 regenerierten Pflanzen wurden somit 25 unabhängige transgene Linien etabliert.

Tab. 6: Übersicht über die Ergebnisse der Kopienzahlbestimmung des anti-ABA scFv-Gens bei den Primärtransformanten durch Southern Blot und qRT-PCR.

Pflanzennummer	Promotor	Spontan diploid	Kopienzahl		Berechnet nach qRT-PCR
			im Southern-Blot		
			<i>Bam</i> HI	<i>Hind</i> III	
335	Ubi		2	-	1,9
336	Ubi		1	-	1,0
337	Ubi	x	4	-	3,7
338	Ubi	x	3	-	3,1
339	Ubi	x	3	-	2,7
340	Ubi		1	-	1,2
342	Ubi	x	1	-	1,3
343	Ubi		≥ 8	-	8,1
346	Ubi		2	-	1,9
328	1Ax1		1	1	1,3
330	1Ax1	x	3	3	3,3
348	1Ax1	x	≥ 5	≥ 6	6,0
349	1Ax1	x	3	3	2,5
354	1Ax1	x	1	2	1,9
355	1Ax1		≥ 5	≥ 6	5,6
357	1Ax1	x	2	2	2,1
358	1Ax1		1	1	1,1

Fortsetzung Tab. 6:

Pflanzen- nummer	Promotor	Spontan diploid	Kopienzahl		Berechnet nach qRT-PCR
			im Southern-Blot		
			<i>Bam</i> HI	<i>Hind</i> III	
359	1Ax1	x	1	2	2,2
360	1Ax1		0	0	0,4
362	1Ax1		≥ 1	≥ 1	2,3
363	1Ax1		4	≥ 2	3,9
364	1Ax1		2	2	1,8
368	1Ax1		0	0	0,4
370	1Ax1	x	≥ 8	≥ 5	8,7
372	1Ax1		≥ 8	≥ 6	10,5
373	1Ax1	x	1	1	1,09
374	1Ax1	x	6	≥ 5	6,4
375	1Ax1	x	0	0	0,4
376	1Ax1		0	0	0,3

4.5. Expression des anti-ABA scFv in reifen Körnern

Das Expressionsniveau des anti-ABA scFv wurde in den reifen Samen der Primärtransformanten durch Western Blot über den *c-myc tag* semiquantitativ bestimmt (Abb. 6 bzw. 3.6.3). Als Standard für die Proteinmenge diente ein *c-myc* markierter Nanobody gegen den humanen Tumornekrosefaktor α (TNF α), der mit 100 Wiederholungen des elastinähnlichen Proteins (ELP) verknüpft ist (α TNF-ELP V_HH, Conrad *et al.*, 2011). Dieser eignet sich trotz der unterschiedlichen Proteinmasse von α TNF-ELP V_HH und anti-ABA scFv als Vergleichsprotein. Die Quantifizierung des α TNF-ELP V_HH erfolgte basierend auf dem Extinktionskoeffizienten des Proteins nach der Methode von Gill und Hoppel (1989). Auf diese Weise wurde die Konzentration des Einzelkettenantikörpers ohne Berücksichtigung des ELP-Fusionspartners bestimmt, welcher aufgrund seiner Aminosäurezusammensetzung nicht in die Proteinbestimmung eingeht.

Pflanzen, die das scFv unter Kontrolle des 1Ax1-Promotors exprimieren, erreichen in reifen Samen eine stärkere Antikörperakkumulation als Ubiquitin-Promotor-Pflanzen (Abb. 7). In den Ubiquitin-Promotor-Linien wurde eine Expression von höchstens 0,0007 % TSP (gesamtlösliches Protein; *Total Soluble Protein*) in reifen T1-Karyopsen erreicht (Linie 346), während bei der Expression unter dem 1Ax1-Promotor bis zu 0,0032 % TSP (Linie 372) nachgewiesen wurden. Linien mit nur einer Kopie des Genes zeigten ausnahmslos eine schwache Expression von höchstens 0,0001 % TSP bei konstitutiver Expression (Linie 340) bzw. 0,0003 % TSP bei endospermspezifischer Expression (Linie 372). Jedoch besteht kein linearer Zusammenhang zwischen Kopienzahl und Antikörperakkumulation.

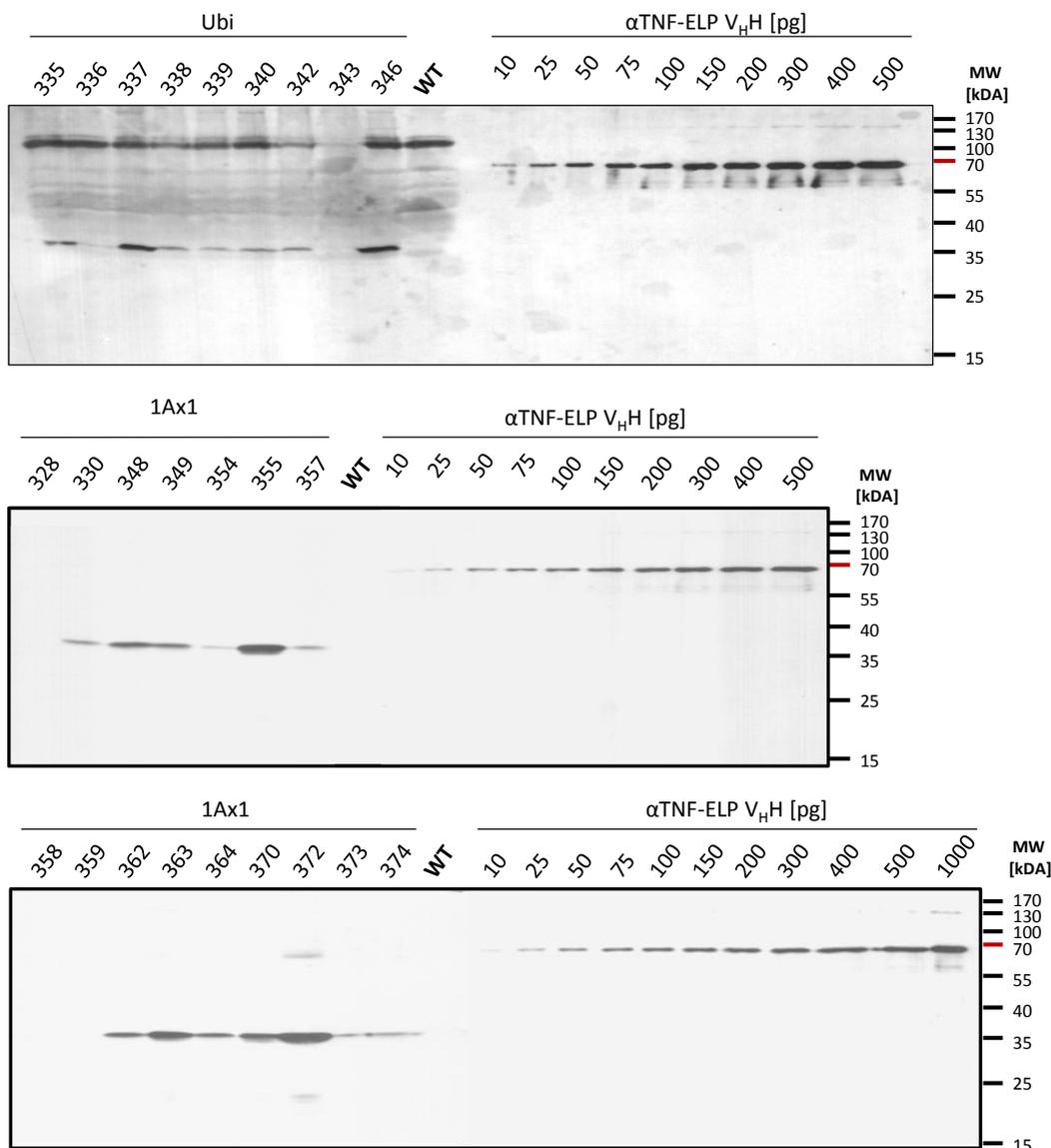


Abb. 6: Semiquantitative Bestimmung des Expressionsniveaus des anti-ABA scFv in reifen Karyopsen der Primärtransformanten. Pro Spur wurden 30 μ g Rohproteinextrakt bzw. unterschiedliche Mengen des α TNF-ELP V_HH-Antikörpers aufgetragen. Nach der Trennung der Proteine im SDS-PAA-Gel (12%) unter reduzierenden Bedingungen erfolgte die Detektion im Western Blot mit dem anti-c-myc Antikörper gefolgt von einem anti-Maus IgG Peroxidasekonjugat und anschließender ECL-Reaktion. Ubi bzw. 1Ax1 – Promotor für die Expression des anti-ABA scFv.

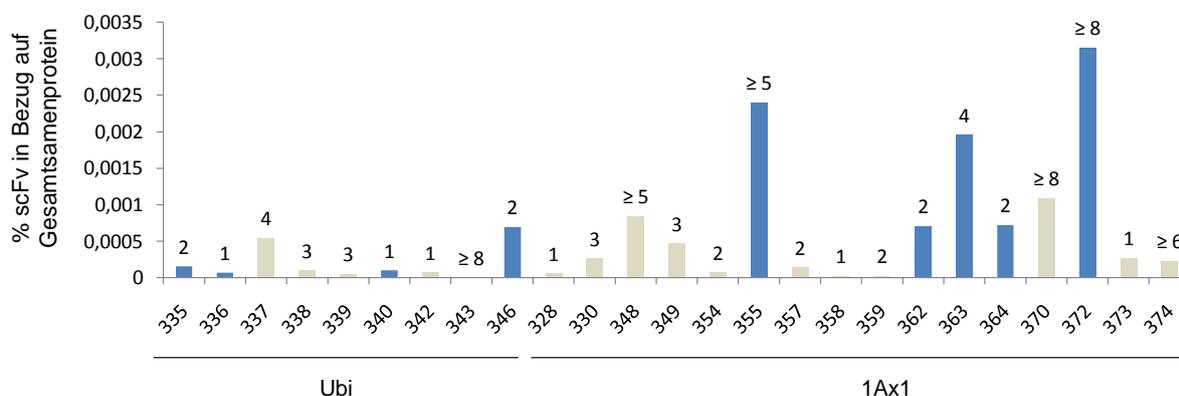


Abb. 7: Menge des anti-ABA scFv in reifen Karyopsen der Primärtransformanten. Die Kopienzahl der jeweiligen Linie ist oberhalb eines jeden Balken angegeben. Blauer Balken - die primärtransformierte Pflanze war zunächst haploid. Sie wurde einer Colchizinbehandlung unterzogen, um einen diploiden Zustand zu

erreichen. Grauer Balken – Die Primärtransformante war spontan diploid. Ubi bzw. 1Ax1 - Promotor für die Expression des anti-ABA scFv.

4.6. Expression des anti-ABA scFv in sich entwickelnden Karyopsen

Die Akkumulation des anti-ABA scFv konnte in den Karyopsen der konstitutiv anti-ABA scFv exprimierenden Linien zu allen untersuchten Entwicklungszeitpunkten nachgewiesen werden (Abb. 8). In den Linien mit endospermspezifischer Expression begann die Anreicherung des scFv hingegen erst ab dem 7. Tag nach der Blüte.

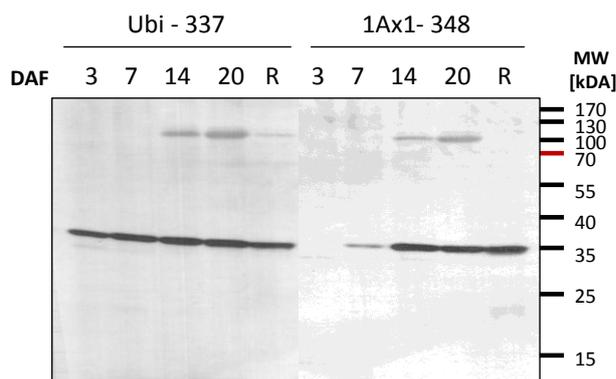


Abb. 8: Gegenüberstellung der anti-ABA scFv-Akkumulation in sich entwickelnden Karyopsen und in reifen trockenen Körnern (R) einer konstitutiv (Ubi) bzw. einer endospermspezifisch exprimierenden Linie (1Ax1). Das Expressionsprofil der dargestellten Linien ist repräsentativ für alle Ubi- bzw. 1Ax1-Linien. Ubi bzw. 1Ax1 - Promotor für die Expression des anti-ABA scFv.

4.7. Auswahl von Linien für weiterführende Analysen

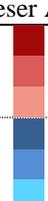
Für eine umfangreiche Analyse des Einflusses der ABA-Immunmodulierung auf die Samenentwicklung bei Gerste wurden pro transformiertem Promotor-Konstrukt drei Linien ausgewählt. Für die Analyse nachfolgender Generationen werden Linien mit einer sowohl starken als auch stabilen Expression des Antikörpers benötigt. Neben einem hohen scFv-Gehalt in den Karyopsen sollen die zur Analyse ausgewählten Linien eine höchstens moderate Kopienzahl des scFv-Gens aufweisen, denn eine variable Expressionshöhe und *Silencing*-Effekte treten besonders häufig bei einer hohen Anzahl von Transgenkopien im Genom auf (Schubert *et al.*, 2004; Kohli *et al.*, 1999). Zudem wurden aufgrund der langen Generationszeit der Wintergerste ‘Igri’ (zehn Monate) bevorzugt bereits homozygote Linien ausgewählt. Die zur Auswahl relevanten Parameter sind in Abbildung 7 zusammengefasst.

Für die endospermspezifische Expression wurden unter Berücksichtigung der genannten Kriterien die Linien 362, 363 und 364 für weitere Untersuchungen ausgewählt. Aufgrund der geringen Antikörperakkumulation in den Karyopsen der meisten Primärtransformanten mit Ubiquitin-Promotor wurde neben den homozygoten Linien 335 und 346 auch die stark exprimierende aber heterozygote Linie 337 zur weiteren Analyse ausgewählt. Von dieser Linie wurden doppelthaploide Pflanzen hergestellt, welche im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr analysiert werden konnten. Parallel zur Untersuchung der anderen homozygoten Linien wurden daher erste Analysen auch an segregierenden T2-Karyopsen der Linie 337 durchgeführt. Hierfür wurde stets eine Mischprobe aus möglichst vielen Karyopsen eingesetzt.

In Tabelle 7 sind die nach den oben genannten Kriterien ausgewählten Linien zusammengefasst. Jeder dieser Linien wurde eine Farbe zugeordnet, in der die zugehörigen Ergebnisse in dieser Arbeit

präsentiert werden. Alle nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurden an transgenen T1-Pflanzen bzw. den sich an der T1-Mutterpflanze entwickelnden Karyopsen (T2) durchgeführt.

Tab. 7: Übersicht über die für weitere Analysen ausgewählten transgenen Linien. Die zur Auswahl angewandten Kriterien sind im Text erläutert. *Die Linie 337 ist heterozygot. Sie wurde zur Herstellung doppelthaploider Pflanzen herangezogen.

Promotor	Linie	Kopienzahl	scFv-Expression [% TSP]	Darstellungsfarbe in dieser Arbeit
Ubi	335	2	0,00015	
Ubi	337	4*	0,00054	
Ubi	346	2	0,00069	
1Ax1	362	2	0,00070	
1Ax1	363	4	0,00195	
1Ax1	364	2	0,00072	

4.8. Isolierung und funktionelle Charakterisierung des anti-ABA scFv Antikörpers aus Gerste

4.8.1. Spezifität der ABA-Bindung durch den anti-ABA scFv aus Gerste

Die Spezifität des scFv-Antikörpers aus Gerste gegen Abscisinsäure wurde mit Hilfe eines direkten ELISA überprüft. Hierfür wurde der anti-ABA scFv aus Blattmaterial der ubiquitär exprimierenden Linie 337 affinitätsgereinigt (vgl. 3.6.4.). Dieser Schritt entfernt die endogene pflanzliche Abscisinsäure, die die Ergebnisse der Immuno-Assays beeinflussen würde. Als Kontrolle diente das an BSA gekoppelte synthetische Hapten 2-Phenylloxazol-5-on (Oxazolone). Abbildung 9 verdeutlicht, dass der anti-ABA scFv spezifisch an ABA-BSA, nicht aber an das Oxazolone-BSA-Konjugat bindet.

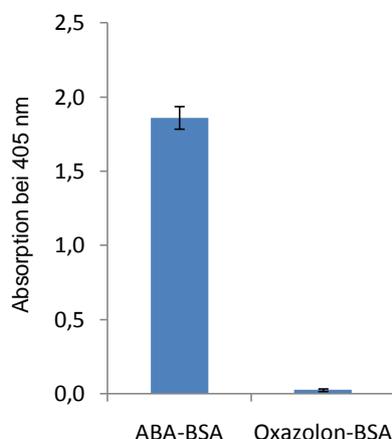


Abb. 9: Bindung des anti-ABA scFv an ABA-BSA bzw. Oxazolone-BSA im direkten ELISA. Jede Messung wurde in fünf Wiederholungen durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

4.8.2. Nachweis der Bindung des anti-ABA scFv aus Gerste an freie Abscisinsäure und Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D des scFv

Die Bindung des anti-ABA scFv an freies Antigen wurde in einem kompetitiven ELISA untersucht. Der Antikörper wurde mit verschiedenen Konzentrationen von freier (\pm)-cis/trans-ABA vorinkubiert. Anschließend wurde das Gemisch auf eine mit ABA-BSA beschichtete ELISA-Platte gegeben und bis zum Eintreten eines Gleichgewichtszustandes inkubiert. Freie und immobilisierte ABA konkurrieren um eine begrenzte Anzahl von scFv-Bindestellen. Daher ist die Menge der an das Konjugat gebundenen scFv-Moleküle umgekehrt proportional zu der Konzentration an freiem Antigen im Ansatz.

Durch einen Überschuss an freier ABA wurde nahezu die gesamte Bindung des scFv an ABA-BSA unterbunden (Abb. 10). Die Bindung des scFv stellt somit keine unspezifische Interaktion mit der Oberfläche der ELISA-Platte, dem Blockmittel oder anderen Teilen der beschichtenden Agentien dar. Die Affinität eines Antikörpers gegenüber seinem Antigen wird durch dessen Dissoziationskonstante K_D wiedergegeben. Diese Konstante gibt die Neigung des Antikörper-Antigen-Komplexes an, in seine Komponenten zu dissoziieren und ist für einen hochaffinen Antikörper geringer als für einen niedriger affinen. Die Dissoziationskonstante K_D des Antikörpers aus Gerste wurde mit Hilfe des kompetitiven ELISAs bestimmt. Sie ergibt sich aus dem Reziproken der Konzentration an freiem Antigen, bei der 50% der maximalen Antikörperbindung stattfindet. Abbildung 10 zeigt, dass der scFv-Antikörper eine hohe Affinität zu freier ABA aufweist. Die sigmoidale Regressionsfunktion durch die Mittelwerte der gemessenen Absorptionen abzüglich des Hintergrundsignals wird durch die Formel

$$y = \frac{A}{K \left(1 + \frac{x}{L} \right) + C}$$

beschrieben, wobei $A = 275593,25$; $C = 4966,39$; $K = 202583,74$ und $L = 0,115$. Bei maximaler Antikörperbindung an ABA-BSA wurde eine Absorption von 1,32 gemessen (Abb. 10). Somit ergibt sich für den anti-ABA scFv aus Gerste eine Dissoziationskonstante von $2,08 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Sie ist vergleichbar zur Dissoziationskonstante des aus Erbsensamen isolierten anti-ABA Antikörpers ($2,82 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, Radchuk *et al.*, 2010).

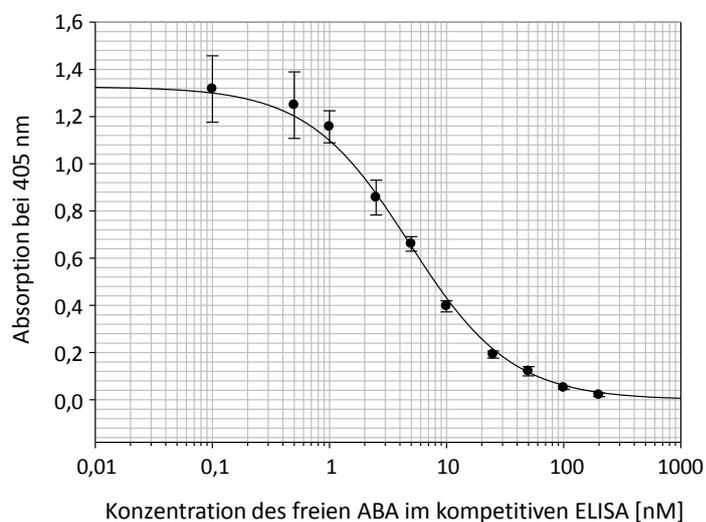


Abb. 10: Kompetitiver ELISA zur Darstellung der Bindung des gereinigten anti-ABA scFv an freie Abscisinsäure. Die an ABA-BSA gebundenen scFv-Proteine wurden mit dem c-myc Antikörper gefolgt von anti-Maus IgG-Alkalische Phosphatase-Konjugat detektiert. Jeder Punkt der Kurve gibt den Mittelwert von fünf Replikaten an. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichungen.

4.9. Der vegetative Phänotyp der ABA-immunmodulierten T1-Gerstenpflanzen

Der vegetative Phänotyp der ABA-immunmodulierten Pflanzen unterscheidet sich nicht von dem des Wildtyps. Die Abbildung 11 zeigt immunmodulierte T1-Pflanzen und den Wildtyp zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten. Die transgenen Pflanzen sind genauso hoch wie Wildtyp-Pflanzen und bilden die gleiche Anzahl von Ähren.

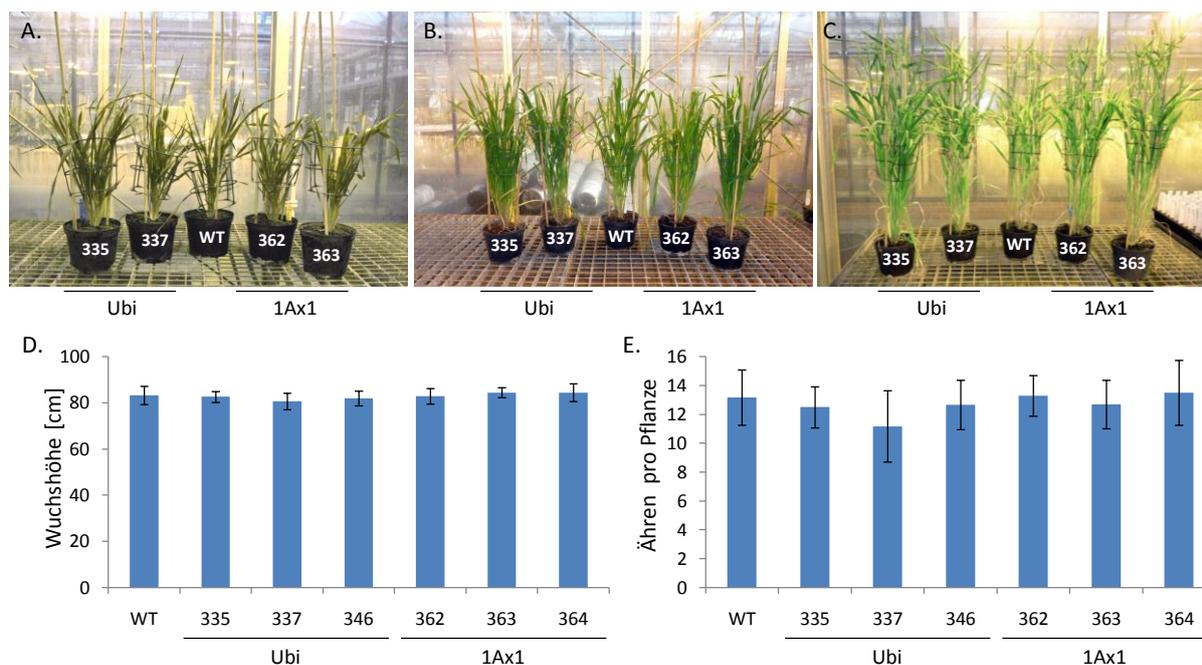


Abb. 11: Phänotypische Gegenüberstellung von im Gewächshaus kultivierten Wildtyp-Pflanzen und ABA-immunmodulierten T1-Pflanzen zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten. A – Pflanzen nach der Bestockung, Beginn des Schossens (Makrostadium 37, Einteilung nach Meier, 2001); B – Pflanzen im Stadium des Ährenschwelens (Makrostadium 43); C – Pflanzen während der Blüte (Makrostadium 65); D - Wuchshöhe der Pflanzen in cm; E – Anzahl der Ähren pro Pflanze. In D und E sind die Mittelwerte von sechs Pflanzen aus der Anzucht „Ernte Februar 2009“ dargestellt. Die Fehlerbalken geben Standardabweichungen an. Ubi bzw. 1Ax1 – Promotor für die Expression des anti-ABA scFv.

4.10. Beeinflussung der ABA-Akkumulation in den Karyopsen durch die Expression des anti-ABA Antikörpers

GC/MS-Messungen der ABA-Konzentrationen in reifen trockenen Gerstenkörnern zeigten eine starke Erhöhung des ABA-Gehaltes in allen untersuchten Linien (Abb. 12). Die Linie 363 zeigt hierbei den stärksten Effekt. Sie enthält mit 6429,2 pmol/g die 38,3-fache ABA-Menge von Wildtyp-Karyopsen (168,0 pmol/g). Eine verstärkte ABA-Akkumulation in Reaktion auf die ABA-Immunmodulierung erfolgte unabhängig vom verwendeten Promotor für die Expression des scFv und weist darauf hin, dass der anti-ABA scFv auch *in vivo* in den Gerstenkaryopsen aktiv ist.

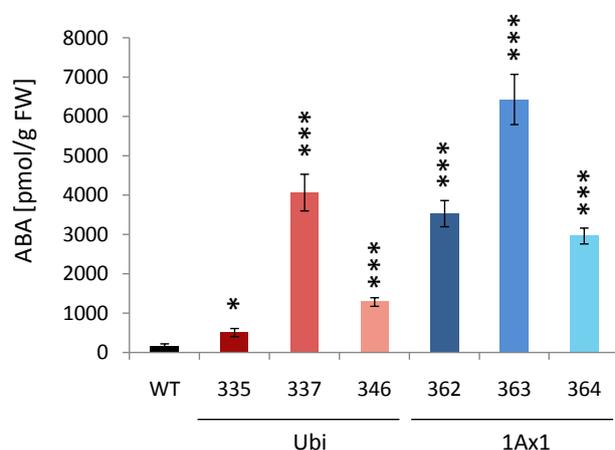


Abb. 12: ABA-Gehalt in reifen Wildtyp- bzw. immunmodulierten T2-Karyopsen. Der ABA-Gehalt wurde mittels GC/MS bestimmt. Das Wildtyp- bzw. T2-Probenmaterial stammt aus der Ernte im Februar 2009. Die Fehlerbalken geben Standardabweichungen an. Zum Bestimmen von Signifikanzen wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt: * $t < 0,05$; ** $t < 0,01$; *** $t < 0,005$. FW – Frischgewicht, Ubi bzw. 1Ax1 – Promotor für die Expression des anti-ABA scFv.

4.11. Bestimmung von freier Abscisinsäure in den Karyopsen der immunmodulierten Gerstenlinien

ABA, die nicht frei sondern im Komplex mit dem anti-ABA scFv vorliegt, ist als Hormon unwirksam (Phillips *et al.*, 1997; Strauss *et al.*, 2001; Conrad und Manteuffel, 2001). Um zu ermitteln, welcher Anteil der gemessenen ABA in freier bzw. gebundener Form vorliegt, wurde die folgende Formel angewandt: $K_D = \frac{[scFv][ABA]}{[scFv\text{-}ABA \text{ Komplex}]}$ (Neri *et al.*, 1996). Der Antikörper-Antigen-Komplex liegt im Gleichgewicht mit dem freien Antikörper und freiem Antigen vor. Die Lage dieses Gleichgewichtes wird durch die Dissoziationskonstante K_D des Antikörpers beschrieben. Neben der Dissoziationskonstante müssen zur Berechnung des freien ABA-Gehaltes die Gesamt-ABA- und Antikörper-Gehalte in den sich entwickelnden Karyopsen bekannt sein. Auf die Ermittlung dieser Größen soll im Folgenden eingegangen werden.

4.11.1. Quantifizierung der anti-ABA scFv-Akkumulation während der Gerstenkaryopsenentwicklung

Die Menge an anti-ABA scFv in sich entwickelnden Samen der immunmodulierten Gerstenpflanzen wurde durch semiquantitative Western Blot-Analysen ermittelt (Abb. 36 bis 41 im Anhang). Pro Gelspur wurden definierte Mengen an gesamtlöslichen Samenproteinen und anti-TNF α -ELP V_HH-Standard appliziert. Die Intensität der Banden wurde unter Verwendung der Software TINA (vgl. 3.6.3.) quantifiziert. Das Expressionsniveau des scFv in den untersuchten Linien ist in Abbildung 13 zusammengefasst.

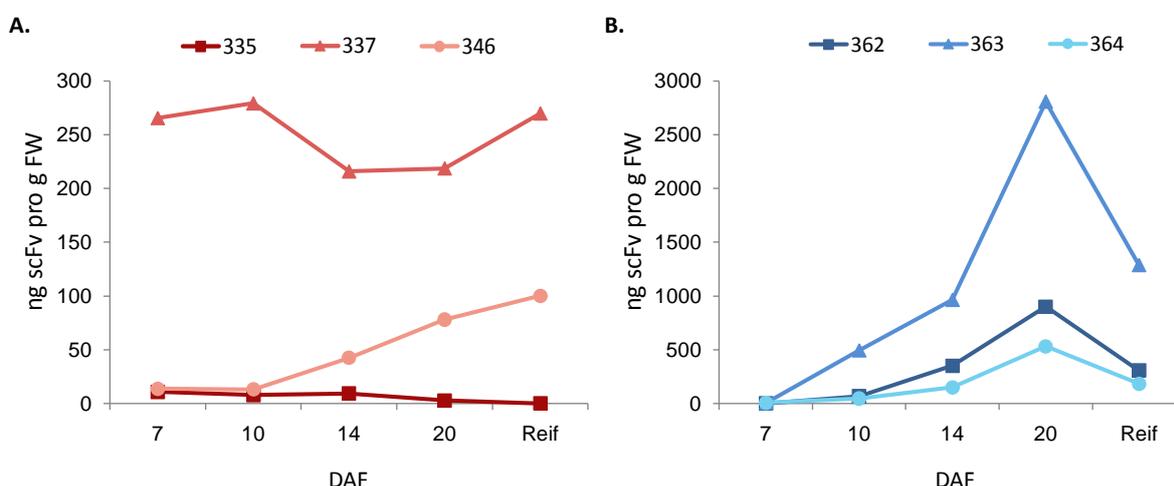


Abb. 13: Anti-ABA scFv-Akkumulation in den sich entwickelnden Karyopsen der ABA-immunmodulierten Gerstenlinien bei scFv-Expression unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors (A) bzw. des 1Ax1-Promotors (B). Das T2-Probenmaterial stammt aus der Ernte Februar 2009.

Die Antikörperakkumulation auf einer pro Frischgewicht-Basis bleibt in den Karyopsen der Ubiquitin-Promotor-Linie 337 über den gesamten untersuchten Entwicklungszeitraum hinweg auf einem ähnlichen Niveau von ungefähr 250 ng/g. In den Karyopsen der weniger stark exprimierenden Linie 346 vergrößert sich der scFv-Gehalt ab dem 10. DAF bis zur Samenreife stetig. Hingegen ist die anti-ABA scFv-Expression in den Nachkommen der Linie 335 instabil. Zwischen dem 7. und 14. DAF

wurde in den Karyopsen ein konstant niedriger Antikörpergehalt von ca. 10 ng/g Frischgewicht nachgewiesen. Dieser nahm nach dem 14. DAF ab. In reifen Samen war keine scFv-Expression mehr nachweisbar.

In allen 1Ax1-Linien beginnt die Expression des anti-ABA scFv circa am 7. DAF (siehe Abb. 36 im Anhang). Bis zum 14. DAF akkumuliert der Antikörper stetig, bevor es zwischen dem 14. und 20. DAF zu einer starken Zunahme des Antikörpergehaltes auf bis zu 2800 ng/g in der Linie 363 kommt. Nach dem 20. DAF bis zur Samenreife verringert sich die Menge an anti-ABA scFv in den Karyopsen wieder. Wie Abbildung 14 illustriert, korreliert die Antikörperakkumulation in reifen Gerstenkaryopsen grob mit deren ABA-Gehalt.

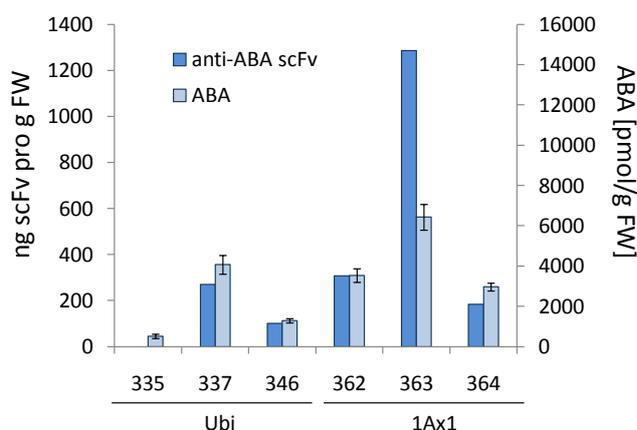


Abb. 14: Gegenüberstellung der Akkumulation von anti-ABA scFv und ABA in reifen T2-Karyopsen der immunmodulierten Linien (Ernte Februar 2009).

4.11.2. ABA-Bestimmung in sich entwickelnden Gerstenkaryopsen

Die ABA-Gehalte in sich entwickelnden Karyopsen der immunmodulierten Linien sowie des Wildtyps wurden gaschromatographisch-massenspektrometrisch bestimmt und miteinander verglichen. Wie Abbildung 15 illustriert, verändert sich der ABA-Gehalt der Wildtyp-Karyopsen zwischen dem 3. und 7. DAF nicht signifikant. Anschließend steigt der Gehalt an Abscisinsäure jedoch rapide an und erreicht am 14. DAF ein Maximum. Nach dem 14. DAF verringert sich die ABA-Konzentration in den Karyopsen bis zur Samenreife.

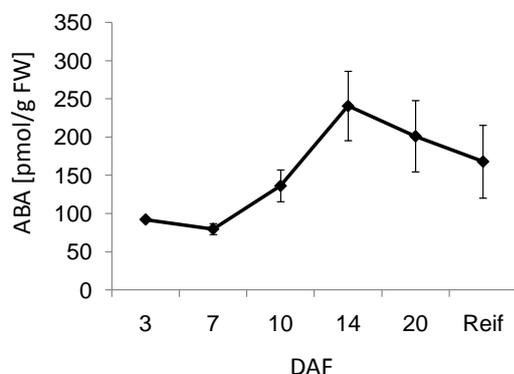


Abb. 15: ABA-Konzentration in sich entwickelnden WT-Karyopsen aus der Ernte im Februar 2009. Die ABA-Menge wurde in fünf biologischen Wiederholungen per GC/MS bestimmt. Die Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichung.

Anders als der Wildtyp akkumulieren die Karyopsen der immunmodulierten Gerstenlinien zunehmende ABA-Mengen während der gesamten Samenentwicklung (Abb. 16). Der höchste ABA-Gehalt wurde zum Zeitpunkt der Samenreife gemessen. In den Karyopsen der 1Ax1-Linien, die den anti-ABA scFv erst mit Beginn der Speicherphase der Samenentwicklung exprimieren, übersteigt der

ABA-Gehalt den der Wildtyp-Karyopsen ab dem 10. DAF signifikant. Obwohl der Ubiquitin-Promotor schon zu Beginn der Samenentwicklung aktiv ist, gilt das Gleiche für die Linien 335 und 346. Allein die sich entwickelnden Karyopsen der Linie 337 weisen bereits am 3. DAF einen im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöhten ABA-Gehalt auf. Tendenziell zeigen die endospermspezifisch anti-ABA scFv exprimierenden Linien einen stärker erhöhten ABA-Gehalt als die Ubiquitin-Promotor-Linien. Eine Ausnahme bildet auch hier die Linie 337, die bis zum 14. DAF die stärkste ABA-Akkumulation aller Linien aufweist und deren ABA-Gehalt in reifen Karyopsen nur von der Linie 363 übertroffen wird (Abb. 16).

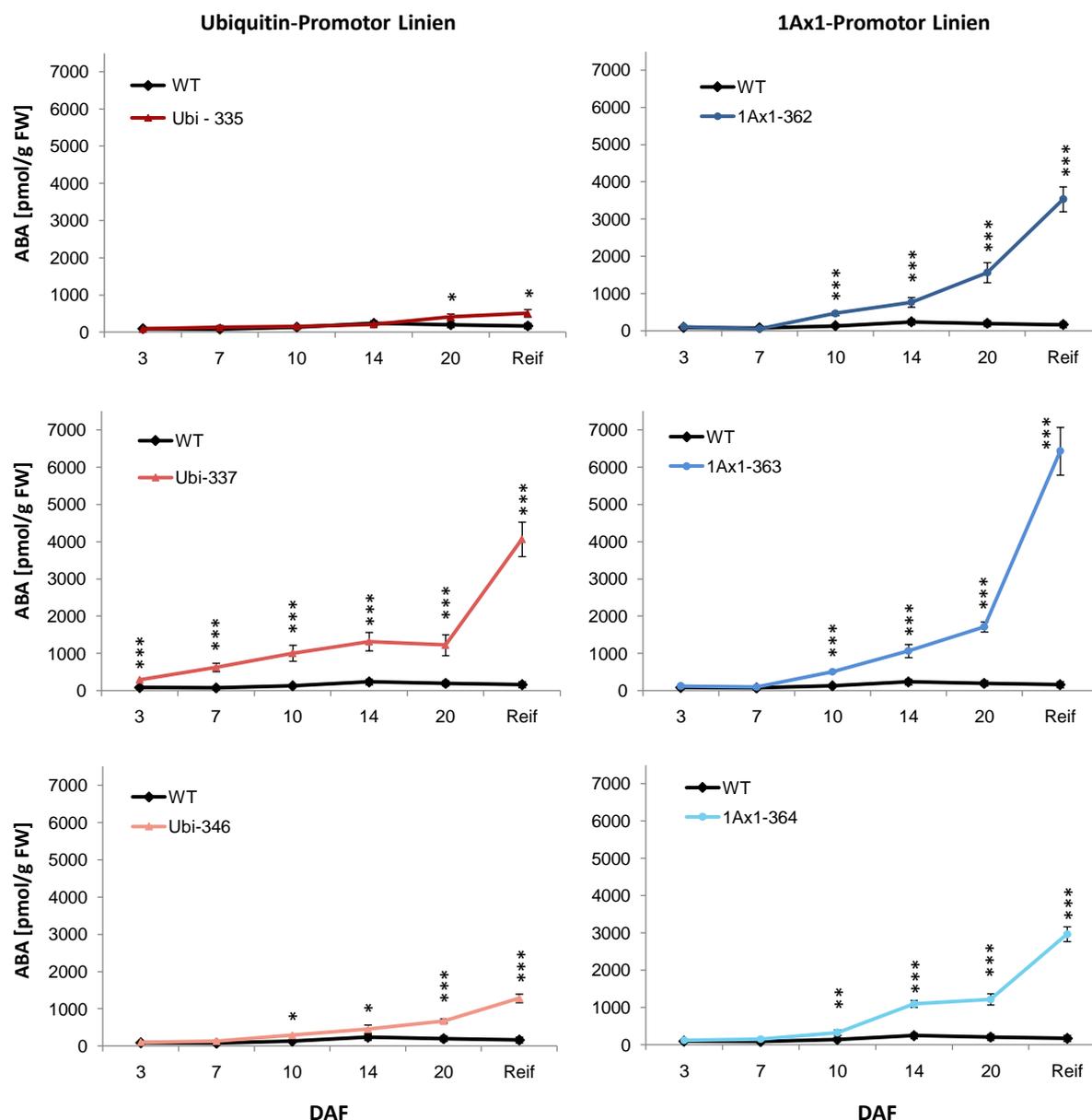


Abb. 16: ABA-Gehalte von sich entwickelnden Wildtyp- und immunmodulierten T2-Karyopsen aus der Ernte Februar 2009. Die ABA-Bestimmung erfolgte gaschromatographisch-massenspektrometrisch in je fünf biologischen Wiederholungen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert an. Zur statistischen Bewertung der Daten wurde eine einfaktorielles ANOVA durchgeführt: * $t < 0,05$; ** $t < 0,01$; *** $t < 0,005$. Ubi bzw. 1Ax1 – Promotor für die Expression des anti-ABA scFv.

4.11.3. Berechnung von freier Abscisinsäure in den immunmodulierten Karyopsen

Aus den ABA- und Antikörper-Gehalten der immunmodulierten Karyopsen sowie der Dissoziationskonstante des anti-ABA scFv wurde für jeder der sechs immunmodulierten Linien die theoretisch frei in den Karyopsen vorliegende ABA berechnet. Laut dieser Kalkulation liegt nahezu die gesamte ABA in ungebundener Form vor (Abb. 17). Dieses Ergebnis ist darauf zurückzuführen, dass die Molarität von ABA in den Karyopsen durchschnittlich nahezu 300 mal höher ist als die des Antikörpers, während die Bindung von Antikörper und ABA in einem äquimolaren Verhältnis stattfindet. Durchschnittlich liegen somit 99,4% des Antikörpers im Komplex vor. Dies ist nur für höchstens 5,6% der Abscisinsäure am 20. DAF in der Linie 363 der Fall.

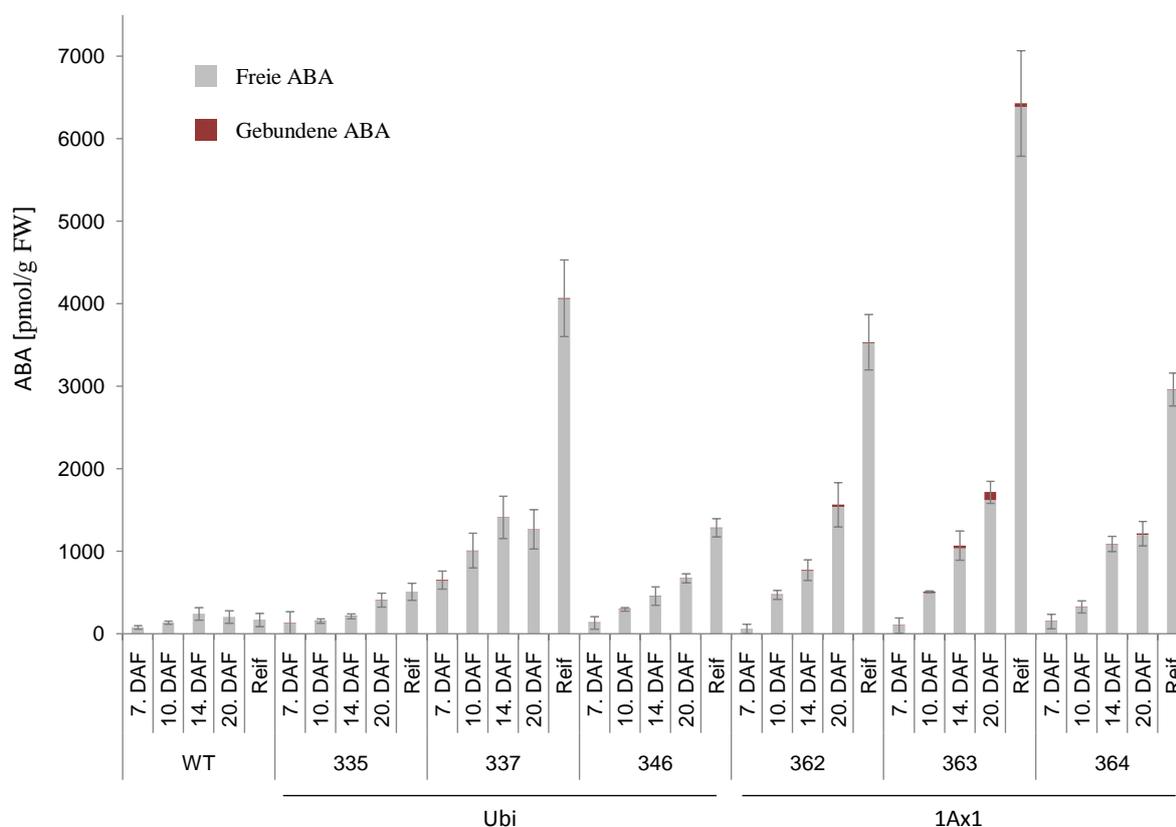


Abb. 17: Gehalte freier bzw. im Komplex mit dem anti-ABA scFv vorliegender Abscisinsäure in sich entwickelnden Karyopsen der immunmodulierten Gerstenlinien und des Wildtyps. Die Menge der an den Antikörper gebundenen ABA wurde nach der Methode von Neri *et al.* (1996) berechnet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert an. Ubi bzw. 1Ax1 – Promotor für die Expression des anti-ABA scFv.

4.12. Phänotyp der ABA-immunmodulierten Karyopsen

Bis zum Beginn der Speicherphase der Samenentwicklung zeigen die ABA-immunmodulierten Karyopsen keinen makroskopisch vom Wildtyp abweichenden Phänotyp. Ungefähr ab dem 10. DAF wird jedoch in einigen der transgenen Karyopsen ein unterschiedlich stark ausgeprägter Knick-Phänotyp sichtbar. Hierbei erscheint das Korn auf seiner dorsalen Seite ungefähr in der Mitte eingedrückt (Abb. 18 D und E). Hand- und Cryoschnitte durch die betroffene Region zeigten, dass dieser Knick auf ein lokales Fehlen endospermaler Zellen zurückzuführen ist (Abb. 18 F und 19 B).

Betroffene Karyopsen wurden in allen immunmodulierten Linien gefunden, nicht aber im Wildtyp (Abb. 20). Daher kann dieser Phänotyp als Folge der Transgenexpression angesehen werden.

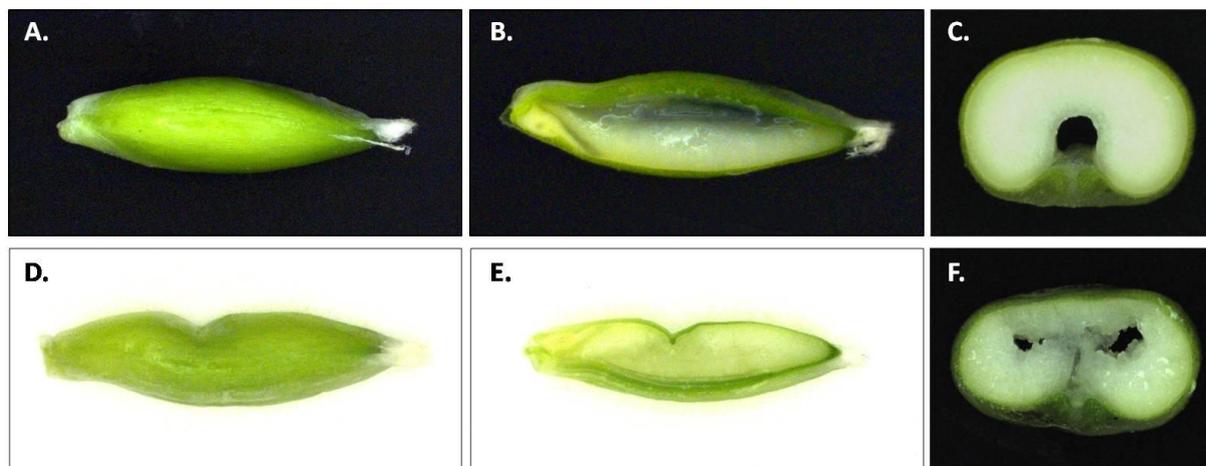


Abb. 18: Handschnitte zur Darstellung des Knick-Phänotyps in Karyopsen der ubiquitär ABA-immunmodulierten Linie 337 (D, E, F) im Vergleich zu Wildtyp-Karyopsen (A, B, C). Sich entwickelnde Gerstenkaryopsen aus der Anzucht „Ernte Februar 2009“ vom wurden am 14. DAF manuell mit einer Rasierklinge geschnitten. A und B: laterale Ansicht; B und E: Längsschnitt durch die Gerstenkaryopsen; C und F: Querschnitt durch die „Knick-Region“ der Karyopse.

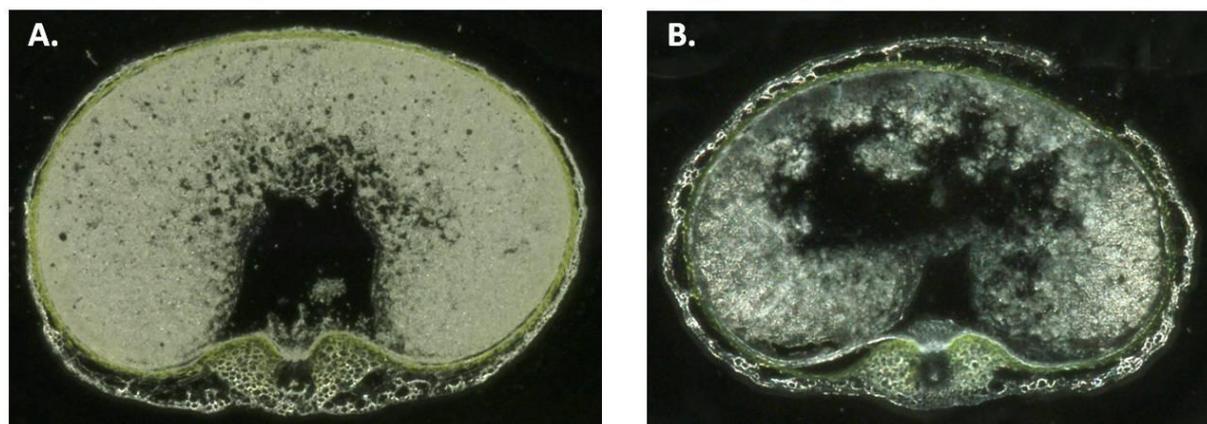


Abb. 19: Darstellung des Knick-Phänotyps in Cryoquerschnitten durch sich entwickelnde Karyopsen vom 14. DAF. A: Schnitt durch den zentralen Bereich einer Wildtyp-Karyopse; B: Schnitt durch die Knickregion einer Karyopse der Linie 337. Die 25 µm dicken Cryoschnitte (Cryostat OTF, Bright Instruments, Cambridgeshire, England) wurden von gefrorenen Gerstenkaryopsen aus der Anzucht „Ernte Februar 2009“ angefertigt.

Die Penetranz dieses Phänotyps unterscheidet sich stark zwischen den einzelnen Linien. Während in der ubiquitär immunmodulierten Linie 337 (heterozygot) 39,5% aller Karyopsen den Knick-Phänotyp zeigen, ist dies in allen anderen Linien nur für weniger als 10% der Karyopsen der Fall (Abb. 20). In den Linien mit endospermspezifischer Expression korreliert die Penetranz des Knick-Phänotyps grob mit der scFv-Konzentration. Diese ist während des gesamten untersuchten Entwicklungszeitraumes in der 1Ax1-Linie 363 am höchsten, während die Linie 364 die geringste scFv-Expression unter Kontrolle des 1Ax1-Promotors zeigt.

Für die Existenz des Knick-Phänotyps in einem Teil der immunmodulierten Karyopsen kann es grundsätzlich mehrere Gründe geben, wie z.B. eine fehlende Zellularisierung, ein Zerreißen des Gewebes durch innere Wachstumsspannungen oder ein Einsetzen von Abbauprozessen bereits

während der Kornentwicklung. Welches dieser Szenarien für die immunmodulierten Gerstenkaryopsen zutreffend ist, kann auf der Basis der vorliegenden Daten nicht beantwortet werden. Auch die geringe Penetranz des Knick-Phänotyps lässt sich basierend auf der gegenwärtigen Datenlage nicht zufriedenstellend erklären. Möglicherweise gibt es in den Karyopsen geringe individuelle Schwankungen in Bezug auf den Beginn der scFv-Expression (in 1Ax1-Promotor-Linien), den ABA-Gehalt oder das gestörte Verhältnis der ABA-Konzentration zu den Konzentrationen anderer Hormone.

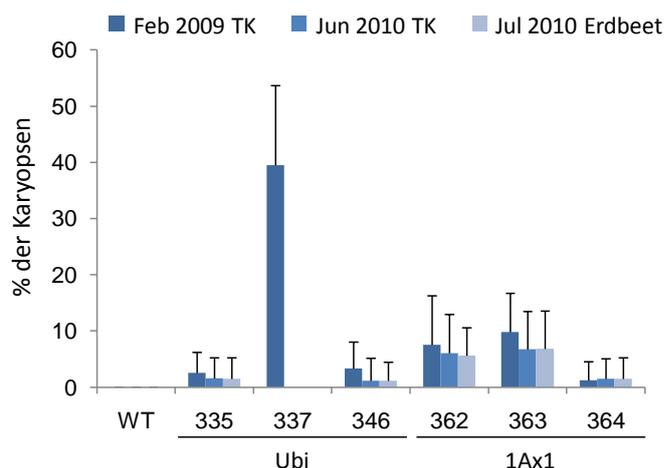


Abb. 20: Penetranz des Knick-Phänotyps bei reifen ABA-immunmodulierten Karyopsen aus verschiedenen Ernten. Für die Linie 337 liegen nur Daten aus dem Jahr 2009 vor. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert an. Die Monatsangaben bezeichnen den Zeitpunkt der Ernte. TK – Topfkultur, Ubi bzw. 1Ax1 – Promotor für die Expression des anti-ABA scFv.

4.13. Keimung der ABA-immunmodulierten Karyopsen

ABA unterdrückt die Samenkeimung als Antagonist von Gibberellinsäure. Daher wurde überprüft, wie sich der stark erhöhte ABA-Gehalt in den immunmodulierten Karyopsen auf deren Keimungsverhalten auswirkt. Insgesamt 200 Samen pro Linie wurden einem Standard-Keimfähigkeitstest unterzogen (ISTA, 2008). Die Keimung erfolgte unter kontrollierten Bedingungen zwischen feuchtem Filterpapier in einem Lichtschrank. Samen, die bis zum 12. Tag nach dem Auslegen nicht gekeimt waren, wurden als dormant definiert. Ihr Anteil unterschied sich zwischen dem Wildtyp und den immunmodulierten Linien nicht (Abb. 21A). Während jedoch beim Wildtyp nach zwei Tagen bereits 13% aller Samen gekeimt waren, war dieser Anteil in allen immunmodulierten Linien geringer (Abb. 21B). Die Karyopsen der transgenen Linien zeigen somit eine im Vergleich zum Wildtyp verzögerte Keimung bei vergleichbarer Vitalität.

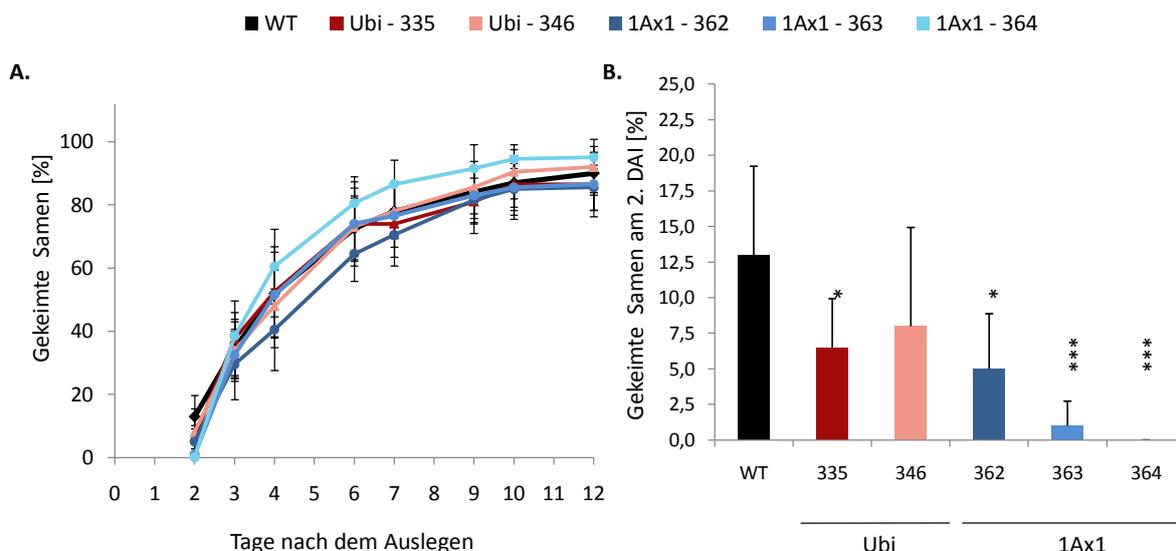


Abb. 21: Keimfähigkeiten von ABA-immunmodulierten und Wildtyp-Karyopsen. A: Keimungsrate an verschiedenen Tagen nach dem Auslegen der Karyopsen. B: Anteil der bereits nach zwei Tagen gekeimten Gerstenkörner in %. Der Keimfähigkeitstest (ISTA, 2008) wurde mit acht Wiederholungen zu je 25 Karyopsen durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert an. Zur statistischen Bewertung der Daten wurde eine einfaktorische ANOVA durchgeführt: * $t < 0,05$; ** $t < 0,01$; *** $t < 0,005$. Ubi bzw. 1Ax1 – Promotor für die Expression des anti-ABA scFv, DAI – Tage nach dem Auslegen (*days after imbibition*).

4.14. Tausendkorngewicht und Speicherstoffe der reifen ABA-immunmodulierten Karyopsen

4.14.1. Das Tausendkorngewicht

Das Tausendkorngewicht von reifen Wildtyp- und immunmodulierten T2-Karyopsen wurde bei zwei unabhängig voneinander angezogenen Pflanzengruppen bestimmt. Beim Samenmaterial aus der Ernte Februar 2009 unterscheidet sich das Tausendkorngewicht der Ubiquitin-Promotor-Linien nicht von dem des Wildtyps, während es in allen 1Ax1-Promotor-Linien signifikant erhöht ist. Dieses Material stammt von Pflanzen, die im Gewächshaus in Töpfen angezogen wurden. Ertragsrelevante Parameter von transgenen Gerstenlinien schwanken bei der Topfkultur im Gewächshaus jedoch stark und sind deshalb wenig aussagekräftig (I. Saalbach, persönliche Mitteilung). Ein Grund hierfür könnten die bei der Kultivierung in Töpfen nicht optimalen Ernährungsbedingungen der Gerstenpflanzen sein, da deren Wurzelwachstum im Vergleich zur Kultur im Freiland stark eingeschränkt ist. Auf welchem kleinen Bruchteil des unter natürlichen Bedingungen zur Verfügung stehenden Wurzelraumes sich Topfpflanzen beschränken müssen, verdeutlicht eine Arbeit von Borg und Grimes (1986), die bei Gerste von maximalen Wurzeltiefen zwischen 150 bis 290 cm unter günstigen Umweltbedingungen berichten. Die Bodentiefe, die vom voll ausgebildeten Wurzelsystem am dichtesten durchdrungen wird, liegt für die meisten tiefen Böden zwischen 73 bis 96 cm (Dwyer *et al.*, 1988). Um feldähnliche Bedingungen zu gewährleisten, wurden T1- und Wildtyp-Pflanzen in der Vegetationsperiode 2009/2010 im Erdbeet in gewachsenem Boden unter Glas und ohne zusätzliche Beleuchtung oder Temperaturregulierung angebaut. Unter diesen Bedingungen unterscheidet sich das Tausendkorngewicht aller immunmodulierten Linien nicht von dem des Wildtyps (Abb. 22).

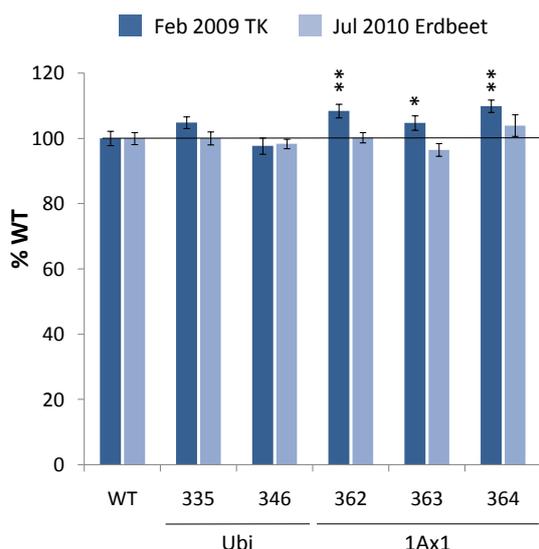


Abb. 22: Tausendkorngewicht der reifen Karyopsen bei zwei unabhängig voneinander angezogenen Pflanzengruppen. Die für die Wildtyp-Karyopsen ermittelten Werte wurden für jede Aussaat als 100 % definiert. Alle anderen Angaben wurden darauf bezogen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert an. Die Monatsangaben bezeichnen den Zeitpunkt der Ernte. Zur statistischen Bewertung der Daten wurde eine einfaktorische ANOVA durchgeführt: * $t < 0,05$; ** $t < 0,01$; *** $t < 0,005$. TK – Topfkultur, Ubi bzw. 1Ax1 – Promotor für die Expression des anti-ABA scFv.

4.14.2. Der Stärke- und Gesamtkohlenstoffgehalt

Mit einem Anteil von mehr als 65% des Trockengewichtes von reifen Karyopsen ist Stärke der wichtigste Speicherstoff von Gerstensamen (Czuchajowska *et al.*, 1998). Um zu untersuchen, ob die Expression des anti-ABA scFv zu einer veränderten Stärkeakkumulation in den Samen führt, wurde der Stärkegehalt von reifen immunmodulierten Karyopsen mit dem der Wildtyp-Karyopsen verglichen. Bei drei unabhängig voneinander angezogenen Pflanzengruppen wurde jedoch kein Unterschied in der Stärkeakkumulation pro Einwaage zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp festgestellt (Abb. 23). Ebenso unverändert ist der Gesamtkohlenstoffgehalt der immunmodulierten Karyopsen im Vergleich zum Wildtyp.

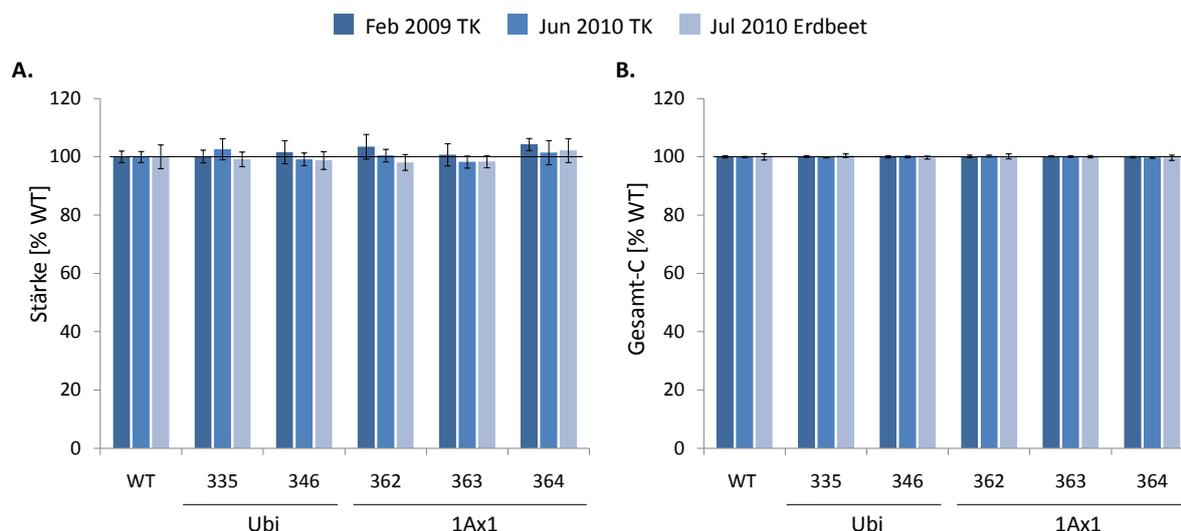


Abb. 23: Stärke- (A.) und Gesamtkohlenstoffgehalt (B.) pro Einwaage in reifen Karyopsen bei drei unabhängig voneinander angezogenen Pflanzengruppen. Die für die Wildtyp-Karyopsen ermittelten Werte wurden für jede Aussaat als 100 % definiert. Alle anderen Angaben wurden darauf bezogen. Die Monatsangaben bezeichnen den Zeitpunkt der Ernte. Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert an. TK – Topfkultur, Ubi bzw. 1Ax1 – Promotor für die Expression des anti-ABA scFv.

4.14.3. Der Protein- und Gesamtstickstoffgehalt

Die Speicherproteine der Gerste repräsentieren eine komplexe Mischung verschiedener Komponenten. Sie werden, basierend auf ihrer Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln, nach dem Osborne'schen Fraktionierungsschema eingeteilt (Osborne, 1924). Die Hauptspeicherproteine der Getreide gehören zu den in verdünntem Alkohol löslichen Prolaminen und werden bei der Gerste als Hordeine bezeichnet. Sie werden ausschließlich im Stärke-Endosperm synthetisiert. Die in verdünnten Salzlösungen löslichen Globuline werden hauptsächlich in der Aleuronschicht und im Embryo gefunden, während sie im Endosperm nur in geringen Mengen vorkommen. Albumine hingegen lösen sich in Wasser (Überblick in Shewry und Halford, 2002).

Der Speicherproteingehalt in den reifen Karyopsen wurde bei drei unabhängig voneinander angezogenen Pflanzengruppen bestimmt. In den T2-Karyopsen aller immunmodulierten Linien unterschied sich die Menge der pro Einwaage gespeicherten Albumine/Globuline und Prolamine nicht vom Wildtyp. Übereinstimmend mit diesen Analysen, ist auch der Gesamtstickstoffgehalt im Vergleich zum Wildtyp unverändert (Abb. 24).

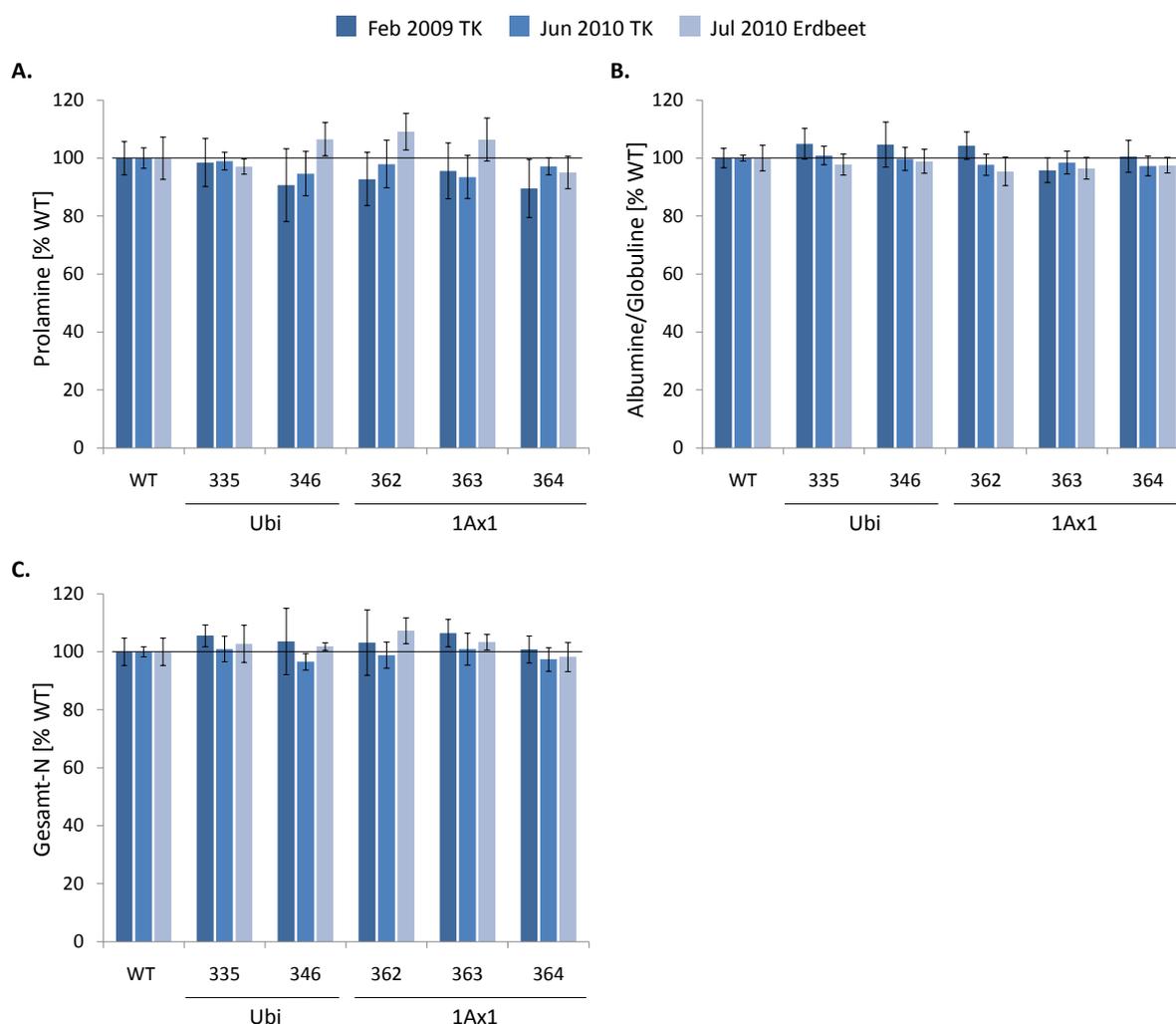


Abb. 24: Prolamine (A), Albumine/Globuline (B) und Gesamtstickstoffgehalt (C) pro Einwaage in reifen immunmodulierten T2-Karyopsen im Vergleich zum Wildtyp bei drei unabhängig voneinander angezogenen Pflanzengruppen. Die für die Wildtyp-Karyopsen ermittelten Werte wurden für jede Aussaat als 100 % definiert. Alle anderen Angaben wurden darauf bezogen. Die Monatsangaben bezeichnen den Zeitpunkt der Ernte. Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert an. TK – Topfkultur, Ubi bzw. 1Ax1 – Promotor für die Expression des anti-ABA scFv.

4.15. Metabolitgehalte sich entwickelnder ABA-immunmodulierter Karyopsen

Im Folgenden wird auf den Einfluss der ABA-Immunmodulierung auf den Metabolitgehalt der sich entwickelnden Karyopsen eingegangen.

Am IPK Gatersleben wurden zunächst die Aminosäure- und Zuckergehalte von Gesamtkaryopsen bestimmt. Eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe „Angewandte Metabolom-Analyse“ am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie Potsdam ermöglichte zusätzlich eine umfangreiche Metabolitanalyse mittels GC/MS. Diese schloss neben den bereits bestimmten Aminosäuren und Zuckern ein breites Spektrum weiterer Metabolite ein und gibt Aufschluss über die Metabolitgehalte in verschiedenen Gewebefractionen der sich entwickelnden Karyopsen.

4.15.1. Veränderte Aminosäuregehalte in den ABA-immunmodulierten Karyopsen am 14. DAF

Der Gehalt an freien Aminosäuren in sich entwickelnden Karyopsen wurde mittels UPLC in jeweils vier unabhängigen biologischen Wiederholungen bestimmt. Als Probenmaterial dienten transgene T2- und Wildtyp-Karyopsen aus der Ernte Februar 2009. Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Aminosäuregehalte verdeutlicht, dass die größten Unterschiede zwischen den immunmodulierten Linien und dem Wildtyp am 14. DAF auftreten. Am 7., 10. und 20. DAF hingegen zeigt die PCA keine Differenzen zwischen Wildtyp und immunmodulierten Linien (Abb. 25).

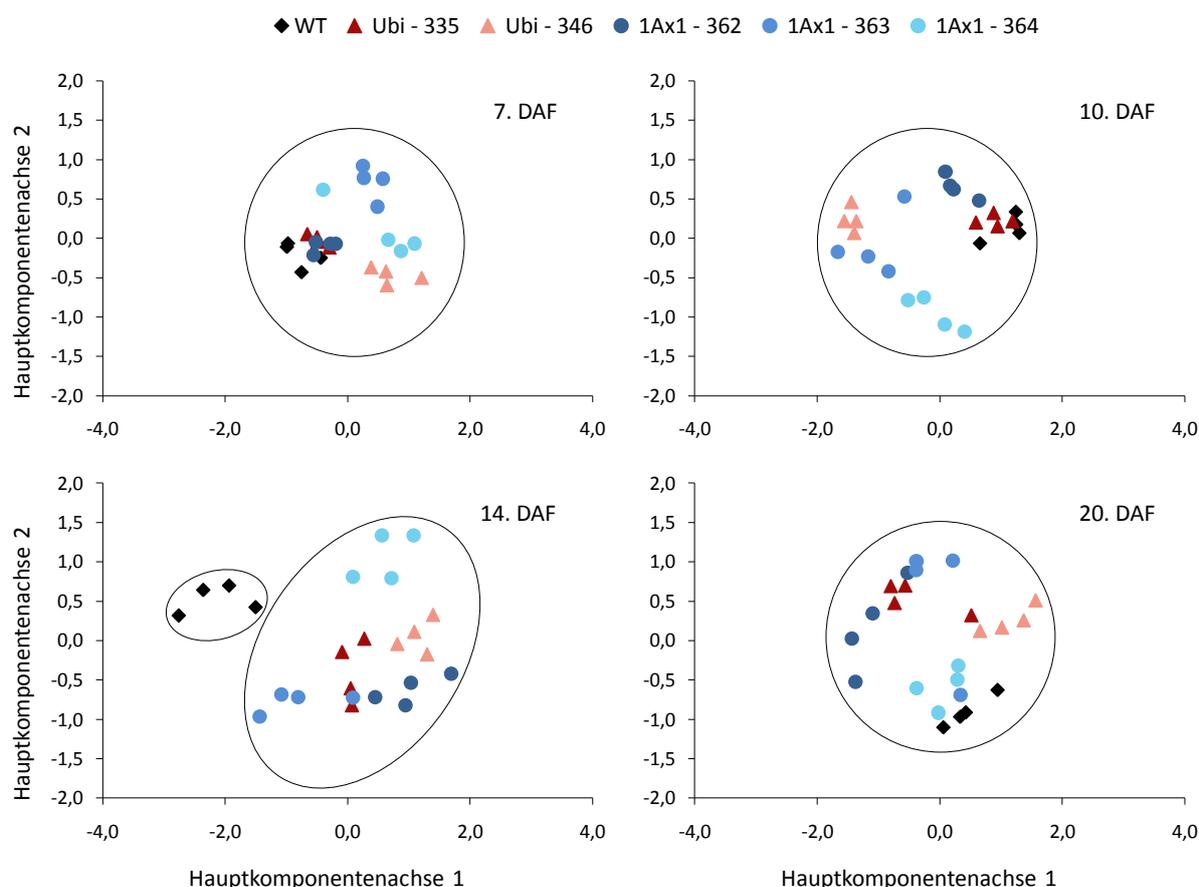


Abb. 25: Hauptkomponentenanalyse der Aminosäuregehalte sich entwickelnder Gesamtkaryopsen von den ABA-immunmodulierten Linien und dem Wildtyp. Die Gehalte an freien Aminosäuren wurden mittels UPLC in je vier biologischen Wiederholungen bestimmt. Die Proben stammen aus der Ernte im Februar 2009. Ubi bzw. 1Ax1 – Promotor für die Expression des anti-ABA scFv.

Betrachtet man die Gehalte der einzelnen Aminosäuren am 14. DAF, so fällt auf, dass in den immunmodulierten Karyopsen aller transgenen Linien viele Aminosäuren in geringerer Konzentration vorliegen als im Wildtyp. Dies gilt, mit Ausnahme von Alanin, für alle Aminosäuren, die aus Oxalacetat und Pyruvat synthetisiert werden, sowie für die aromatischen Aminosäuren (Abb. 26). Unverändert ist hingegen die Konzentration von Alanin, Arginin, Glutamat, Glutamin, Glycin, Prolin und Serin (nicht abgebildet). Im Gegensatz zu vielen proteinogenen Aminosäuren ist die Konzentration von γ -Aminobuttersäure (GABA) in den Karyopsen der immunmodulierten Linien am 14. DAF stark erhöht.

4.15.2. Die Zuckergehalte und –verhältnisse in den sich entwickelnden Karyopsen

Für die sich entwickelnde Karyopse sind Zucker als Kohlenstoff- und Energiequelle für die Biosynthese von Speicherstoffen von großer Bedeutung. Zusätzlich kommt vielen löslichen Zuckern und deren Derivaten eine Rolle als Signalmolekül zu (Rolland *et al.*, 2006; Ramon *et al.*, 2009). Ein wichtiger Indikator für den Entwicklungszustand von Samen ist das Saccharose/Hexose-Verhältnis (Weber *et al.*, 1997; Weschke *et al.*, 2000; Borisjuk *et al.*, 2004).

Da die Signalwege von Zuckern und ABA eng miteinander verknüpft sind (Finkelstein und Gibson, 2002; Rook *et al.*, 2006), wurde die Dynamik der freien Zucker in den sich entwickelnden immunmodulierten Gerstensamen analysiert. Hierzu wurden die Gehalte von Saccharose und den in den Karyopsen am stärksten vertretenen Hexosen, Glukose und Fruktose, bestimmt. Die Summe von Glukose- und Fruktosegehalt wird fortan als der Hexosegehalt der Karyopsen bezeichnet.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zuckerbestimmungen zeigen, dass sich die absoluten Gehalte an Saccharose und Hexosen in den Karyopsen während der Speicherphase der Samenentwicklung stetig verringern (nicht abgebildet). Gleichzeitig steigt das Verhältnis von Saccharose zu Hexosen an, wie Abbildung 27 für drei unabhängig voneinander angezogene Pflanzengruppen illustriert. Während sich das Saccharose/Hexose-Verhältnis zwischen dem 7. und 10. DAF noch kaum verändert, steigt es zwischen dem 10. und 20. DAF stark an. Dabei zeigen alle immunmodulierten Linien am 14. DAF ein signifikant und gut reproduzierbar höheres Saccharose/Hexose-Verhältnis als die Wildtyp-Karyopsen. Dieser Unterschied entsteht durch einen am 14. DAF signifikant reduzierten Hexosegehalt der sich entwickelnden Karyopsen bei weitgehend unverändertem Saccharosegehalt (Abb. 28).

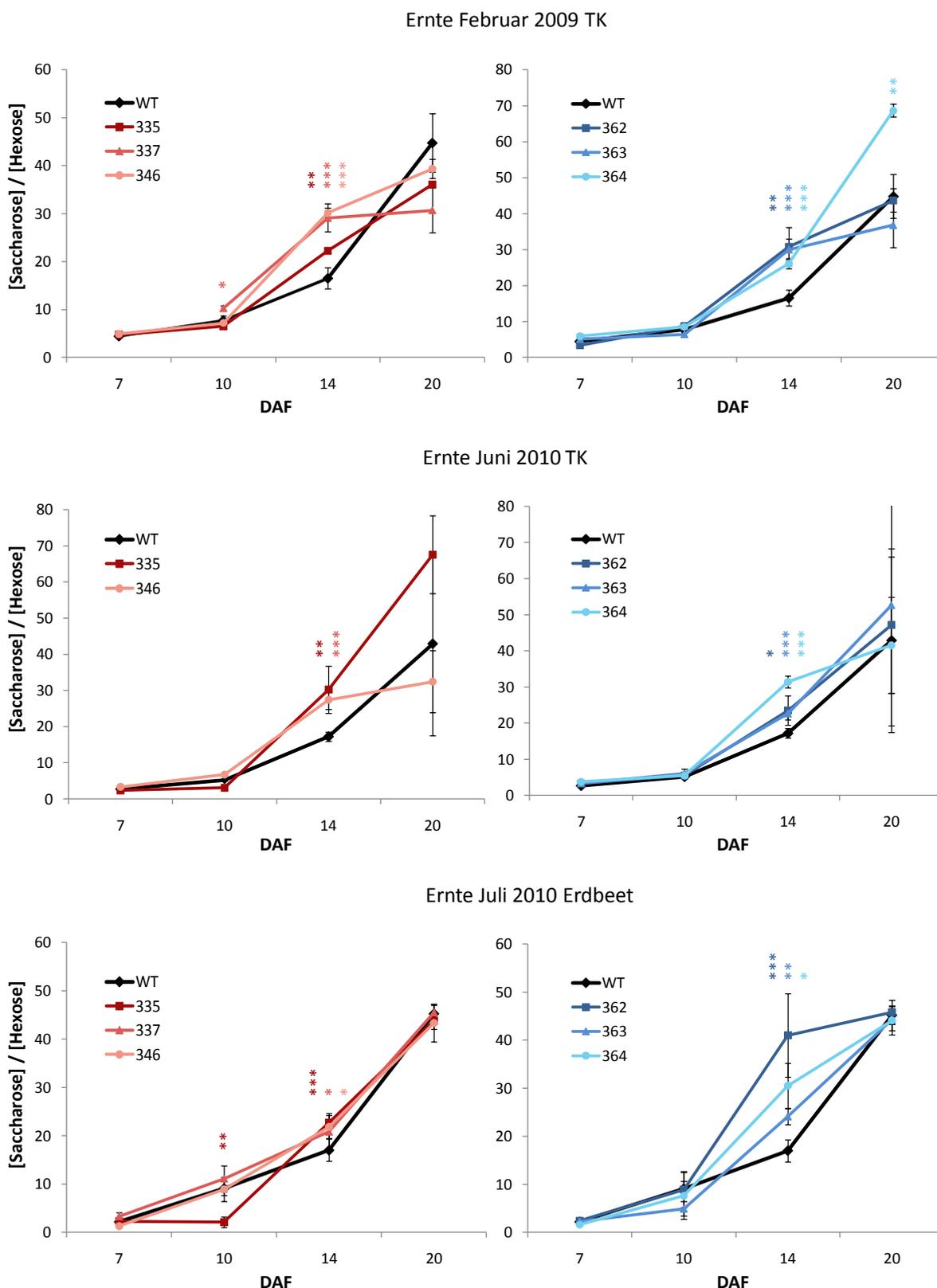


Abb 27: Saccharose/Hexose-Verhältnis in den sich entwickelnden Karyopsen der immunmodulierten Linien sowie des Wildtyps. Die Zuckergehalte wurden auf enzymatischem Wege bestimmt (vgl. 3.8.5.). Die Monatsangaben bezeichnen den Zeitpunkt der Ernte. 335, 337, 346 – Linien mit Ubiquitinpromotor-vermittelte Expression, 362, 363, 364 – Linien mit 1Ax1-Promotor. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert an. Zur statistischen Bewertung der Daten wurde eine einfaktorische ANOVA durchgeführt: * $t < 0,05$; ** $t < 0,01$; *** $t < 0,005$. Die Signifikanzkennzeichnung ist jeweils in der Farbe des zugehörigen Graphen dargestellt. TK – Topfkultur.

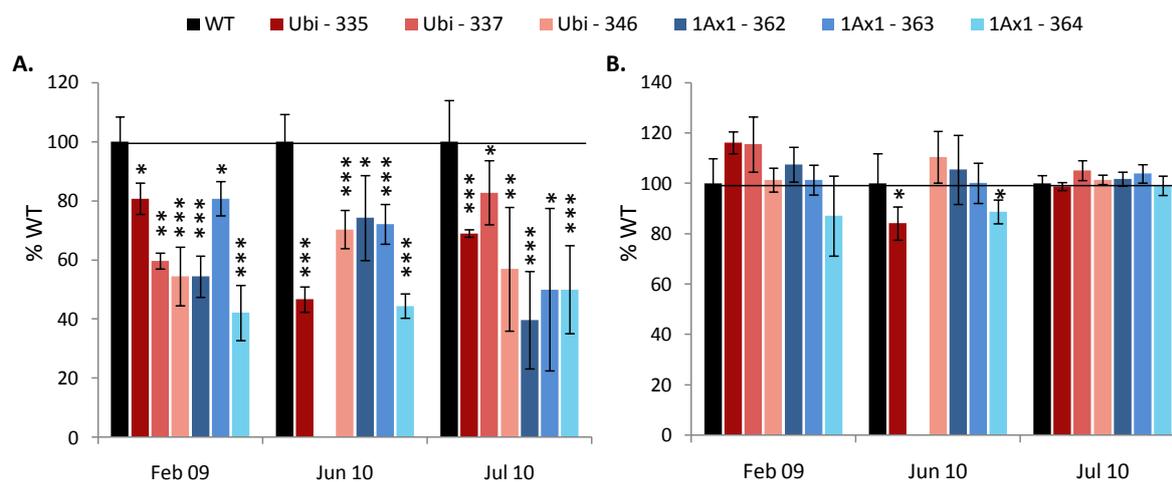


Abb. 28: Hexosegehalt (A.) bzw. Saccharosegehalt (B.) von Gesamtkaryopsen am 14. DAF bei drei unabhängig voneinander angezogenen Pflanzengruppen. Die Zuckergehalte wurden auf enzymatischem Wege bestimmt (vgl. 3.8.5.). Die für die Wildtyp-Karyopsen ermittelten Werte wurden für jede Aussaat als 100 % definiert. Alle anderen Angaben wurden darauf bezogen. Die Monatsangaben bezeichnen den Zeitpunkt der Ernte. Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert an. Zur statistischen Bewertung der Daten wurde eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt: * $t < 0,05$; ** $t < 0,01$; *** $t < 0,005$. Ubi bzw. 1Ax1 – Promotor für die Expression des anti-ABA scFv.

4.15.3. Bestimmung von Metabolitgehalten in der maternalen und filialen Gewebefraktion sich entwickelnder Karyopsen

Um zu untersuchen, wie sich die ABA-Immunmodulierung auf den Metabolithaushalt der sich entwickelnden Karyopsen auswirkt, wurden Metabolitgehalte gaschromatographisch-massenspektrometrisch bestimmt. Zur besseren Interpretierbarkeit der Daten wurde hierfür eine 1Ax1-Linie ausgewählt, da in den Karyopsen von ubiquitär immunmodulierten Pflanzen Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp auf maternale Effekte zurückzuführen sein könnten. Die Linie 363 zeigt von allen untersuchten Linien die höchste Antikörpermenge ab dem 10. DAF (siehe Abb. 13). Als Reaktion wurde in den Karyopsen dieser Linie auch die stärkste ABA-Akkumulation von allen Linien festgestellt (Abb. 16). Daher wurde die Linie 363 die Metabolitbestimmungen an Karyopsen dieser Linie durchgeführt.

Die Metabolit-Analyse wurde an sich entwickelnden T2-Karyopsen aus der Ernte Februar 2009 durchgeführt. Karyopsen vom 7., 10. und 14. Tag nach der Blüte wurden per Hand in die filiale und maternale Gewebefraktion getrennt. Da am 20. DAF das maternale Perikarp nahezu vollständig degeneriert ist, war in diesem Entwicklungsstadium eine Trennung der Gewebe nicht mehr möglich. Proben vom 20. DAF stammen daher von der Gesamtkaryopse. Jede der Metabolitbestimmungen wurde in sechs unabhängigen Wiederholungen durchgeführt.

Um die Stadien mit den größten Unterschieden in der Metabolitzusammensetzung zwischen den Karyopsen der Linie 363 und denen des Wildtyps zu identifizieren, wurde eine ICA (*Independent Component Analysis*) basierend auf den median-zentrierten und \log_{10} -transformierten Messwerten durchgeführt. In der Linie 363 treten vom Wildtyp abweichende Metabolitgehalte hauptsächlich am 10. DAF in den maternalen Geweben und am 10. und 14. DAF in den filialen Geweben auf (Abb. 29).

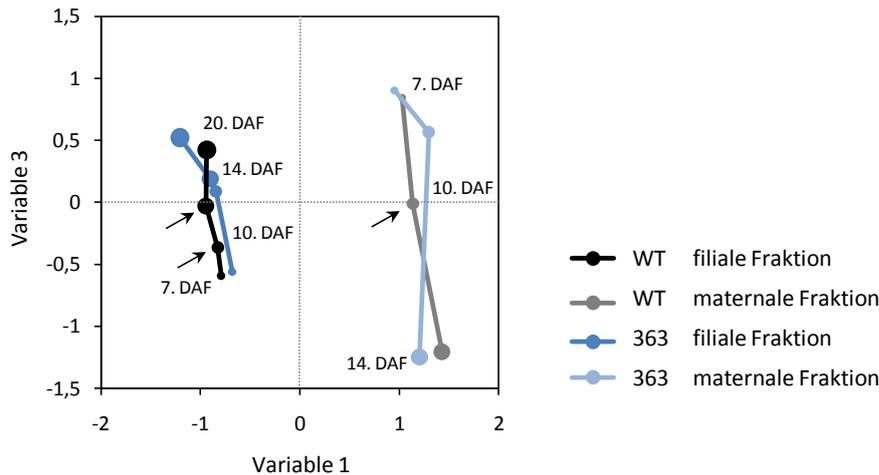


Abb. 29: ICA basierend auf median-zentrierten und \log_{10} -transformierten Metabolitdaten. Die Metabolite in der maternalen und filialen Gewebefraktion sich entwickelnder Karyopsen wurde per GC/MS in je sechs biologischen Wiederholungen bestimmt. Pfeile deuten auf die Zeitpunkte mit den größten Unterschieden zwischen Wildtyp und transgener Linie hin. Die Größe der Kreise zeigt die Entwicklungszeitpunkte an: kleinster Kreis – 7. DAF, größter Kreis – 20. DAF.

Eine Zusammenfassung von im Vergleich zum Wildtyp veränderten Metabolitkonzentrationen gibt Abbildung 30. Aus ihr geht hervor, dass der Gehalt an Metaboliten aus Glykolyse und Zitronensäurezyklus sich zwischen Karyopsen des Wildtyps und der immunmodulierten Linie 363 nicht unterscheidet. Die Analyse der Metabolitgehalte in getrennten Gewebefractionen zeigt, dass die in Gesamtkaryopsen gemessene Erniedrigung des Aminosäuregehaltes am 14. DAF ausschließlich auf die filiale Gewebefraktion zurückzuführen ist. In der maternalen Fraktion ist an diesem Tag keine Veränderung der Aminosäuregehalte zu beobachten (Abb. 30). Im Gegenteil ist hier am 10. DAF der Gehalt vieler Aminosäuren sogar höher als in den maternalen Wildtyp-Geweben. Auch der Gehalt der nichtproteinogenen Aminosäure γ -Aminobuttersäure (GABA) ist ausschließlich in der filialen Fraktion erhöht. Außerdem wurden in der maternalen Fraktion höhere Gehalte an freier Xylose, Arabinose und Fucose gemessen. Diese Zucker sind einerseits an der Zellwandbiosynthese beteiligt und entstehen andererseits beim Zellwandabbau. Ein erhöhter Gehalt dieser Zucker weist auf verstärkte Synthese- und/oder Abbauprozesse innerhalb der Zellwand hin. Auch der Gehalt des Disaccharids Trehalose ist in der maternalen Fraktion der Linie 363 höher als im entsprechenden Wildtypgewebe.

Auffällig ist der veränderte Polyamingehalt in den Karyopsen der Linie 363. In den maternalen Geweben sind am 10. DAF die Gehalte von Putrescin, Spermidin sowie deren Vorläuferaminosäure Arginin erhöht; die filiale Fraktion enthält am 7. und 10. DAF mehr Putrescin als der Wildtyp.

Saccharose/Hexose-Verhältnis im Wildtyp zwischen dem 7. und 10. DAF konstant, steigt aber bis zum 14. DAF stark an. In der immunmodulierten Linie erhöht sich das Verhältnis zwischen dem 7. und 14. DAF stetig, was am 10. DAF zu einem signifikant höheren Wert als im Wildtyp führt.

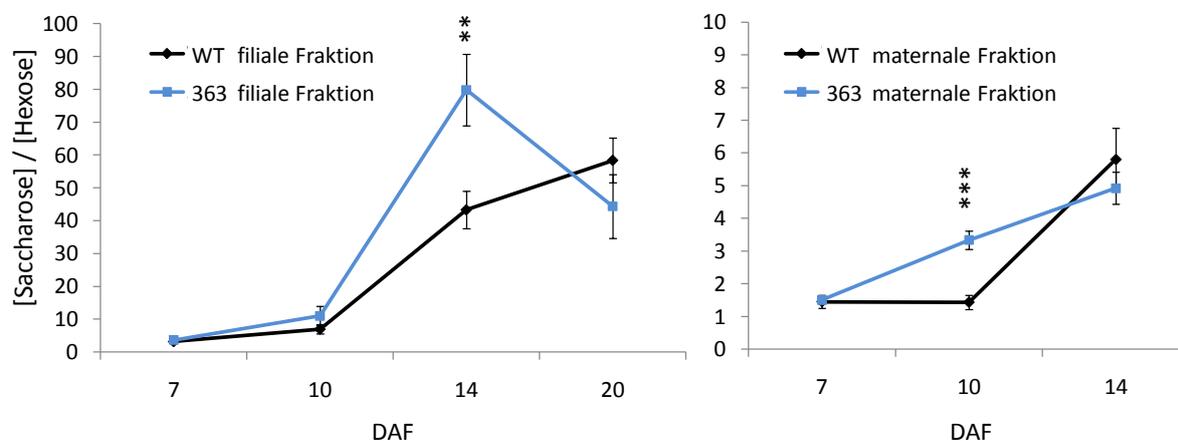


Abb. 31: Saccharose/Hexose-Verhältnis in der maternalen und der filialen Fraktion sich entwickelnder Karyopsen der 1Ax1-Promotor Linie 363 und des Wildtyps. Das Probenmaterial stammt von der Ernte Februar 2009. Sich entwickelnde Karyopsen wurden per Hand in eine filiale und eine maternale Gewebefraktion getrennt. Die Zuckergehalte wurden mittels GC/MS bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert an. Zur statistischen Bewertung der Daten wurde eine einfaktorische ANOVA durchgeführt: * $t < 0,05$; ** $t < 0,01$; *** $t < 0,005$.

4.16. Genexpressionsanalyse in der maternalen und filialen Gewebefraktion immunmodulierter Gerstenkaryopsen

Mit Hilfe der Macro- und Microarray-Technologie kann die Expression zahlreicher Gene simultan quantifiziert werden. Damit ermöglicht diese Methode einen umfassenden Überblick über das Transkriptom spezifischer Gewebetypen oder Zellen. Anhand von Arrayanalysen konnten bereits Zielgene verschiedener Regulatoren identifiziert sowie zell-, gewebe- und entwicklungsstadienspezifische Genexpressionsmuster definiert werden (Sreenivasulu *et al.*, 2006; Orlando *et al.*, 2009; Yamamoto *et al.*, 2010). Die Karyopsenentwicklung der Gerste geht sowohl in den maternalen als auch in den filialen Kornteilen mit globalen transkriptionellen Veränderungen einher (Sreenivasulu *et al.*, 2004). Auch den meisten physiologischen Antworten auf ABA geht eine differentielle Genregulation voraus (Himmelbach *et al.*, 1998). In *Arabidopsis* reguliert ABA eine wesentlich größere Anzahl von Genen als jedes andere Hormon (Fujita *et al.*, 2011).

Um den Einfluss der ABA-Immunmodulierung auf die Kornentwicklung im Detail zu verstehen, wurde daher eine umfassende Microarray-Analyse der Genexpression von sich entwickelnden Karyopsen einer transgenen Linie und des Wildtyps durchgeführt. Hierfür wurde der 4x44K *Barley Gene Expression Microarray*-Chip verwendet. Aus bereits genannten Gründen (vgl. 4.15.3.) wurde hierfür die Linie 363 ausgewählt. Das T2-Probenmaterial stammt aus der Ernte Februar 2009. Wie schon für die Metabolit-Analysen wurde das Samenmaterial vom 7., 10. und 14. DAF per Hand in eine maternale und eine filiale Gewebefraktion geteilt, welche getrennt voneinander analysiert wurden. Proben vom 20. DAF hingegen stammen von der Gesamtkaryopse. Für jede Gewebefraktion und jeden Entwicklungszeitpunkt wurden drei unabhängige RNA-Präparationen analysiert.

Da nicht alle bekannten Gene der ABA-Biosynthese und des ABA-Katabolismus in Gerste auf dem verwendeten Microarray-Chip vertreten sind, wurde die Expression dieser Gene mittels qRT-PCR untersucht. Die als *template* in die qRT-PCR-Reaktion eingesetzte cDNA wurde aus den gleichen RNA-Präparationen hergestellt wie die Sonden zur Microarray-Hybridisierung. Der Einfachheit halber werden im Vergleich zum Wildtyp höhere oder niedrigere Transkriptlevel als hoch- oder herunterreguliert bezeichnet.

4.16.1. Differentielle Expression einiger ABA-Biosynthesegene in der filialen Fraktion der Linie 363

Die Expression aller bekannten ABA-Biosynthese- und -Katabolismusgene der Gerste wurde mittels qRT-PCR untersucht. Eine Aufstellung dieser 25 Gene befindet sich in Tabelle 5. Die 9-cis-Epoxy-carotenoid-Dioxygenasen HvNCED1, HvNCED2, die putative NCED HvCCD4 sowie die Aldehydoxidase HvAO1 zeigen in der filialen Fraktion der Linie 363 eine stärkere Genexpression als im Wildtyp (Abb. 32). In der maternalen Fraktion dagegen ist die Expression dieser Gene unverändert. Das Transkriptlevel aller anderen in Tabelle 5 gelisteten Gene unterscheidet sich nicht zwischen dem Wildtyp und der immunmodulierten Linie 363 (nicht abgebildet).

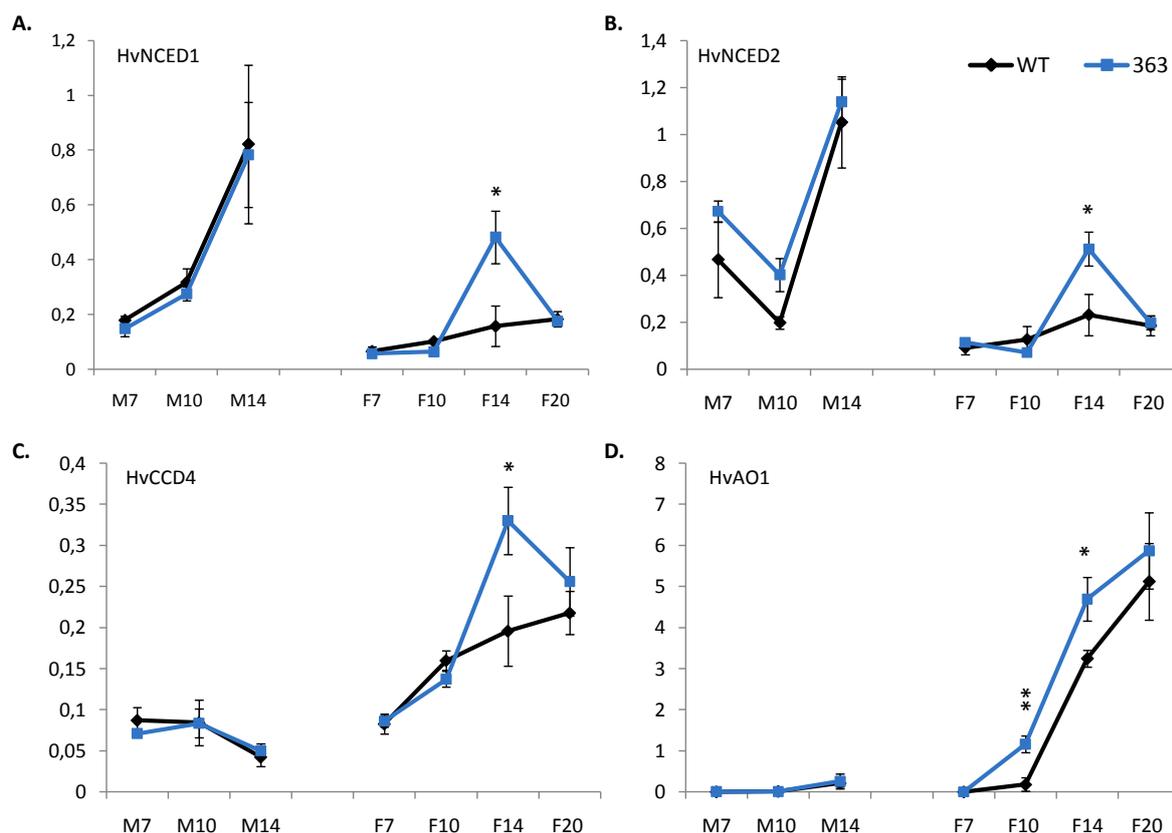


Abb. 32: Expressionsprofile von Genen der ABA-Biosynthese, die in der Linie 363 zu mindestens einem Entwicklungszeitpunkt eine im Vergleich zum Wildtyp veränderte Expression zeigen. Die Expressionsstärke wurde durch qRT-PCR ermittelt und ist relativ zu zwei stabil exprimierten Haushaltsgenen angegeben (Cyclophilin - EST-Klon HF02J07; Clathrin-Adaptorkomplex Untereinheit - EST-Klon HZ38A11). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert an. Zur statistischen Bewertung der Daten wurde eine einfaktorielles ANOVA durchgeführt: * $t < 0,05$; ** $t < 0,01$; *** $t < 0,005$. M-maternale Gewebe, F-filiale Gewebe, 7, 10, 14, 20 – Tage nach der Blüte.

4.16.2. Spezifische Reaktionen auf die ABA-Immunmodulierung in der maternalen und der filialen Gewebefraktionen

Aus der Gesamt-RNA der Proben wurde Cyanin3-markierte cRNA hergestellt und als Sonde zur Hybridisierung des 4x44K *Barley Gene Expression Microarray Chips* genutzt. Nach der Normalisierung der Daten (vgl. 3.5.7.) wurden für die weitere Auswertung nur solche *Spots* herangezogen, deren Signalintensität eine ausreichende Reproduzierbarkeit zwischen den drei biologischen Wiederholungen aufwies.

Basierend auf den Signalintensitäten von 43.183 Microarray-Sequenzen wurde eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Expressionsdaten durchgeführt. Aus dieser geht hervor, dass die größten Unterschiede in der Genexpression zwischen sich entwickelnden Karyopsen der Linie 363 und des Wildtyps in den filialen Geweben am 10. DAF auftreten (Abb. 33).

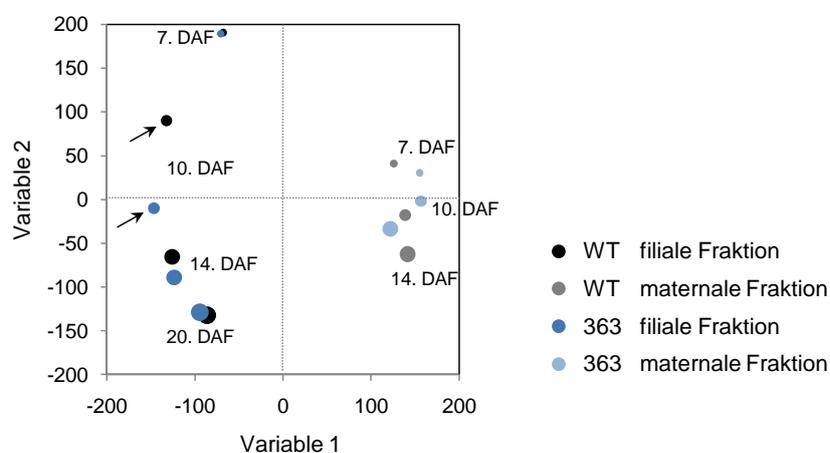


Abb. 33: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Genexpression in maternalen und filialen Geweben sich entwickelnder Karyopsen der ABA-immunmodulierten 1Ax1-Promotor Linie 363 und des Wildtyps. Die Microarray-Analyse wurde in jeweils drei biologischen Replikaten unter Verwendung des 4x44K *Barley Gene Expression Microarray Chips* (Agilent Technologies, Böblingen, D) durchgeführt. Das Probenmaterial stammt von der Ernte im Februar 2009. Pfeile deuten auf den Zeitpunkt mit den größten Unterschieden zwischen Wildtyp und transgener Linie. Die Größe der Kreise zeigt die Entwicklungszeitpunkte an: kleinster Kreis – 7. DAF, größter Kreis – 20. DAF.

Der Datensatz wurde auf solche Sequenzen reduziert, die in der Linie 363 im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant veränderte Expression in mindestens einer Gewebefraktion und zu mindestens einem Entwicklungszeitpunkt um Faktor 2 oder größer zeigten. Die Genexpression wurde als signifikant verändert bezeichnet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit t im 'Moderated t -Test' nach Benjamini und Hochberg (1995) einen Wert von $< 0,05$ annimmt. Nach Anwendung dieses Kriteriums verbleiben 1298 Sequenzen, von denen 776 in der maternalen und 702 in der filialen Fraktion eine differentielle Genexpression zwischen der transgenen Linie 363 und dem Wildtyp zeigen. Zur Auswertung wurden die Hybridisierungssignale der drei unabhängigen Wiederholungen gemittelt.

Der stark erhöhte ABA-Gehalt in den immunmodulierten Karyopsen hat eine umfangreiche Hochregulation der Genexpression zur Folge. Für die maternalen Fraktionen zeigen 744 *Spots* zu mindestens einem Entwicklungszeitpunkt eine höhere Signalintensität in der Linie 363 als im Wildtyp, während für 44 *Spots* ein schwächeres Signal gefunden wurde. In den filialen Geweben waren in der Linie 363 696 Hybridisierungssignale stärker und 15 Signale schwächer als beim Wildtyp.

Abbildung 34 gibt eine Übersicht über die differentielle Genexpression zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten in den untersuchten Gewebefractionen.

Für alle differentiell exprimierte Sequenzen wurde eine BLASTX2-Suche gegen die NRPEP-Datenbank durchgeführt, um Gene mit bisher unbekannter Funktion zu annotieren beziehungsweise die durch die Firma Agilent Technologies bereitgestellten Annotationen zu überprüfen. 34,1% der differentiell exprimierten Gene (443 Sequenzen) wurden durch die BLAST-Suche nicht annotiert oder codieren Proteine mit unbekannter Funktion. Hingegen konnten 855 Sequenzen (65,9%) funktionell annotiert werden und sind geeignet Aussagen über Veränderungen von Stoffwechselwegen oder biologischen Prozessen zu treffen. Da Transkriptabundanzen nicht zwangsläufig transkriptionelle Aktivität, Proteingehalt oder enzymatische Aktivität reflektieren, müssen die folgenden Aussagen zu Genfunktionen als putativ angesehen werden.

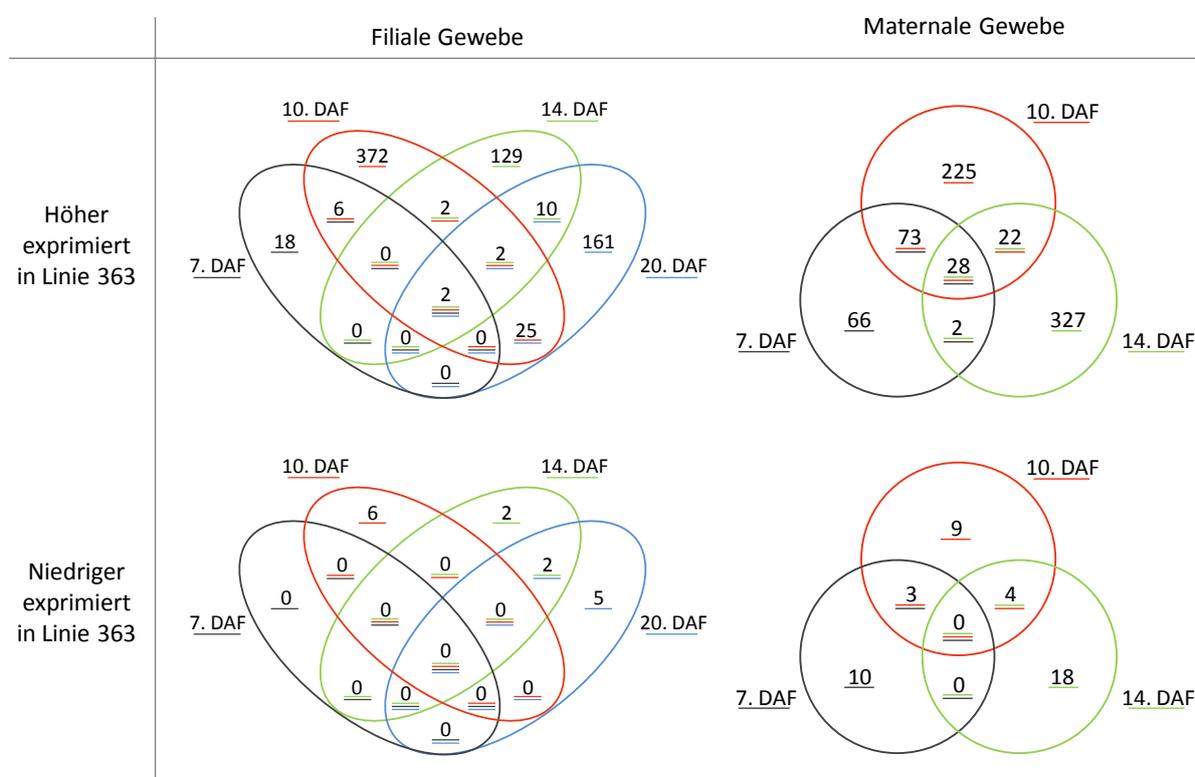


Abb. 34: Übersicht über die Anzahl der Microarray-Sequenzen, die in der Linie 363 eine im Vergleich zum Wildtyp veränderte Signalintensität zeigen. In je drei biologischen Wiederholungen wurde die Genexpression in den maternalen und filialen Teilen sich entwickelnder Karyopsen mit Hilfe des 4x44K *Barley Gene Expression Microarray Chips* (Agilent Technologies, Böblingen, D) analysiert. Das T2-Probenmaterial stammt von der Ernte im Februar 2009. Die aufgeführten Sequenzen unterscheiden sich in ihrer Signalintensität signifikant um mindestens das Doppelte zwischen Linie 363 und Wildtyp (Signifikanztest nach Benjamini und Hochberg, 1995).

Eine Übersicht über wichtige Gruppen differentiell exprimierter Gene geben die Tabellen 8 und 9 (am Ende des Kapitels „Ergebnisse“), in denen das log₂-transformierte Expressionsverhältnis zwischen Wildtyp und Linie 363 angegeben ist. Die zugehörigen normalisierten Signalintensitäten sind in den Tabellen 10 und 11 im Anhang angegeben.

Der veränderte ABA-Gehalt in den immunmodulierten Karyopsen wirkt sich in beiden Gewebefractionen unterschiedlich auf die Genexpression aus (Abb. 35). In der filialen Fraktion zeigen viele mit der Speicherung assoziierte Gene eine im Vergleich zum Wildtyp veränderte Expression. In

der maternalen Fraktion hingegen ist ein großer Teil der differentiell exprimierten Gene an der Zellteilung und Zellstreckung beteiligt. Beiden Fraktionen gemein ist jeweils eine große Gruppe von Genen, die an der Stressantwort und der Signalweiterleitung beteiligt sind. Auf ausgewählte Gene wichtiger funktioneller Gruppen soll im Folgenden näher eingegangen werden.

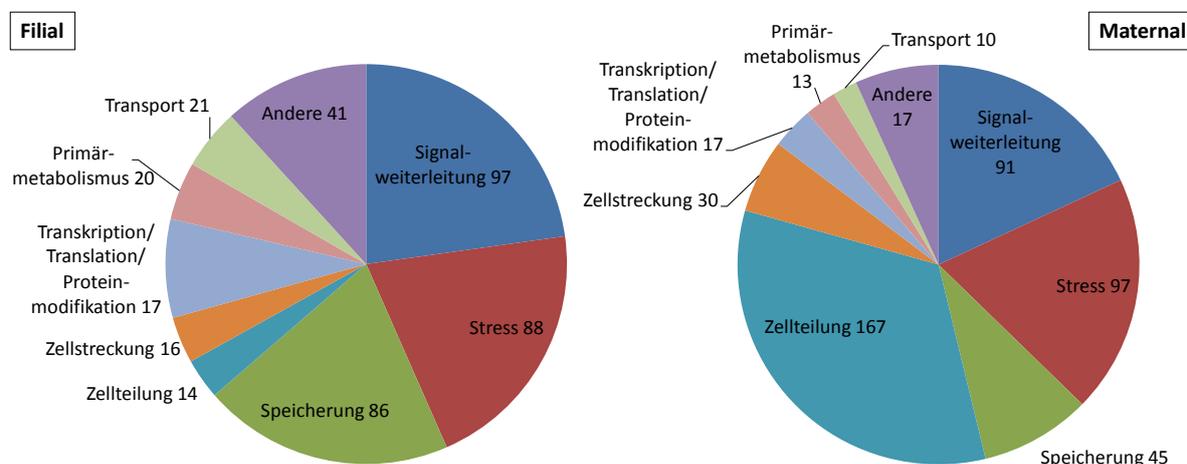
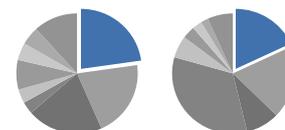


Abb. 35: Anzahl der zwischen der Linie 363 und dem Wildtyp differentiell exprimierten Gene in der filialen bzw. maternalen Gewebefraktion und deren Beteiligung an verschiedenen zellulären Prozessen.

4.16.3. Differentielle Expression von Genen der Signalweiterleitung in beiden Gewebefraktionen

Bis heute wurde eine große Zahl von Komponenten identifiziert, die an der Vermittlung ABA-abhängiger Antworten beteiligt ist. Zur ABA-Signalweiterleitung gehören Phosphorylierungskaskaden, calcium-abhängige und Redox-Signale sowie *de novo* Genexpression. Weiterhin wirken Stickstoffmonoxid, cGMP und H₂O₂ an der Weiterleitung von ABA-Signalen mit (Christmann *et al.*, 2006; Raghavendra *et al.*, 2010).



Acht bzw. zehn Gene, die an der Perzeption intrazellulärer Calciumkonzentration oder der daraus resultierenden Signalweiterleitung beteiligt sind, werden am 10. DAF in der maternalen bzw. am 10. und 14. DAF in der filialen Fraktion stärker exprimiert als im Wildtyp (Tab. 8). Der größte Teil der differentiell exprimierten Gene für die calciumabhängigen Signalweiterleitung zeigt sowohl in der maternalen als auch in der filialen Gewebefraktion eine vom Wildtyp abweichende Expression.

Zu den in der Linie 363 hochregulierten Genen gehören außerdem 21 Kinasen, Rezeptorkinasen und Phosphatasen. Nur drei dieser Gene werden sowohl in der maternalen als auch in der filialen Fraktion höher exprimiert als im Wildtyp.

Weiterhin sind in beiden Fraktionen der Linie 363 zahlreiche Transkriptionsfaktoren (TF) diverser Klassen hochreguliert. In den maternalen Geweben der Linie 363 handelt es sich um 29 Transkriptionsfaktorgene. Hierzu gehören sieben Zinkfinger-, fünf bHLH-, vier MYB-, zwei B3-, zwei WRKY-, zwei HSF-, zwei PHD-, zwei NAC-, zwei bZIP- und ein MADS-Box-TF. In der filialen Fraktion sind insgesamt 28 TFs stärker exprimiert als im Wildtyp, darunter neun Zinkfinger-, drei MADS-Box-, drei MYB-, drei AP2/EREBP-, drei bHLH-, zwei WRKY-, zwei Homeobox-, ein bZIP-, ein PHD- und ein NAC-TF. Für die meisten dieser Transkriptionsfaktorklassen ist bekannt, dass sie an der Regulation der ABA-vermittelten Genexpression beteiligt sind (Sreenivasulu *et al.*, 2006; Fujita *et*

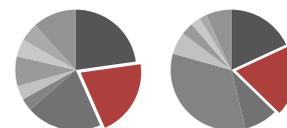
al., 2011). Herunterregulierte Transkriptionsfaktorgene wurden in der Microarray-Analyse nicht detektiert. Die in beiden Fraktionen im Vergleich zum Wildtyp regulierten Transkriptionsfaktorgene unterscheiden sich zu einem großen Teil voneinander. Nur acht Gene werden sowohl in der maternalen als auch in der filialen Fraktion stärker transkribiert als im Wildtyp.

Weiterhin wird das Gen einer Trehalosephosphat-Synthase in der maternalen Fraktion der Linie 363 am 7. DAF und in der filialen Fraktion am 14. DAF stärker exprimiert als im Wildtyp. Die Expression von Trehalosephosphat-Phosphatase-Genen ist in der maternalen Fraktion zu allen untersuchten Entwicklungszeitpunkten erhöht. In der filialen Fraktion trifft dies für den 10. DAF zu.

Stickstoffmonoxid (NO) dient in Pflanzen als endogenes Signalmolekül und vermittelt sowohl physiologische als auch Entwicklungsprozesse. Ein wichtiges Enzym zur Herstellung von NO ist die Nitratreduktase (Neill *et al.*, 2008), die am 10. DAF in der filialen und am 10. und 14. DAF in der maternalen Fraktion der Linie 363 stärker exprimiert wird als im Wildtyp. Schließlich ist am 10. DAF in der maternalen Fraktion auch die Expression einer Guanylatcyclase hochreguliert. Dieses Enzym synthetisiert den sekundären Botenstoff cGMP, welcher zur Vermittlung einiger ABA-Antworten notwendig ist (Dubovskaya *et al.*, 2011). Die exogene Applikation von ABA erhöht in *Arabidopsis*-Pflanzen den endogenen cGMP-Gehalt drastisch (Dubovskaya *et al.*, 2011).

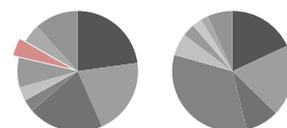
4.16.4. Differentielle Expression von stressassoziierten Genen in beiden Gewebefraktionen

Wie bereits erwähnt, ist in beiden Gewebefraktionen der Linie 363 eine beträchtliche Anzahl stressassoziierten Gene im Vergleich zum Wildtyp hochreguliert. Diese vermitteln Antworten auf ein breites Spektrum von Stressfaktoren wie Hitze-, Kälte-, osmotischen, oxidativen, Schwermetall- und biotischen Stress (Tab. 8). Die Expression vieler dieser Gene wird durch ABA induziert (Chandler und Robertson, 1994; Buchanan *et al.*, 2005; Nakashima *et al.*, 2009). Trotz ihrer häufig putativ ähnlichen Funktion ist die Identität der stressassoziierten Gene, die in der maternalen bzw. filialen Fraktion hochreguliert sind, verschieden. Nur 24 von 148 stressassoziierten Genen (16,2%) zeigen in beiden Gewebefraktionen eine gleichermaßen vom Wildtyp abweichende Regulation. Zusätzlich fällt auf, dass zu allen untersuchten Entwicklungszeitpunkten ausschließlich in der maternalen Fraktion eine große Anzahl von HSP-Genen verschiedener Klassen hochreguliert ist.



4.16.5. Differentielle Expression von Genen des Primärmetabolismus in der filialen Fraktion

Die Glykolyse und der Zitronensäurezyklus zeigen auf Transkriptebene kaum Veränderungen zwischen der Linie 363 und dem Wildtyp. Allein das Gen einer Phosphofruktokinase ist in der filialen Fraktion der Linie 363 am 10. DAF stärker exprimiert als im Wildtyp (Tab. 8).



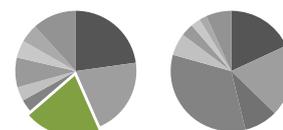
Trotz der erniedrigten Aminosäuregehalte in den sich entwickelnden Karyopsen am 14. DAF sind kaum Gene der Aminosäurebiosynthese bzw. -abbaus zwischen der Linie 363 und dem Wildtyp differentiell exprimiert. In der filialen Fraktion sind am 10. DAF wenige Gene der Aminosäurebiosynthese hochreguliert. Dazu gehören die Gene einer Methionin-Synthase, einer Asparagin-Synthetase sowie einer Dihydroxysäure-Dehydratase, die eine Rolle in der Synthese von

Valin, Leucin und Isoleucin spielt (Heldt und Heldt, 2005). Weiterhin zeigen die Gene einer Aminotransferase, der Glutamat-Decarboxylase sowie einer Anthranilat-Phosphoribosyltransferase eine verstärkte Expression. Letztere ist an der Biosynthese von Tryptophan beteiligt (Berg *et al.*, 2003). Auch zwei Sequenzen von Pyridoxin Biosyntheseproteinen werden stärker exprimiert als im Wildtyp. Von Pyridoxin leitet sich Pyridoxalphosphat ab, das als prosthetische Gruppe aller Aminotransferasen dient. Als einziges Enzym des Aminosäurekatabolismus ist zudem am 10. DAF eine L-Asparaginase niedriger exprimiert als im Wildtyp. Am 14. DAF sind außerdem die Transkripte dreier Aminosäuretransporter in den filialen Geweben der 363-Karyopsen hochreguliert.

4.16.6. Differentielle Expression von Genen der Speicherstoffbiosynthese in der filialen Fraktion

Der Hauptspeicherstoff in Gerstenkörnern ist Stärke. Diese wird hauptsächlich im filialen Stärke-Endosperm synthetisiert und gespeichert.

Am 10. bzw. 14. DAF sind in der filialen Fraktion der Linie 363 die Gene



der Saccharose Synthase, eines stärkeinitiiierenden Proteins, eines stärkeverzweigenden Enzyms sowie einer Limit-Dextrinase höher exprimiert als im Wildtyp, was auf eine verstärkte Speicheraktivität hinweist.

Während der Samenentwicklung wird Stärke auch im filialen Aleuron und der embryoumgebenden Region des Endosperms synthetisiert. Bei beidem handelt es sich um vorübergehend zwischengespeicherte Stärke, die noch während der Kornentwicklung remobilisiert wird (Duffus und Cochrane, 1993; Radchuk *et al.*, 2009). Bereits 1989 wurde in der embryoumgebenden Region des Endosperms eine α -Amylase Enzymaktivität detektiert (MacGregor und Dushnicky), während β -Amylase eine Rolle beim Abbau transienter Stärke spielt (Radchuk *et al.*, 2009). In der filialen Fraktion sind am 10. DAF die Gene der β -Amylase BAM1 und der α -Amylase AMY3 hochreguliert. Wie Radchuk *et al.* (2009) zeigten, stimmen die Enzymaktivitäten von AMY und BAM mit den Transkriptabundanz der zugehörigen Gene weitgehend überein. Daher weist die Expressionsanalyse auf eine verstärkte Stärkeremobilisierung am 10. DAF in der filialen Gewebefraktion hin.

Die Hauptspeicherproteine der Gerste setzen sich aus mindestens vier Gruppen von Polypeptiden zusammen: den B-, C-, D- und γ -Hordeinen (Shewry *et al.*, 1995). Etwa 70 bis 80% des Gesamtprolamingehaltes reifer Gerstensamen bestehen aus B- und C-Hordeinen, während D- und γ -Hordeine einen geringeren Anteil ausmachen (Kreis und Shewry, 1992). Am 7. bzw. 10. DAF sind Gene aller vier Hordein-Klassen in der filialen Fraktion der Linie 363 hochreguliert (siehe Tab. 8). Die Kontrolle der Prolaminexpression in Getreiden findet hauptsächlich auf der Ebene der Transkription statt (Bartels und Thompson, 1986; Sørensen *et al.*, 1989). Daher weist die verstärkte Expression von Hordeingenen auf eine erhöhte Proteinspeicheraktivität in den filialen Geweben der Line 363 hin. Auch Gene der hauptsächlich im Aleuron und im Embryo gespeicherten Globuline werden am 10. DAF in der Linie 363 stärker exprimiert als im Wildtyp (Tab. 8).

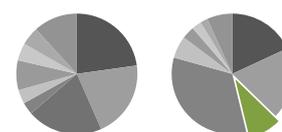
Einen erheblichen Teil der Albumine in reifen Karyopsen macht eine Familie von Trypsin/ α -Amylase-Inhibitoren aus, deren Expression ebenfalls auf Endosperm und Aleuron beschränkt ist (Übersicht in Shewry und Halford, 2002). Viele der für diese Proteine codierenden Gene sind in der filialen Fraktion der Linie 363 hochreguliert. Dazu gehören zwei Gene von Bowman-Birk Trypsin-Inhibitoren (14. und

20. DAF), zwei Subtilisin-Chymotrypsin Inhibitoren (10. DAF) sowie die Gene dreier nicht näher charakterisierter Protease-Inhibitoren (10. DAF). Häufig wird die Expression dieser Gene durch ABA induziert (Robertson *et al.*, 1989; Furtado *et al.*, 2003). Ebenfalls am 10. DAF ist die Expression von sechs Serpin-codierenden Sequenzen hochreguliert. Serpine sind *in vitro* starke und irreversibel wirkende Inhibitoren von Serin-Proteasen der Chymotrypsin-Familie (Lundgard und Svensson, 1989; Dahl *et al.*, 1996). Hochreguliert sind auch die Gene eines CMA-Proteins (10. DAF), welches als Inhibitor von Insekten- α -Amylase wirkt (Barber *et al.*, 1986), sowie drei CMd-Sequenzen (10. und 20. DAF). CMd-Proteine bilden mit anderen CM-Proteinen *in vitro* multimere Komplexe mit α -Amylase-hemmender Aktivität (Carbonero *et al.*, 1993).

Weiterhin sind in der filialen Fraktion der Linie 363 am 10. bzw. 20. DAF LEA-Gene mehrerer Klassen hochreguliert. So werden sechs Sequenzen von Em-Genen stärker exprimiert als im Wildtyp. Em-Proteine sind Mitglieder der Klasse 1 der LEA Protein-Familie (Übersicht bei Tunnacliffe und Wise, 2007). Gleichzeitig sind drei Dehydrin-Gene der LEA-Klasse 2 und zwei LEA-Gene der Klasse 3/4 hochreguliert.

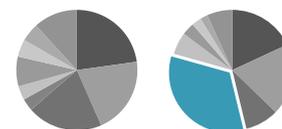
4.16.7. Differentielle Expression von Genen der Stärkeremobilisierung in der maternalen Fraktion

In der maternalen Gewebefraktion wird am 10. und 14. DAF das β -Amylase-Gen BAM1 in der Linie 363 niedriger exprimiert als im Wildtyp. BAM2 hingegen ist am 14. DAF hochreguliert.



4.16.8. Differentielle Expression von zellteilungsassoziierten Genen in der maternalen Fraktion

Die Microarray-Analyse der Genexpression weist durch eine erhöhte Transkriptabundanz für viele mit der Zellteilung assoziierte Gene auf eine im Vergleich zum Wildtyp länger aktive Zellteilung im Perikarp der Linie 363 hin (Tab. 8). Der Zellzyklus besteht aus vier Phasen, die als *Gap1*-, Synthese-, *Gap2* und Mitose-Phase (kurz G1-, S-, G2- und M-Phase) bezeichnet werden. Während der S-Phase des Zellzyklus findet die DNA-Replikation statt. Die M-Phase gliedert sich in zwei eng miteinander verknüpfte Prozesse: Zuerst findet die Mitose im engeren Sinne statt, während der die Chromosomen auf beide künftigen Tochterzellen aufgeteilt werden. Anschließend kommt es zur Cytokinese, die zur Bildung zweier getrennter Zellen führt. Die G-Phasen hingegen sind durch Zellwachstum gekennzeichnet. Im Folgenden wird auf in der Linie 363 hochregulierte Gene eingegangen, die während der S- und der M-Phase eine Rolle spielen.



Zu den am 14. DAF in der maternalen Fraktion der Linie 363 hochregulierten S-Phase-spezifischen Genen gehören eine zu *AtMCM4* und zwei zu *AtMCM3* homologe Sequenzen. Die *Arabidopsis* MCM3- und MCM4-Proteine sind ein Teil des MCM-Komplexes, der an der Initiation der DNA-Replikation beim Eintritt in die S-Phase beteiligt ist. Die Transkription des *AtMCM3* Gens ist S-Phase spezifisch (Stevens *et al.*, 2002). Weiterhin ist das Gen einer putativen DNA-Topoisomerase II hochreguliert. Dieses Enzym erfüllt unter anderem die Aufgabe, die bei der DNA-Replikation entstehende superhelikale Verdrillung der DNA zu entspannen (Corbett und Berger, 2003). Die

Expression einiger Topoisomerasen II, die eine Rolle während der Zellteilung spielen, wird durch ABA stimuliert (Jain *et al.*, 2006). Ebenso ist am 14. DAF das Gen einer zu *AtPARP1* homologen Poly-ADP-Ribose-Polymerase in der maternalen Fraktion hochreguliert. Das *AtPARP1*-Protein akkumuliert nur in teilungsaktiven Geweben (Doucet-Chabeaud *et al.*, 2001). Es bindet *in vitro* effizient an DNA Strangbrüche und synthetisiert ADP-Ribose-Polymere. Die Akkumulation von *AtPARP1* in Reaktion auf eine DNA-Beschädigung passt zu dessen Rolle bei der Erhaltung der DNA-Integrität während der Replikation (Doucet-Chabeaud *et al.*, 2001).

Während der S-Phase des Zellzyklus wird nicht nur die chromosomale DNA sondern auch die Chromatinstruktur repliziert. Dies geht mit einer Verdopplung des Histongehaltes der Zellen einher (Meshi *et al.*, 2000). In der maternalen Fraktion der Linie 363 ist am 14. DAF eine große Zahl von Histonen stärker exprimiert als im Wildtyp. Mit 14 Histon H1-, 41 Histon H2A-, 45 Histon H2B-, 39 Histon H3- und drei Histon H4-Sequenzen sind hierbei alle Histontypen vertreten (Tab. 9). Die Akkumulation von Histon-mRNA ist mit der DNA-Replikation während des Zellzyklus koordiniert und wird auf mehreren Ebenen kontrolliert, von denen der Regulation auf Transkriptionsebene die größte Bedeutung zukommt (Meshi *et al.*, 2000; Marzluff *et al.*, 2008).

Auch die Expression eines fasciata-ähnlichen Proteins ist am 14. DAF in der maternalen Gewebefraktion auf Transkriptionsebene hochreguliert. In *Arabidopsis* ist *FAS1* eine Untereinheit des hochkonservierten heterotrimeren *Chromatin assembly factor1*-Komplexes, der die Nucleosomenbildung bei frisch replizierter DNA unterstützt (Exner *et al.*, 2006). Gleichzeitig ist das Gen einer anderen Untereinheit des Chromatin-Assemblierungsfaktors hochreguliert.

Auch eine Vielzahl von M-Phase-spezifischen Genen ist in der maternalen Gewebefraktion der Linie 363 am 14. DAF stärker exprimiert als im Wildtyp. Der Eintritt in diese Zellzyklus-Phase wird sowohl durch A- als auch B-Cycline vermittelt (Inze und De Veylder, 2006). Am 14. DAF sind die Sequenzen von zwei Cyclinen A1, eines Cyclins A2 und vier Cyclinen B hochreguliert. Zusätzlich wird das Gen eines putativen *mitotic-checkpoint*-Proteins stärker exprimiert als im Wildtyp. Die Regulation der Cyclinexpression findet zumindest teilweise auf der Ebene der Transkription statt (Inze und De Veylder, 2006). Ebenso sind am 14. DAF die Gene zweier Kondensin-Untereinheiten hochreguliert. Eine davon ist homolog zu *AtSMC2*, welches in Eukaryoten eine zentrale Komponente des Kondensin-Komplexes bildet (Hirano, 2005). Kondensine führen unter ATP-Hydrolyse positive superhelikale Verdrillungen in doppelsträngige DNA ein, was zur Bildung von kondensierten Metaphasechromosomen führt (Losada und Hirano, 2005).

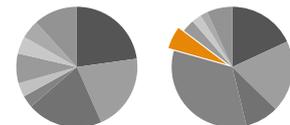
Schließlich weist am 14. DAF die verstärkte Gentranskription von Faktoren, die an der Cytokinese beteiligt sind, auf eine im Vergleich zum Wildtyp stärkere Zellteilungsaktivität in der maternalen Fraktion der Linie 363 hin. Während der Cytokinese von Pflanzenzellen wird im Zentrum des Phragmoplasten durch die Fusion von Golgi-Vesikeln eine Zellplatte gebildet. Der Phragmoplast besteht aus Actinfilamenten und antiparallelen Microtubuli, an deren Organisation und dynamischer Stabilität kinesinähnliche Motorproteine (KRP) beteiligt sind. In der Linie 363 wird das Gen eines Phragmoplast-orientierenden Kinesins im Vergleich zum Wildtyp stärker exprimiert. Durch weitere kinesinähnliche Proteine werden Golgi-Vesikel entlang der Phragmoplasten-Microtubuli zur zellplattenassemblierenden Matrix transportiert. Hier kommt es zur Fusion der Vesikel. Auch die Gene

dreier Phragmoplast-assoziiierter kinesinähnlicher Proteine werden in der maternalen Fraktion in der Linie 363 verstärkt transkribiert. Das Aufblähen des neuen Membrankompartiments wird durch dynaminähnliche Proteine verhindert. Sie schnüren die Membranen zusammen und führen zur Bildung sogenannter Fusionsschläuche. Ein Gen aus der Dynamin-Familie ist in der Linie 363 hochreguliert. Nach weiteren Membranfusionsereignissen entwickeln sich die Fusionsschläuche zu einem tubulovesikuläres Netzwerk, der Zellplatte, weiter. Dieser Vorgang wird in *Arabidopsis* durch die Aktivität der mitogen-aktivierten Proteinkinasekinase (MAP3K) NPK1 gesteuert (Zusammenfassung in Jürgens, 2005). Am 14. DAF ist in der maternalen Fraktion der Linie 363 das Gen einer zu AtNPK1 orthologen Gerstenkinase stärker exprimiert als im Wildtyp.

Microtubuli erfüllen eine Vielzahl von Aufgaben während der Mitose und Cytokinese. Sie sind Bestandteile des Spindelapparates, des Präprophasebandes, das die Lage der neuen Zellbegrenzung markiert, und des Phragmoplasten, der als Gerüst für die entstehende Zellplatte dient. Auch ein Tubulingen ist am 14. DAF in der maternalen Fraktion der Linie 363 höher exprimiert als im Wildtyp.

4.16.9. Differentielle Expression von zellstreckungsassoziierten Genen in der maternalen Fraktion

In der maternalen Gewebefraktion der Linie 363 wird eine große Zahl von Genen, die mit der Zellelongation assoziiert sind, höher exprimiert als in den entsprechenden Wildtyp-Geweben (Tab. 8). Dies weist auf eine im Vergleich zum Wildtyp höhere Zellstreckungsaktivität im Perikarp der Linie 363 hin.



Um die Expansion der Zelle während der Zellelongation zu ermöglichen, ist ein selektives Lösen der Verknüpfungen zwischen den Zellwandpolymeren notwendig. In wachsenden Pflanzengeweben finden simultan die Hydrolyse und der Einbau neuer Glukane in die Zellwand statt (Inouhe *et al.*, 2000; Cosgrove, 2005). In der maternalen Fraktion der Linie 363 ist am 14. DAF die Transkription zweier Glukan-endo-1,3-beta-D-glukosidasen hochreguliert. Beide sind möglicherweise an der Lockerung der Zellwand beteiligt.

Die Hemicellulose Xyloglukan trägt zur Stabilität der pflanzlichen Zellwand bei, indem sie benachbarte Cellulose-Microfibrillen miteinander vernetzt. Die Degradierung von Xyloglukan durch Xyloglukanasen hat eine Lockerung der Zellwand zur Folge (Hayashi und Kaida, 2011). Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Zellelongation. In der maternalen Fraktion der Linie 363 sind am 14. DAF die Gene zweier Xylosidasen höher exprimiert als im WT. In Pappel hatte die Überexpression einer Xylosidase eine dramatisch verstärkte Zellstreckung in der apikalen Wachstumszone des Sprosses zur Folge (Park *et al.*, 2004). Weiterhin sind am 10. und 14. DAF in der maternalen Fraktion der Linie 363 die Gene zweier Xyloglukan-Endotransglykosylasen auf Transkriptebene hochreguliert. Diese Enzyme tragen zur Zellwandmodifizierung bei, indem sie Xyloglukane spalten und das entstandene reduzierende Polysaccharid auf das nichtreduzierende Ende eines anderen Xyloglukans übertragen. Auf diese Weise trägt dieses Enzym zur Plastizität der Zellwand bei. Auch zwei Gene aus der Glykosylhydrolase-Familie 10 sind am 10. und 14. DAF in der maternalen Fraktion hochreguliert. Diese Familie umfasst ebenfalls verschiedene Xylulose-spaltende Enzyme (Henrissat, 1991). Weiterhin werden am 14. DAF in der maternalen Gewebefraktion der Linie 363 zwei

Polygalakturonase-Gene verstärkt transkribiert. Polygalakturonasen degradieren Polygalakturonan, das ein Bestandteil des Pektin-Netzwerkes in pflanzlichen Zellwänden ist. Gleichzeitig ist die Expression dreier putativer *Purple acid*-Phosphatasen hochreguliert. In Tabak wurde gezeigt, dass dieses Enzym die Aktivität von Kallose- und Zellulosesynthasen (Kaida *et al.*, 2009), aber auch von zellwandabbauenden Enzymen wie α -Xylosidasen und β -Glukosidasen (Kaida *et al.*, 2010) reguliert. Expansine sind Schlüsselenzyme der Zellwandlockerung (Cosgrove, 2005). Sie brechen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Zellulose und der umgebenden Matrix auf. Dadurch wird die Dehnbarkeit der Zellwand erhöht (McQueen-Mason *et al.*, 1992). Am 14. DAF ist in der maternalen Fraktion ein Expansinogen stärker exprimiert als im Wildtyp. Expansine werden durch einen sauren pH-Wert aktiviert. Der pH-Wert wird durch die Plasmamembran- H^+ -ATPase gesteuert. Auch sie ist in der maternalen Fraktion am 14. DAF transkriptionell hochreguliert. Zusätzlich ist die Expression dreier nicht näher charakterisierter Strukturproteine in der maternalen Fraktion der Linie 363 am 14. DAF erhöht. Zur gleichen Zeit ist ein zu Roothairless3 aus Mais homologes Gen hochreguliert. Dieses Gen codiert ein COBRA-ähnliches Protein. Obwohl die Funktionen der COBRA-Gen Superfamilie noch vollständig aufgeklärt sind, scheint es, dass diese Gene generell an unterschiedlichen Vorgängen bei der Zellexpansion und Zellwandbiosynthese beteiligt sind (Brady *et al.*, 2007).

Lignin verleiht Zellwänden Festigkeit und wird hauptsächlich in den Wänden spezialisierter Zellen eingelagert (Taiz und Zeiger, 2002). Doch auch in den Zellwänden des Getreideperikarps befindet sich Lignin (Harris *et al.*, 2005). Für die Biosynthese von dessen Vorstufen, den Monolignolen, sind zwei Methylierungsschritte notwendig. Diese werden durch die Kaffeesäure-O-Methyltransferase und die Caffeoyle-CoA-O-Methyltransferase katalysiert. Am 14. DAF sind in der maternalen Fraktion der Linie 363 zwei Kaffeesäure-O-Methyltransferase-Sequenzen sowie das Gen einer Caffeoyle-CoA-O-Methyltransferase stärker exprimiert als im Wildtyp.

Die Vergrößerung des Zellvolumens während der Samenentwicklung ist immer mit der Aufnahme von Wasser verbunden, welche durch spezialisierte Membrankanäle oder Aquaporine ermöglicht wird. Auch ein Aquaporinogen wird in der maternalen Fraktion am 14. DAF verstärkt transkribiert. In den Blättern und Wurzeln von Weizen (Gao *et al.*, 2010) und Mais (Parent *et al.*, 2009) wird die mRNA- und Proteinexpression von Aquaporinen durch ABA stimuliert.

Polyamine kommen ubiquitär in höheren Pflanzen vor und sind an einer Vielzahl von biologischen Prozessen wie der Kontrolle der Zellteilung, der Proteinbiosynthese und der Stresstoleranz beteiligt (Takahashi und Kakehi, 2010). Das Schlüsselenzym der Putrescibiosynthese in Pflanzen ist die Arginindecarboxylase (ADC). Die Expression des ADC-Gens ist in der maternalen Fraktion der Linie 363 am 14. DAF stark hochreguliert. Der Polyaminabbau wird durch Polyaminoxidasen (PAO) katalysiert. Dieser Prozess ist mit der Bildung von H_2O_2 verbunden (Takahashi und Kakehi, 2010). Von den zwei Polyaminoxidasengen der Gerste ist das ährenspezifische HvPAO1-Gen (Cervelli *et al.*, 2006) in der maternalen Fraktion am 14. DAF hochreguliert. Das PAO1-Protein wird nach seiner Synthese höchstwahrscheinlich über den sekretorischen Weg in den Apoplasten transportiert. In Mais stimuliert exogene ABA die Expression des PAO-Gens sowie die Aktivität der apoplastischen PAO (Xue *et al.*, 2009). Die Produktion von Wasserstoffperoxid bei der

Polyaminoxidation trägt zur Zellwandsynthese und -Lignifizierung sowie zur Zellwandverstärkung bei Pathogeninvasionen bei (Xue *et al.*, 2009).

Tab. 8: Durch die Microarray-Analyse identifizierte differentiell exprimierte Gene in den Karyopsen der ABA-immunmodulierten Linie 363 im Vergleich zum Wildtyp. Angegeben ist das log₂-transformierte Expressionsverhältnis zwischen Wildtyp und Linie 363 in der maternalen bzw. filialen Gewebefraktion der im Text erwähnten Gene. Die differentiell exprimierten Histongene sind gesondert in Tab. 9 aufgeführt. Als differentiell exprimiert wurden solche Gene definiert, deren Expressionsstärke sich zwischen Wildtyp und Linie 363 in mindestens einer Gewebefraktion zu mindestens einem Entwicklungszeitpunkt um mindestens das Doppelte unterscheidet. Eine Liste der Absolutwerte der Signalintensitäten befindet sich in Tab. 10 im Anhang. Eine zwischen Wildtyp und Linie 363 signifikant verschiedene Expression (t<0,05, Signifikanztest nach Benjamini und Hochberg, 1995) ist durch Fettdruck der entsprechenden Werte hervorgehoben. Der Farbcode hebt die Zeitpunkte und Stärke der deregulierten Genexpression hervor:

$$x = \log_2 \frac{[\text{Expression Linie 363}]}{[\text{Expression Wildtyp}]}$$

-∞ < x ≤ -2
-2 < x ≤ -1
-1 < x < 1
1 ≤ x < 2
2 ≤ x < 4
4 ≤ x < ∞

Sequenz-ID	Annotation	Maternale Fraktion			Filiale Fraktion			
		7DAF	10DAF	14DAF	7DAF	10DAF	14DAF	20DAF
ABA-Metabolismus								
A_13_P047996	HvNCED1	-0,07	-0,12	-0,38	0,02	-0,40	1,37	-0,63
A_13_P056111	HvNCED2	0,41	1,16	0,31	0,43	-0,48	1,34	0,30
A_13_P297012	HvCCD4	0,21	-0,04	0,11	-0,15	-0,23	1,08	0,38
A_13_P255677	β-Glukosidase	-0,09	-0,02	0,01	-0,02	-0,09	-0,24	1,02
A_13_P261512	β-Glukosidase	0,49	0,31	-0,90	-0,24	-0,11	1,54	0,61
A_13_P449253	β-Glukosidase	0,93	1,01	-0,68	0,21	0,52	0,48	0,07
A_13_P571179	β-Glukosidase	-0,95	-0,22	1,03	-0,20	-0,75	-0,29	0,01
A_13_P085896	β-Glukosidase	-0,94	-0,14	1,05	-0,48	-0,45	-0,04	0,06
Signalweiterleitung - Calcium								
A_13_P440286	Ca ²⁺ -bindendes Protein, EF-Hand	0,69	1,96	-0,09	0,60	0,31	0,91	-0,29
A_13_P407836	Ca ²⁺ -bindendes Protein	0,44	1,10	0,30	0,30	-0,31	0,19	-0,50
A_13_P473013	Calmodulin	0,23	1,69	0,28	0,44	-0,02	1,36	0,17
A_13_P159590	Calmodulin	0,13	1,70	0,16	0,29	0,22	1,26	0,20
A_13_P132815	Ca ²⁺ -bindendes Protein, EF-Hand	0,68	1,77	0,38	0,35	0,06	1,42	0,61
A_13_P188229	Calcium-transportierende ATPase, putativ	0,41	1,28	0,26	0,13	-0,44	1,72	-0,55
A_13_P168135	Calmodulin-bindendes Protein, putativ	1,03	2,06	-0,07	0,52	-0,31	1,17	0,64
A_13_P445748	Ca ²⁺ -bindendes Protein	-0,61	-0,16	2,05	0,39	1,77	0,49	0,48
A_13_P348572	Calnexin	0,16	0,50	0,15	0,38	0,60	1,04	0,48
A_13_P042536	Ca ²⁺ -bindendes Protein, EF-Hand	0,09	-0,04	-0,08	0,01	1,03	0,16	-0,01
A_13_P489935	Calmodulin-bindende Proteinphosphatase, putativ	0,31	0,48	0,05	-0,03	1,24	0,35	0,41
A_13_P548494	Calmodulin-bindendes Protein	0,85	0,35	0,08	0,17	1,22	0,08	0,05
Signalweiterleitung - Kinase								
A_13_P183859	Proteinkinasedomäne enthaltendes Protein	-0,57	-0,14	1,09	-0,05	-0,39	-0,26	0,06
A_13_P129385	Serin/Threonin-Kinase	1,62	0,77	-0,17	0,77	0,41	0,41	0,09
A_13_P464203	Serin/Threonin-Kinase	0,69	1,18	0,10	0,26	0,32	0,55	0,06
A_13_P213164	Serin/Threonin-Kinase	0,93	1,10	-0,28	0,60	0,46	0,73	-0,30
A_13_P186239	Proteinkinasedomäne enthaltendes Protein	0,24	1,46	0,13	-0,14	-0,01	0,52	0,30
A_13_P053686	Rezeptorkinase mit leuzinreichen Repeats	-0,03	1,07	-0,45	0,09	0,09	0,29	-0,35
A_13_P174265	Serin/Threonin-Kinase	0,79	2,54	0,32	0,98	0,23	2,10	-0,43
A_13_P156135	CBL-interagierende Proteinkinase	1,08	1,64	-0,07	0,63	-0,45	1,34	0,05
A_13_P167635	Serin/Threonin-spezifische Rezeptorkinase	0,06	0,05	0,08	0,20	0,04	1,44	2,87
A_13_P237143	Serin/Threonin-spezifische Rezeptorkinase	-0,02	0,13	-0,05	0,04	0,04	0,45	1,07
A_13_P477915	Serin/Threonin-Kinase	-0,08	0,09	-0,28	0,00	0,10	1,05	0,63
A_13_P052366	Rezeptorkinase	0,77	0,58	-0,38	0,23	0,04	1,08	-0,11
A_13_P424401	Serin/Threonin-Kinase	0,15	0,11	-0,06	0,00	1,30	-0,17	0,89
A_13_P489865	Zellwand-assoziierte Kinase	0,01	0,09	-0,02	0,01	1,14	0,13	0,49
A_13_P248273	CBL-interagierende Proteinkinase	0,33	-0,64	0,44	0,15	1,31	0,11	1,01
A_13_P193114	Rezeptorkinase	0,27	-0,17	0,05	-0,05	1,15	0,29	-0,02
A_13_P518869	Serin/Threonin-spezifische Rezeptorkinase	0,02	0,01	-0,20	-0,09	1,10	0,04	0,06
A_13_P008516	Rezeptorkinase	0,21	0,04	-0,33	1,00	0,01	0,12	-0,06

Sequenz-ID	Annotation	Maternale Fraktion			Filiale Fraktion			
		7DAF	10DAF	14DAF	7DAF	10DAF	14DAF	20DAF
Signalweiterleitung - Phosphatase								
A_13_P096400	Saure Phosphatase, putativ	-1,06	-0,62	0,42	-0,47	-0,89	0,57	1,49
A_13_P239175	Serin/Threonin-Phosphatase, putativ	0,86	2,54	0,11	0,70	-0,06	1,21	-0,06
A_13_P400350	Serin/Threonin-Phosphatase, regulatorische Untereinheit	0,11	-0,10	0,09	0,00	1,04	0,31	0,49
Signalweiterleitung - Transkriptionsfaktoren								
A_13_P105570	B3-Transkriptionsfaktor	-0,38	0,06	1,11	-0,02	-0,25	0,10	0,35
A_13_P057231	B3-Transkriptionsfaktor	1,84	1,46	0,05	0,24	0,91	0,59	-0,20
A_13_P567134	bHLH Transkriptionsfaktor	1,47	0,63	0,07	-0,01	0,58	0,11	0,24
A_13_P397955	bHLH DNA-Bindedomäne-enthaltendes Protein	0,30	0,02	1,51	0,07	0,44	-0,32	0,13
A_13_P084621	bHLH DNA-Bindedomäne-enthaltendes Protein	0,02	0,12	1,36	-0,10	0,23	-0,56	0,19
A_13_P554779	bHLH Transkriptionsfaktor	1,25	0,48	-0,87	0,43	0,26	-0,43	0,40
A_13_P177819	bHLH Transkriptionsfaktor	1,75	1,89	-0,23	-0,13	-0,07	1,92	-0,34
A_13_P145215	bZIP Transkriptionsfaktor	1,14	0,72	0,29	0,30	0,09	0,50	0,34
A_13_P021631	bZIP Transkriptionsfaktor	-0,15	0,66	1,32	-0,52	-0,07	-0,45	0,08
A_13_P049116	HSF-Typ DNA-Bindedomäne-enthaltendes Protein	1,01	0,83	0,20	0,17	0,06	0,32	-0,28
A_13_P182659	HSF-Typ DNA-Bindedomäne-enthaltendes Protein	1,41	0,63	0,41	0,17	-0,11	0,00	-0,39
A_13_P110065	MADS-Box Protein	0,92	1,03	0,19	0,50	0,38	0,16	0,52
A_13_P158675	MYB Transkriptionsfaktor	1,53	1,07	0,32	0,24	0,59	0,33	0,11
A_13_P174985	MYB Transkriptionsfaktor	0,65	2,84	0,17	0,20	0,49	0,46	0,49
A_13_P402005	MYB Transkriptionsfaktor	-0,51	0,08	1,14	0,24	0,02	0,23	-0,18
A_13_P517529	MYB Transkriptionsfaktor	-0,21	1,27	0,09	0,25	0,07	0,87	0,14
A_13_P421415	NAC Transkriptionsfaktor	0,65	1,91	-0,27	-0,04	-0,54	0,25	0,55
A_13_P004176	NAC Transkriptionsfaktor	0,68	1,92	-0,31	-0,14	-0,53	0,12	0,46
A_13_P576509	PHD Transkriptionsfaktor	0,03	1,72	-0,31	0,53	0,16	1,28	-0,36
A_13_P497119	PHD-Transkriptionsfaktor	1,37	0,86	-0,02	0,22	0,35	0,80	-0,41
A_13_P075311	WRKY Transkriptionsfaktor	0,88	2,73	-0,16	0,35	-0,15	1,98	0,53
A_13_P151415	WRKY Transkriptionsfaktor	0,53	1,88	0,19	0,31	-0,73	1,15	0,00
A_13_P155985	Zinkfinger Transkriptionsfaktor	-0,86	-0,30	1,03	-0,07	-0,01	-0,14	0,02
A_13_P579614	Zinkfinger Transkriptionsfaktor	1,51	1,57	0,15	0,63	-0,04	0,43	-0,02
A_13_P408241	Zinkfinger Transkriptionsfaktor	0,65	1,37	-0,06	0,43	0,97	0,55	0,07
A_13_P226709	Zinkfinger Transkriptionsfaktor	0,69	1,82	0,26	-0,02	-0,16	1,08	-0,01
A_13_P165035	Zinkfinger Transkriptionsfaktor	0,91	2,16	0,07	0,56	0,99	1,07	-0,04
A_13_P038806	Zinkfinger Transkriptionsfaktor	0,64	1,56	-0,15	0,18	0,12	1,36	0,60
A_13_P150290	Zinkfinger Transkriptionsfaktor	2,40	2,63	-0,04	0,67	-0,05	1,95	-0,56
A_13_P200164	Zinkfinger Transkriptionsfaktor	-0,21	0,04	0,35	0,13	-0,32	-0,17	1,05
A_13_P017271	Zinkfinger Transkriptionsfaktor, stressassoziiert	0,82	0,38	0,19	0,24	0,55	0,44	1,16
A_13_P021971	Zinkfinger Transkriptionsfaktor	-0,05	0,20	-0,51	0,07	0,13	0,39	1,18
A_13_P169420	Zinkfinger Transkriptionsfaktor	0,05	0,29	0,07	0,27	0,01	0,37	1,17
A_13_P321957	Zinkfinger Transkriptionsfaktor	0,23	0,27	0,09	0,24	1,24	0,44	0,07
A_13_P357567	AP2/EREBP Transkriptionsfaktor	0,19	0,04	0,46	0,28	0,74	0,68	2,50
A_13_P328062	AP2/EREBP Transkriptionsfaktor	0,04	-0,14	0,35	-0,03	0,18	0,48	2,49
A_13_P359547	AP2/EREBP Transkriptionsfaktor	-0,11	-0,13	0,03	0,07	1,47	0,40	0,34
A_13_P055001	bHLH Transkriptionsfaktor	0,04	-0,03	0,00	0,14	0,03	0,94	1,16
A_13_P247228	bHLH Transkriptionsfaktor	-0,01	-0,36	-0,23	-0,01	2,13	0,36	-0,93
A_13_P157295	bZIP Transkriptionsfaktor	-0,18	0,06	0,27	0,20	1,54	-0,07	-0,28
A_13_P152875	Homeobox-Transkriptionsfaktor	0,11	-0,02	-0,06	0,09	1,08	0,09	0,11
A_13_P478150	Homeobox-Transkriptionsfaktor	0,36	0,15	0,17	-0,14	1,15	0,34	0,41
A_13_P075391	MADS-Box Transkriptionsfaktor	0,31	0,43	-0,79	-0,06	0,60	0,37	1,01
A_13_P361297	MADS-Box Transkriptionsfaktor	-0,17	0,49	0,27	-0,79	-0,32	-0,70	1,70
A_13_P000236	MADS-Box Transkriptionsfaktor	-0,26	-0,37	-0,12	0,01	1,48	0,19	1,27
A_13_P396115	MYB Transkriptionsfaktor	0,07	0,56	-0,24	0,15	0,18	0,15	1,11
A_13_P156630	MYB Transkriptionsfaktor	-0,09	0,73	-0,58	-0,21	-0,34	1,37	0,33
A_13_P152705	MYB Transkriptionsfaktor	0,38	-0,19	-0,97	0,27	1,02	-0,19	-0,50
A_13_P341882	NAC Transkriptionsfaktor	-0,27	-0,75	-0,47	0,19	1,76	0,49	0,07
Signalweiterleitung anderes								
A_13_P416840	Nitratreduktase	-0,16	1,06	2,06	0,07	1,18	-0,63	0,24
A_13_P247903	Trehalose-6-phosphat Synthase	1,06	0,66	-0,15	-0,15	0,15	1,20	-0,40
A_13_P125685	Trehalosephosphat Phosphatase	1,15	1,21	0,19	0,20	-0,64	0,25	0,10

Sequenz-ID	Annotation	Maternale Fraktion			Filiale Fraktion			
		7DAF	10DAF	14DAF	7DAF	10DAF	14DAF	20DAF
A_13_P056101	Trehalosephosphat Phosphatase	-0,33	-0,61	1,00	-0,12	1,08	0,26	0,36
A_13_P353617	Guanylatcyclase	0,89	1,07	0,04	0,20	0,18	0,51	-0,19
A_13_P450028	Guanylatcyclase	0,95	1,24	0,05	0,29	0,33	0,57	-0,19
A_13_P280809	Homolog zu AtMFT	0,57	-0,51	0,12	-0,11	1,57	0,56	0,40
Glykolyse								
A_13_P273269	Phosphofruktokinase	0,12	-0,01	-0,08	-0,01	1,07	-0,20	0,84
Speicherung und Remobilisierung								
A_13_P303717	Saccharose Synthase	0,37	-0,02	0,08	0,05	1,52	0,40	0,25
A_13_P122235	Stärkeinitiiierendes Protein	0,51	0,50	-0,55	0,22	0,34	1,10	0,38
A_13_P081986	Stärkeverzweigendes Enzym	-0,31	-0,36	-0,36	-0,29	1,12	-0,17	0,17
A_13_P289797	Limit Dextrinase	0,09	0,09	0,08	0,15	1,13	0,44	0,55
A_13_P000166	α-Amylase AMY3	-0,08	-0,02	0,33	0,07	1,02	-0,43	-0,33
A_13_P346212	β-Amylase BAM1	0,21	-0,65	-1,24	0,19	2,43	0,15	0,18
A_13_P121089	β-Amylase BAM1	0,41	-0,48	-1,14	0,13	2,51	0,07	0,00
A_13_P366907	β-Amylase BAM1	0,50	-0,42	-1,13	0,19	2,46	0,06	0,28
A_13_P006606	β-Amylase BAM1	0,18	-0,94	-1,09	0,12	2,55	-0,03	0,02
A_13_P229694	β-Amylase BAM1	0,23	-1,13	-1,34	0,02	2,60	0,01	0,14
A_13_P275664	β-Amylase BAM1	-0,08	-0,93	-1,05	-0,16	2,23	-0,17	0,17
A_13_P281219	β-Amylase BAM1	-0,07	-1,45	-1,28	0,18	2,21	-0,17	0,11
A_13_P236194	β-Amylase BAM1	0,38	-1,10	-1,21	0,41	2,05	-0,41	-0,03
A_13_P578614	β-Amylase BAM1	0,12	-0,35	-1,24	0,43	2,22	-0,33	0,11
A_13_P230644	β-Amylase BAM1	0,39	-0,65	-1,14	-0,20	2,20	-0,20	0,11
A_13_P344947	β-Amylase BAM1	0,33	-0,65	-1,32	0,07	2,15	-0,49	0,17
A_13_P053816	β-Amylase BAM2	-0,13	-0,15	1,47	-0,96	-0,76	-0,41	0,50
A_13_P303162	β-Amylase BAM2	0,10	0,06	1,23	-0,68	-0,39	-0,16	0,02
A_13_P229794	β-Amylase BAM2	0,25	0,20	1,59	-0,72	-0,47	-0,38	0,97
A_13_P258482	β-Amylase BAM2	0,25	0,18	1,69	-0,87	-0,77	-0,48	0,57
A_13_P303677	Methionin Synthase	0,26	-0,64	0,16	-0,15	1,05	0,27	0,31
A_13_P355872	Asparagin Synthetase	0,03	-0,10	-0,92	-0,04	2,39	-0,28	0,09
A_13_P355652	Asparagin Synthetase	-0,06	-0,03	-0,90	0,15	1,51	-0,13	0,00
A_13_P021211	Asparagin Synthetase	0,01	-0,07	-0,43	-0,05	1,14	-0,37	0,06
A_13_P135200	Asparagin Synthetase	0,02	0,08	-0,42	-0,05	1,15	-0,24	0,29
A_13_P490690	Dihydroxysäure-Dehydratase	0,18	0,27	0,25	-0,18	1,03	0,20	0,68
A_13_P047096	Aminotransferase	-0,47	-0,28	0,23	0,51	2,60	-0,01	0,18
A_13_P420280	Pyridoxin-Biosynthese Protein	0,07	0,21	0,29	0,24	1,31	0,12	0,24
A_13_P285219	Pyridoxin-Biosynthese Protein	0,16	0,20	0,07	-0,03	1,11	0,27	0,37
A_13_P316582	Anthranilat-Phosphoribosyltransferase	-0,03	-0,30	0,07	0,04	1,15	0,38	0,11
A_13_P213884	Anthranilat-Phosphoribosyltransferase	-0,03	0,02	0,08	0,06	1,12	0,18	0,34
A_13_P115155	Glutamate decarboxylase	0,34	1,49	0,07	0,60	0,31	1,02	-0,94
A_13_P155355	L-Asparaginase	0,04	1,04	0,26	0,00	1,51	-0,34	0,56
A_13_P651993	Hordein B	-1,01	-0,96	-0,81	1,63	1,03	0,17	-0,04
A_13_P643214	Hordein B	-0,39	-0,78	-0,63	0,98	1,34	0,11	-0,07
A_13_P631917	Hordein B	-0,75	-0,74	-0,82	1,02	1,24	0,13	-0,10
A_13_P641604	Hordein B	-0,07	-0,65	-0,68	0,92	1,20	0,13	0,07
A_13_P588554	Hordein C	-0,33	-1,10	-0,55	0,20	1,41	-0,03	-0,45
A_13_P075891	Hordein D	0,24	-0,18	-0,39	-0,07	1,30	-0,03	-0,17
A_13_P125730	Hordein D	-0,03	0,03	0,45	0,02	1,70	0,81	0,11
A_13_P642609	γ-Hordein	-0,55	-0,36	-0,34	0,94	1,23	0,14	-0,34
A_13_P604643	γ-Hordein	0,15	-0,13	-0,19	0,40	1,11	0,15	-0,11
A_13_P120960	Hordein	-0,39	0,11	0,47	0,43	1,07	0,36	0,45
A_13_P440711	Samenspeicherglobulin	0,00	-0,43	-0,48	0,14	1,42	0,43	-0,43
A_13_P439836	Samenspeicherglobulin	-0,30	-0,54	-0,58	0,27	1,28	0,40	-0,47
A_13_P441396	Samenspeicherglobulin	-0,44	-0,70	-0,74	0,05	1,03	-0,04	-0,30
A_13_P353262	Globulin	-0,32	-0,98	-0,95	0,16	1,83	0,10	0,17
A_13_P565319	Globulin	0,07	0,28	0,24	0,11	1,39	0,23	1,00
LEA								
A_13_P276139	Em-Protein	0,85	0,15	-0,04	0,33	-0,11	0,11	1,52
A_13_P558299	Em-Protein	1,46	0,65	-0,14	0,05	-0,31	0,69	1,72

Sequenz-ID	Annotation	Maternale Fraktion			Filiale Fraktion			
		7DAF	10DAF	14DAF	7DAF	10DAF	14DAF	20DAF
A_13_P257787	Em-Protein	1,25	0,22	0,01	0,04	0,31	0,94	1,64
A_13_P414640	Em-Protein	-0,13	0,06	-0,57	-0,03	0,59	-0,38	1,10
A_13_P118135	Em-Protein	1,72	0,47	-0,04	0,05	1,29	0,96	1,45
A_13_P255937	Em-Protein	-0,07	-0,23	-0,11	-0,01	1,14	-0,37	0,70
A_13_P545884	Dehydrin	0,15	-1,02	-0,98	0,02	1,34	0,00	0,62
A_13_P433061	Dehydrin	0,26	-0,44	-0,22	-0,10	0,32	-0,31	1,39
A_13_P267027	Dehydrin	0,54	1,25	0,25	0,07	-0,04	0,35	1,01
A_13_P437861	LEA-Protein Klasse 3/4	0,63	0,50	0,27	0,01	0,16	0,01	1,78
A_13_P125070	LEA-Protein Klasse 3/4	0,28	0,29	0,21	0,61	1,30	0,06	2,20
Protease-Inhibitoren								
A_13_P137470	Bowman-Birk Trypsininhibitor	0,28	0,12	-0,07	0,03	-0,02	-0,03	1,49
A_13_P529049	Bowman-Birk Trypsininhibitor	-0,01	0,06	0,52	-0,02	0,05	1,11	1,01
A_13_P389702	Subtilisin-Chymotrypsin-Inhibitor	0,16	-0,10	-0,84	0,11	1,33	-0,48	-0,24
A_13_P028976	Subtilisin-Chymotrypsin-Inhibitor	0,24	-0,77	-0,08	0,13	3,85	-0,01	0,07
A_13_P127880	Proteaseinhibitor	-0,86	0,63	0,13	0,00	1,46	0,13	0,45
A_13_P141890	Proteaseinhibitor	0,16	-0,61	-1,07	0,20	2,93	0,41	-0,05
A_13_P442873	Proteaseinhibitor	-0,31	-0,04	0,87	0,76	1,79	0,39	0,54
A_13_P276559	Serpin	0,14	-0,08	-1,19	-0,25	3,33	0,33	-0,11
A_13_P366922	Serpin	0,30	0,09	-1,64	0,05	4,51	0,38	0,02
A_13_P469953	Serpin	0,45	-0,38	-1,67	0,05	4,75	-0,10	-0,15
A_13_P075631	Serpin	0,58	-0,41	-1,75	0,04	4,74	-0,28	-0,17
A_13_P442479	Serpin	-0,14	-0,79	-1,17	0,16	1,49	-0,11	-0,12
A_13_P211784	Serpin	-0,07	-0,88	-0,88	0,84	1,80	0,31	-0,32
A_13_P116195	α-Amylase/Trypsin-Inhibitor CMa	0,02	-0,05	0,04	-0,04	1,05	0,07	0,59
A_13_P342312	α-Amylase/Trypsin-Inhibitor CMd	-0,08	-0,13	-0,03	0,18	1,74	-0,41	1,56
A_13_P275169	α-Amylase/Trypsin-Inhibitor CMd	0,03	-0,01	0,01	0,02	1,10	-0,38	1,12
A_13_P281144	α-Amylase/Trypsin-Inhibitor CMd	0,09	0,00	-0,02	-0,29	1,27	-0,09	0,68
Proteinabbau								
A_13_P339037	Proteasom α-Untereinheit	0,08	-0,22	-0,19	0,08	2,94	-0,38	2,03
A_13_P398461	E3-Ubiquitinligase	0,48	-0,20	-0,38	-0,04	1,40	0,78	0,17
A_13_P299302	Ubiquitin-ähnliches Protein	0,02	0,18	0,15	0,22	1,01	0,24	0,21
A_13_P192514	F-Box-Interaktionsdomäne enthaltendes Protein	-0,05	-0,16	0,15	0,08	1,26	0,19	-0,02
A_13_P361347	S-RNase bindendes Protein	-0,19	-0,21	-0,74	0,31	1,97	0,24	-0,09
A_13_P199094	Ubiquitin-ähnliches Protein	0,92	1,14	-0,33	0,17	2,14	0,43	-0,26
A_13_P104375	RING-H2 Finger Protein	-0,02	-0,17	-0,40	-0,12	0,00	1,02	-0,49
A_13_P193644	Protein mit F-Box Domäne	0,26	0,36	-0,40	0,21	-0,07	1,07	0,15
A_13_P119325	E2 Ubiquitin-konjugierendes Enzym	1,12	0,53	0,33	0,03	-0,41	0,12	-0,08
A_13_P118410	Ubiquitin-ligierendes Protein	1,41	0,75	0,37	0,61	0,12	0,42	-0,39
A_13_P162980	Arm-repeat enthaltendes Protein	0,88	1,20	0,07	0,29	-0,25	0,65	0,38
A_13_P057831	Arm-repeat enthaltendes Protein	1,58	1,54	0,05	0,48	0,58	0,70	-0,05
A_13_P041951	RING-H2-Zinkfinger-Protein ATL2L	0,90	3,48	0,11	0,45	-0,50	2,13	1,31
A_13_P027136	RING-H2-Zinkfinger-Protein	-0,23	1,61	-0,37	-0,04	0,25	0,31	0,15
A_13_P170075	F-box Proteinfamilie, AtFBX13-ähnlich	0,31	1,17	0,72	0,13	0,22	0,11	0,29
A_13_P103750	Subtilisin-ähnliche Protease	-0,06	0,02	1,21	0,05	0,10	0,04	-0,07
A_13_P479025	Clp-Protease Untereinheit, ATP-bindend	0,13	-0,05	1,04	0,09	-0,05	-0,13	0,93
Transport								
A_13_P224114	Aminosäure-Transporter, putativ	0,66	0,51	0,07	0,05	0,72	1,07	0,20
A_13_P224099	Aminosäure-Transporter, putativ	0,39	0,40	0,12	0,02	0,76	1,07	0,13
A_13_P072101	Aminosäure-Transporter	0,50	0,42	0,14	0,06	0,58	1,03	0,31
pH-Homöostase								
A_13_P085246	vacuolare H ⁺ -Pyrophosphatase	0,07	-0,19	0,08	-0,04	1,11	0,29	0,20
A_13_P345727	vacuolare H ⁺ -ATPase	-0,07	-0,18	0,02	0,07	1,21	0,08	0,50
A_13_P165340	Plasmamembran H ⁺ -ATPase	-0,06	0,34	1,03	-0,42	-0,68	-0,12	-0,03
Stress,- allgemein								
A_13_P557344	Transposon-Protein	0,10	0,15	0,12	0,12	0,53	-0,11	1,03
A_13_P486720	OsTNP2-ähnliches transposables Element	-0,03	-0,09	0,06	0,10	1,57	0,69	0,66
A_13_P532424	Retrotransposonprotein, Unterklasse Ty1-Copia	-0,16	0,03	-0,40	0,17	-0,63	1,19	1,00
A_13_P412450	Germin-ähnliches Protein	-0,65	0,44	0,01	-0,10	2,07	-0,08	0,51

Sequenz-ID	Annotation	Maternale Fraktion			Filiale Fraktion			
		7DAF	10DAF	14DAF	7DAF	10DAF	14DAF	20DAF
A_13_P170420	Anthocyan-5-Acyltransferase	-0,86	-0,37	-0,16	0,72	1,48	0,29	0,32
A_13_P134400	S-RNase-ähnlich	0,02	-0,14	0,88	2,33	0,18	0,24	0,70
A_13_P010366	S-RNase-ähnlich	0,16	-0,17	0,97	2,74	0,17	0,36	0,75
A_13_P347992	Universelles Stressprotein	0,33	0,05	0,14	0,06	1,71	0,36	0,64
Stress, biotisch								
A_13_P468433	Thaumatococcus-ähnliches Protein HvTLP4	0,01	0,03	0,05	0,09	1,03	0,24	0,03
A_13_P113435	Thaumatococcus-ähnliches Protein HvTLP5	1,15	1,17	-1,14	-0,15	1,35	-0,76	0,39
A_13_P113820	Thaumatococcus-ähnliches Protein HvTLP5	1,27	0,94	-0,89	-0,08	1,14	-0,84	0,29
A_13_P262527	Thaumatococcus-ähnliches Protein	0,47	-0,74	0,53	0,15	1,47	0,21	0,43
A_13_P171025	Thaumatococcus-ähnliches Protein	0,22	0,21	0,66	0,05	-0,23	0,44	1,10
A_13_P345907	Chitinase	-0,04	-0,02	-0,14	0,01	1,25	-0,71	1,14
A_13_P300637	Chitinase	0,24	-0,35	0,13	0,29	1,46	0,19	0,57
A_13_P311332	Chitinase	0,02	-0,06	0,04	0,17	1,29	0,24	0,73
A_13_P087806	Nematoden-Resistenzprotein	0,24	1,97	-0,51	0,42	1,02	0,96	-0,60
A_13_P460328	Nematoden-Resistenzprotein	0,35	1,79	-0,41	0,07	1,02	0,59	-0,39
A_13_P022546	Frühes Pilzelicitor-Protein	0,85	3,13	-0,23	0,63	-0,88	1,95	-0,10
A_13_P042686	Schwarzrost-Resistenzprotein HvRpg1	0,05	0,15	0,17	0,05	1,65	0,18	0,80
A_13_P112905	γ-Hordothionin	0,26	-0,06	0,22	0,02	1,54	0,26	0,64
A_13_P029366	NBS-LRR-Typ Resistenzprotein	0,01	-0,31	0,00	0,08	1,27	-0,08	0,38
A_13_P157665	NBS-LRR-Typ Resistenzprotein	0,08	-0,59	0,08	-0,12	1,45	0,41	-0,28
A_13_P180949	Linalool-Synthase	-0,29	0,07	-0,56	-0,01	1,79	0,37	0,19
A_13_P193504	Xylanase-Inhibitor	-0,02	-0,02	0,03	0,70	1,30	0,21	0,44
A_13_P099855	NADPH HC-Toxin Reduktase, putativ	0,04	0,00	0,10	0,00	1,25	-0,17	0,08
A_13_P578224	Homolog zu ZmEBE-1, antimikrobiell	0,87	-0,32	0,61	0,02	0,19	0,24	1,08
A_13_P420010	Homolog zu ZmEBE-1, antimikrobiell	0,75	-0,45	0,54	-0,04	0,12	0,19	1,38
A_13_P524969	Homolog zu ZmEBE-1, antimikrobiell	0,73	-0,14	0,46	0,00	0,10	0,18	1,20
A_13_P552694	Krankheitsassoziiertes Protein	-0,07	-0,12	0,05	-0,01	-0,21	-0,01	1,02
A_13_P471778	HR-läsionsinduzierendes Protein	0,00	-0,18	1,86	-0,19	-0,10	-0,18	0,15
A_13_P080216	HvSNAP-34	0,43	1,03	0,02	0,38	0,14	0,56	-0,21
A_13_P545182	HvSNAP-34	0,67	1,24	0,17	0,57	0,24	0,69	-0,24
A_13_P029016	Harpininduziertes Gen	0,62	1,04	-0,20	0,54	0,39	0,73	-0,48
A_13_P013531	Agmatin-Cumaroyltransferase	0,95	1,31	1,31	0,05	-0,04	0,27	0,65
Stress, abiotisch								
A_13_P576869	Austrocknungsresponsives Protein	0,81	1,41	0,01	-0,07	0,52	0,54	0,30
A_13_P126945	Galactinolsynthase	0,15	-0,17	-0,70	0,00	0,00	1,83	0,15
A_13_P499179	Galactinolsynthase	0,07	-0,23	-0,66	0,06	0,05	1,77	0,05
A_13_P126930	Galactinolsynthase	0,09	0,04	-0,51	-0,14	0,01	1,72	0,31
A_13_P545769	Galactinolsynthase	0,16	-0,13	0,62	-0,02	-0,25	1,77	-0,42
A_13_P118595	Methioninsulfoxid-Reduktase	0,08	0,06	0,06	-0,02	0,15	0,15	1,31
A_13_P183409	2-Alkenalreduktase	0,41	0,13	0,18	0,63	-0,15	1,40	0,59
A_13_P221299	Hypoxie-induziertes Protein	0,58	1,24	-0,09	0,42	0,31	0,07	-0,17
A_13_P347892	Salztoleranz-Protein	-0,29	-0,18	-0,02	0,03	1,20	-0,09	0,92
A_13_P183214	Violaxanthin-Deepoxidase	0,12	-0,11	0,24	0,14	1,15	0,12	0,49
A_13_P166100	SPX-Domäne enthaltendes Protein	0,35	1,23	-0,04	0,36	-0,31	0,51	-0,32
A_13_P113260	Faserprotein	0,61	1,08	-0,29	0,44	0,23	0,90	-0,05
A_13_P096910	Faserprotein	1,04	1,22	-0,07	0,51	0,46	0,83	-0,02
A_13_P004571	Gigantea-ähnliches Protein	0,06	1,35	0,39	0,81	-0,02	0,28	0,38
A_13_P518524	Kälteinduzierbares Protein, AtLTI6B-Homolog	0,58	1,26	0,28	0,42	0,11	0,15	-0,25
A_13_P572584	Kälteschock-Protein	0,07	1,27	0,12	0,03	-0,42	0,54	0,33
A_13_P116970	Kälte- und salzresponsives Protein	1,16	0,59	0,48	0,23	-0,49	0,07	0,08
A_13_P312022	Kältereguliertes Protein	0,08	-0,09	0,11	-0,07	1,38	0,26	0,52
A_13_P129805	Kältereguliertes Protein	-0,82	-0,08	0,10	-0,41	-0,72	-0,90	1,59
A_13_P031231	Kältereguliertes Protein	-0,83	-0,11	0,19	-0,43	-0,68	-0,89	1,67
A_13_P418315	Kälte- und salzresponsives Protein	-0,52	-0,49	-0,16	-0,04	0,88	-0,72	1,07
A_13_P113775	Hv Ferritin1	0,85	1,32	0,40	0,33	-0,49	0,22	-0,07
A_13_P102415	Spl7-Protein, Regulator der Kupfer-Homöostase	-0,10	0,10	-0,34	-0,06	0,03	0,22	1,42
A_13_P077351	Farnesyliertes Protein 1 - <i>H. vulgare</i>	0,41	-0,12	-0,60	-0,19	-0,15	1,03	-0,08
A_13_P095475	Kupferchaperon-ähnliches Protein	0,18	-0,13	-0,17	0,23	1,24	-0,49	0,45

Sequenz-ID	Annotation	Maternale Fraktion			Filiale Fraktion			
		7DAF	10DAF	14DAF	7DAF	10DAF	14DAF	20DAF
A_13_P234854	Eisendefizienz-Protein	-0,05	0,33	-0,44	-0,34	1,26	0,08	0,54
A_13_P124540	Metallothionein-ähnliches Protein	0,08	0,01	0,07	-0,32	-0,59	-0,23	1,55
A_13_P122520	Metallothionein-ähnliches Protein	-0,22	0,13	0,69	0,60	1,06	-0,45	0,59
A_13_P136245	HSP101	1,53	1,13	0,28	0,02	0,77	-0,29	0,00
A_13_P143705	HSP101	0,77	1,11	0,84	0,03	0,66	0,48	-0,40
A_13_P117795	HSP70	0,99	1,11	1,22	0,45	0,01	0,29	-0,28
A_13_P212059	HSP70	1,13	3,53	1,91	0,86	0,21	-1,27	-1,33
A_13_P083366	HSP70	1,19	3,59	1,85	0,87	0,04	-1,37	-1,24
A_13_P198754	HSP70	1,69	1,40	0,39	0,57	0,99	0,44	-0,74
A_13_P243452	HSP70	0,36	1,22	0,51	0,50	0,38	0,67	-0,93
A_13_P019036	HSP70	0,60	1,58	0,18	0,58	0,33	0,64	-0,48
A_13_P133625	HSP70	0,25	1,42	0,18	0,34	0,14	0,58	-0,25
A_13_P179129	HSP70	0,94	1,84	-0,20	0,37	0,36	-0,05	-0,46
A_13_P069931	HSP70	1,15	2,70	0,13	0,57	0,70	-0,41	-0,43
A_13_P141825	HSP70	1,67	0,72	-0,05	0,25	0,14	0,30	-0,07
A_13_P426561	HSP70	0,87	1,10	0,88	-0,16	-0,11	0,29	-0,43
A_13_P116635	HSP70	1,07	1,41	0,76	-0,13	-0,34	0,31	-0,40
A_13_P171580	HSP70	0,74	2,99	0,19	0,90	1,01	-0,24	-0,33
A_13_P147720	HSP70	-0,30	1,36	-0,05	0,14	-0,37	2,13	0,14
A_13_P548249	HSP70	0,15	1,02	0,15	0,18	0,02	0,69	-0,27
A_13_P357492	HSP70	-0,55	0,79	-0,27	0,02	0,00	1,56	0,19
A_13_P113055	HSP40	1,45	1,11	0,76	0,06	0,51	0,30	-0,87
A_13_P089756	HSP40	0,62	1,17	0,68	0,45	0,30	0,63	-0,76
A_13_P070001	HSP40	0,52	1,47	0,07	0,39	0,59	0,39	0,21
A_13_P124785	sHSP	1,58	2,04	1,06	0,80	0,89	0,53	-0,54
A_13_P133660	sHSP	0,31	1,18	0,48	0,27	-0,14	0,21	-0,53
A_13_P459783	sHSP	2,06	1,75	1,61	0,50	0,70	1,20	-0,87
A_13_P415165	sHSP	2,73	1,55	1,51	-0,15	0,98	0,60	-1,00
A_13_P234144	sHSP	2,36	1,82	1,16	0,67	0,81	0,71	-0,97
A_13_P124770	sHSP	2,92	1,91	1,64	0,00	0,92	0,53	-0,84
A_13_P097810	sHSP	0,12	3,40	1,41	0,59	1,85	-0,12	-0,60
A_13_P057471	sHSP	0,61	5,00	0,75	0,66	1,01	-1,12	-0,58
A_13_P573399	sHSP	1,83	1,66	1,02	0,72	-0,41	-0,01	-0,55
A_13_P171850	sHSP	0,43	5,46	1,03	0,64	1,30	-1,51	-0,52
A_13_P010721	sHSP	0,45	0,63	1,55	0,53	0,34	0,50	-0,13
A_13_P116480	sHSP	1,02	1,53	1,02	0,11	-0,35	-0,33	-0,48
A_13_P127405	sHSP	0,55	1,36	1,93	0,18	0,39	0,36	-0,47
A_13_P082076	sHSP	1,77	1,57	1,00	0,46	-0,11	0,09	-0,47
A_13_P116310	sHSP	1,41	1,27	0,95	0,25	-0,47	-0,44	-0,42
A_13_P402415	sHSP	0,62	2,24	2,08	1,39	0,21	0,41	-0,41
A_13_P127415	sHSP	0,93	3,04	3,17	0,58	0,55	0,42	-0,38
A_13_P477935	sHSP	1,84	1,48	1,02	0,49	-0,22	0,04	-0,35
A_13_P077871	sHSP	0,83	2,59	1,73	1,19	0,73	0,52	-0,32
A_13_P126775	sHSP	0,90	2,42	1,64	1,11	0,68	0,50	-0,32
A_13_P244385	sHSP	0,04	2,34	1,15	1,19	1,81	0,06	-0,31
A_13_P116485	sHSP	1,23	1,49	1,19	0,14	-0,56	-0,04	-0,28
A_13_P127420	sHSP	0,58	1,50	2,54	0,63	0,33	0,65	-0,19
A_13_P097785	sHSP	1,08	1,37	1,02	0,15	-0,56	-0,05	-0,18
A_13_P126760	sHSP	-0,16	2,05	0,86	0,99	1,70	-0,32	-0,17
A_13_P147490	sHSP	2,97	1,23	0,43	0,50	-0,09	-0,04	-0,12
A_13_P127410	sHSP	3,19	1,14	0,14	0,60	-0,11	0,03	-0,09
A_13_P441141	sHSP	0,91	2,77	2,82	0,77	0,63	0,71	-0,02
A_13_P250460	sHSP	0,21	0,85	1,54	0,37	0,40	0,53	-0,14
A_13_P056056	HSF	2,24	1,81	0,33	0,53	0,24	-0,50	0,07
A_13_P546594	Peptidylprolyl-Isomerase	0,52	1,95	1,24	0,14	0,67	0,52	-0,65
A_13_P424081	Peptidylprolyl-Isomerase	0,70	1,29	0,54	0,51	0,33	0,28	-0,60
A_13_P089741	Peptidylprolyl-Isomerase	0,31	1,02	0,63	0,51	0,11	0,22	-0,48
A_13_P208939	Peptidylprolyl-Isomerase	0,84	1,03	0,21	0,34	0,09	0,59	-0,92

Sequenz-ID	Annotation	Maternale Fraktion			Filiale Fraktion			
		7DAF	10DAF	14DAF	7DAF	10DAF	14DAF	20DAF
Peroxidasen								
A_13_P001276	Peroxidase HvBP1	-0,76	-1,00	-0,80	0,33	2,19	0,43	-0,34
A_13_P235804	Peroxidase HvBP1	-0,80	-1,25	-0,82	0,30	1,82	0,18	-0,23
A_13_P091620	Peroxidase, Klasse III	-0,13	-0,83	-0,58	-0,02	1,34	-0,58	0,42
A_13_P460553	Peroxidase, Klasse III	0,04	-0,08	0,26	-0,30	1,70	0,19	-0,75
A_13_P526669	Peroxidase, Klasse III	0,81	2,14	-0,22	0,26	1,47	0,47	-0,60
A_13_P416320	Putative Peroxidase	-0,25	0,21	-0,15	-0,06	1,14	-0,58	0,09
A_13_P180079	bifunktionelle Katalase-Peroxidase	0,07	0,09	0,00	0,01	1,17	0,24	0,69
A_13_P146820	Putative Peroxidase	0,59	0,08	-0,13	-0,19	-0,47	1,46	0,35
A_13_P478145	Peroxidase	-0,32	-0,80	2,14	-0,14	0,70	-0,05	0,37
A_13_P224489	Peroxidase	0,43	0,20	1,23	-0,09	-0,46	-0,61	0,54
A_13_P482900	Ascorbatperoxidase	1,30	1,00	0,22	0,74	0,80	0,35	-0,75
A_13_P459303	Peroxidase, Klasse III	1,14	0,47	0,08	0,10	-0,52	-0,09	-0,06
Glutathion-System								
A_13_P276484	Glutathion-S-transferase	-0,18	0,01	0,00	0,05	1,23	-0,05	0,19
A_13_P373842	Glutathion-S-transferase	0,34	0,19	0,03	0,30	1,10	0,44	0,33
A_13_P133910	Glutathion-S-transferase	-0,47	-0,20	-0,04	0,13	0,34	-0,52	1,06
A_13_P086866	Glutathion-S-transferase	-0,03	0,13	0,06	0,45	0,56	0,07	1,10
A_13_P011476	Glutathion-S-transferase	1,09	1,80	1,89	0,77	0,12	0,13	0,00
A_13_P137505	Glutathion-S-transferase	2,09	2,83	2,66	1,03	0,57	0,13	0,12
A_13_P137500	Glutathion-S-transferase	1,44	2,04	2,31	0,71	0,06	0,11	0,06
A_13_P000471	Glutathion-S-transferase	0,34	0,68	1,05	-0,06	-0,04	0,02	0,47
A_13_P117670	Glutathion-S-transferase	0,00	0,49	1,21	-0,09	-0,31	0,02	0,49
A_13_P410287	Glutathion-S-transferase	0,70	0,66	1,25	0,07	-0,14	0,07	0,46
Sekundärmetabolismus								
A_13_P075091	Chalconsynthase	-0,35	0,60	1,22	0,27	0,00	-0,35	-0,17
A_13_P395895	Isoflavonreductase	0,65	-0,56	1,29	-0,17	-0,02	-0,17	-0,31
A_13_P025856	Isoflavonreductase	0,67	-0,66	1,38	-0,20	0,08	-0,34	-0,49
A_13_P563194	Flavonolsynthase	0,79	1,93	2,09	0,20	-0,03	-0,40	0,64
A_13_P246932	Ferulat-5-Hydroxylase	1,19	1,32	0,81	0,15	-0,54	-0,09	-0,09
A_13_P230504	4-Cumarat-CoA-Ligase	0,24	1,04	0,61	0,55	0,07	0,01	0,14
A_13_P079916	Phenylalanin-Ammonium-Lyase	-0,21	1,18	-0,14	0,46	0,07	0,63	-0,29
A_13_P092220	Cinnamoyl-CoA Reduktase	0,11	0,52	0,88	0,23	0,72	-0,17	1,15
Mitose								
A_13_P014441	Cyclin A1	-0,79	-0,55	1,85	0,03	-0,17	-0,30	0,24
A_13_P575509	Cyclin A1	-1,00	-0,65	1,64	-0,43	-0,23	-0,63	0,40
A_13_P158220	Cyclin A2	0,40	0,28	1,34	0,26	-0,06	0,04	0,30
A_13_P190154	CyclinB (G2/Mitose-spezifisch)	-0,17	-0,08	1,14	0,03	-0,43	-0,06	0,19
A_13_P103535	CyclinB (G2/Mitose-spezifisch)	0,04	0,23	1,05	0,36	-0,07	0,14	0,17
A_13_P442798	CyclinB (G2/Mitose-spezifisch)	-0,92	-0,01	1,39	0,17	0,10	0,43	0,47
A_13_P179399	CyclinB (G2/Mitose-spezifisch)	-0,99	-0,25	1,08	0,00	-0,58	0,25	0,28
A_13_P037721	Mitotic checkpoint-Protein	-0,50	-0,24	1,02	0,03	0,11	0,20	0,57
A_13_P081141	AtMCM3 Homolog, DNA-Replikationsfaktor	-0,75	-0,42	1,17	-0,26	-0,33	-0,47	-0,05
A_13_P233144	AtMCM3 Homolog, DNA-Replikationsfaktor	-0,81	-0,33	1,26	-0,24	-0,31	-0,40	-0,12
A_13_P141665	AtMCM4 Homolog, DNA-Replikationsfaktor	0,06	0,04	1,01	0,17	-0,08	-0,15	-0,20
A_13_P097365	DNA-Topoisomerase II	-0,95	-0,25	2,16	-0,08	-0,37	0,18	0,16
A_13_P185289	Poly-ADP-Ribose-Polymerase, AtPARP1-Homolog	0,71	0,53	1,14	0,24	0,30	0,17	-0,36
A_13_P180479	Faciata-ähnliches Protein	-0,28	0,08	1,50	0,16	0,16	0,02	-0,12
A_13_P149755	Chromatin-Assemblierungsfaktor	-0,32	-0,31	1,37	-0,11	-0,01	-0,18	0,56
A_13_P014546	SMC2 Protein, Kondensin	-0,18	-0,16	1,32	0,09	-0,30	-0,31	-0,07
A_13_P104890	Kondensin Untereinheit	-0,89	-0,42	1,76	-0,09	-0,18	0,07	0,25
A_13_P106570	Phragmoplast-orientierendes Kinesin	-0,68	0,11	1,38	0,21	0,16	0,49	-0,30
A_13_P170815	Phragmoplast-assoziiertes kinesinähnliches Protein	-0,91	-0,47	1,46	-0,29	-0,26	-0,19	0,06
A_13_P551234	Phragmoplast-assoziiertes kinesinähnliches Protein	-0,73	0,04	1,03	0,04	-0,41	0,14	0,10
A_13_P564254	Kinesin, schwere Kette	-0,93	-0,10	1,74	0,28	0,14	0,36	-0,05
A_13_P203734	Protein aus der Dynaminfamilie	-0,56	-0,07	1,30	0,19	-0,05	0,33	0,22
A_13_P164410	Homolog zu AtNPK1 MAPKKK	0,13	3,05	1,04	0,71	0,05	1,67	1,24
A_13_P089961	Tubulin	0,09	0,14	1,06	0,16	0,21	0,12	0,11

Sequenz-ID	Annotation	Maternale Fraktion			Filiale Fraktion			
		7DAF	10DAF	14DAF	7DAF	10DAF	14DAF	20DAF
A_13_P212609	Kernteilungsprotein	-0,39	-0,05	1,05	-0,11	-0,73	-0,11	0,39
A_13_P069671	Wachstumsregulierender Faktor	0,35	1,47	-0,30	0,37	0,05	0,63	0,35
A_13_P317087	LOB-Domäne enthaltendes Protein	0,22	1,31	-0,02	0,17	-0,22	0,54	0,41
A_13_P449628	LOB-Domäne enthaltendes Protein	0,34	1,14	0,03	0,18	-0,16	0,36	0,40
Zellstreckung								
A_13_P177944	Glukan-endo-1,3-beta-D-glukosidase	-0,78	-0,25	1,07	-0,11	0,09	0,25	0,43
A_13_P566324	Glukan-endo-1,3-beta-D-glukosidase	-0,45	0,03	1,04	-0,13	-0,62	0,09	0,16
A_13_P396415	β-D-Xylosidase	0,48	0,82	1,45	-0,17	-0,55	0,17	0,40
A_13_P009126	β-D-Xylosidase	0,52	0,18	1,92	-0,36	-1,09	-0,11	0,21
A_13_P131725	Xyloglukan-Endotransglykosylase	0,24	1,09	0,56	0,47	0,15	0,88	0,30
A_13_P141520	Xyloglukan-Endotransglykosylase	-1,43	-0,29	1,74	-0,18	0,52	0,17	0,14
A_13_P181784	Glykosylhydrolase-Familie 10 Protein	0,00	1,42	1,12	0,21	-0,53	0,07	0,40
A_13_P069171	Glykosylhydrolase-Familie 10 Protein	0,04	1,30	1,03	0,20	-0,54	-0,23	0,42
A_13_P565369	Polygalakturonase	0,31	0,25	2,72	-0,52	0,62	0,00	0,64
A_13_P151535	Polygalakturonase	0,48	0,14	2,02	-0,29	0,35	-0,17	0,45
A_13_P483880	Purple acid-Phosphatase	-0,39	0,70	1,52	0,25	0,09	-0,98	-0,02
A_13_P246905	Purple acid-Phosphatase	-0,82	0,40	1,84	0,03	0,35	-0,34	-0,16
A_13_P085076	Purple acid-Phosphatase	-0,67	0,39	2,03	-0,53	-0,79	-0,63	-0,14
A_13_P174460	β-Expansin	-0,36	-0,02	1,17	-0,26	-0,90	0,02	0,35
A_13_P479245	Strukturprotein	0,16	0,11	4,28	-0,05	-0,86	0,14	0,44
A_13_P266402	Strukturprotein	-0,27	-0,25	2,69	-0,49	-1,29	-0,26	0,50
A_13_P118580	Strukturprotein	0,24	0,24	3,51	0,14	-0,51	0,08	0,17
A_13_P075876	Homolog zu ZmRth3	0,06	0,14	1,89	0,44	-0,14	1,29	-0,27
A_13_P125085	Kaffeesäure O-Methyltransferase	0,74	0,85	1,34	-0,10	0,44	0,01	1,32
A_13_P243492	Kaffeesäure O-Methyltransferase	-0,05	0,86	1,04	-0,23	0,05	0,25	1,16
A_13_P481015	Caffeoyl-CoA O-Methyltransferase	-0,86	-0,04	1,23	0,17	-0,14	0,13	0,48
A_13_P483435	Plasmamembran-Aquaporin	-0,08	-0,34	1,01	-0,13	0,27	-0,46	-0,02
Polyaminmetabolismus								
A_13_P086086	Arginindecarboxylase	-0,95	-0,02	2,68	0,10	0,39	-0,24	0,61
A_13_P135680	Arginindecarboxylase	-0,56	0,38	3,35	0,10	0,11	0,19	0,85
A_13_P000386	Polyaminoxidase HvPAO1	0,47	-0,42	1,55	0,04	-0,26	-0,26	0,72

Tab. 9: Durch die Microarray-Analyse identifizierte differentiell exprimierte Histongene in den Karyopsen der ABA-immunmodulierten Linie 363 im Vergleich zum Wildtyp. Angegeben ist jeweils das log₂-transformierte Expressionsverhältnis zwischen Wildtyp und Linie 363 für jeweils ein repräsentatives Histongen jeder Klasse. Die zugehörige Sequenz-ID ist unterstrichen. Die Absolutwerte der Signalintensitäten sind in Tab. 11 im Anhang aufgeführt. Für weitere Erklärungen siehe Überschrift der Tab. 8.

Sequenz-ID	Annota- tion	Maternale Fraktion			Filiale Fraktion			
		7DAF	10DAF	14DAF	7DAF	10DAF	14DAF	20DAF
A_13_P113360, A_13_P117445, A_13_P117485, A_13_P117495, A_13_P117530, A_13_P117550, <u>A_13_P231654</u> , A_13_P233574, A_13_P234354, A_13_P255127, A_13_P462613, A_13_P475333, A_13_P487870	Histon H1	-0,20	-0,18	1,74	0,08	0,11	0,00	0,11
A_13_P072576, A_13_P085636, A_13_P097010, A_13_P117910, A_13_P117935, A_13_P117940, A_13_P117955, A_13_P117970, A_13_P117975, A_13_P117980, A_13_P118020, A_13_P118030, A_13_P118035, A_13_P118055, A_13_P118060, A_13_P119730, A_13_P119745, A_13_P133220, A_13_P133225, A_13_P231454, A_13_P244140, A_13_P322147, A_13_P350197, A_13_P428396, A_13_P429071, A_13_P430306, A_13_P430341, A_13_P434166, A_13_P434396, A_13_P437261, A_13_P439391, A_13_P441376, A_13_P443123, A_13_P479500, A_13_P479675, A_13_P485420, A_13_P505654, A_13_P529039, <u>A_13_P550079</u> , A_13_P563264, A_13_P582169	Histon H2A	-0,19	-0,48	1,55	0,05	0,30	-0,02	0,09
A_13_P116245, <u>A_13_P116250</u> , A_13_P116260, A_13_P116300, A_13_P116315, A_13_P116330, A_13_P116340, A_13_P116360, A_13_P116365, A_13_P116385, A_13_P116390, A_13_P116395, A_13_P116400, A_13_P116410, A_13_P116445, A_13_P116465, A_13_P116490, A_13_P116525, A_13_P117985, A_13_P212519, A_13_P214079, A_13_P235479, A_13_P243897, A_13_P244735, A_13_P245295, A_13_P251392, A_13_P291737, A_13_P332022, A_13_P347287, A_13_P412845, A_13_P459393, A_13_P475513, A_13_P478670, A_13_P483835, A_13_P487805, A_13_P496280, A_13_P505019, A_13_P517249, A_13_P529429, A_13_P547584, A_13_P548534, A_13_P549734, A_13_P550579, A_13_P550654, A_13_P554294	Histon H2B	-0,25	-0,36	1,59	0,16	0,17	-0,06	0,18
A_13_P117380, A_13_P117405, A_13_P117415, A_13_P117430, A_13_P117435, A_13_P117440, A_13_P117470, A_13_P117490, A_13_P117525, A_13_P117535, <u>A_13_P117540</u> , A_13_P117555, A_13_P117560, A_13_P117570, A_13_P117580, A_13_P117590, A_13_P233944, A_13_P258872, A_13_P269042, A_13_P276109, A_13_P335297, A_13_P350032, A_13_P428331, A_13_P434456, A_13_P475923, A_13_P484080, A_13_P485355, A_13_P550084, A_13_P551549	Histon H3	-0,54	-0,47	1,81	-0,08	0,12	-0,15	0,48
A_13_P095035, A_13_P117450, <u>A_13_P234314</u>	Histon H4	-0,49	-0,74	1,82	-0,44	-0,35	-0,43	0,44

5. Diskussion

5.1. Wie lässt sich der starke Überschuss an freier Abscisinsäure in den immunmodulierten Karyopsen erklären?

Der Gesamt-ABA-Gehalt in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten immunmodulierten Gerstenkaryopsen ist ab dem 10. DAF in allen analysierten Linien stark erhöht. Bereits frühere Studien zeigten, dass Gewebe, die einen Antikörper gegen ein Hormon oder dessen Vorstufe exprimieren, im Allgemeinen das Bestreben zeigen, durch eine Überproduktion des jeweiligen Antigens einem Mangel an demselben entgegenzuwirken (ten Hoopen *et al.*, 2007; Phillips *et al.*, 1997; Radchuk *et al.*, 2010; Strauss *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2008; Urakami *et al.*, 2008). Die samenspezifische Immunmodulierung von Tabak- bzw. Erbsensamen führte zu einem im Vergleich zum Wildtyp 19- bzw. 28-mal höheren ABA-Gehalt in reifen Samen (Phillips *et al.*, 1997; Radchuk *et al.*, 2010). Trotz eines stark erhöhten ABA-Gehaltes sowohl in den Samen als auch in den Blättern von ABA-immunmodulierten Tabak- und Erbsenpflanzen wurde berechnet, dass nahezu die gesamte Abscisinsäure im Antikörper-Komplex vorlag. Dadurch war sie als Hormon unwirksam. Unterstützt wurden diese Berechnungen durch ausgeprägte ABA-Mangelphänotypen der Pflanzen (Artsaenko *et al.*, 1995; Phillips *et al.*, 1997; Wigger *et al.*, 2002; Radchuk *et al.*, 2010). Die starke Expression des anti-ABA scFv im endoplasmatischen Retikulum der Pflanzenzellen führte zur Etablierung eines künstlichen ABA-Sinks in diesem Zellkompartiment (Strauss *et al.*, 2001; Übersicht bei Conrad und Manteuffel, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Menge der antikörpergebundenen bzw. frei vorliegenden ABA in den immunmodulierten Gerstenkaryopsen aller untersuchter Linien berechnet. Unabhängig vom verwendeten Promotor ist der Gehalt an freier ABA in den immunmodulierten Karyopsen im Vergleich zum Wildtyp stark erhöht (Abb. 17). Da nahezu alle ABA-Bindestellen des im ER lokalisierten scFv gesättigt sind, wirkt dieses Zellkompartiment in den immunmodulierten Gerstenkaryopsen nicht als künstlicher ABA-Sink. Diese Arbeit der erste Bericht über eine rasche Erhöhung der frei vorliegenden Menge eines Hormons in Reaktion auf dessen Immunmodulierung.

Die stärkste ABA-Akkumulation findet in den Karyopsen der Linie 363 statt, deren reife Körner mit 6429,2 pmol/g 38 Mal mehr freie ABA enthalten als Wildtyp-Körner. Ähnlich hohe ABA-Gehalte wie in den ABA-immunmodulierten Gerstenkaryopsen können in einigen pflanzlichen Geweben unter Stressbedingungen auftreten (Cornish und Zeevaart, 1985). Die ABA-Gehalte unter Stress- bzw. Normalbedingungen unterscheiden sich jedoch stark zwischen verschiedenen Organen einer Pflanze sowie zwischen den gleichen Organen verschiedener Species (Cornish und Zeevaart, 1985). Ein aufgrund von Stresseinwirkung erhöhter ABA-Gehalt wurde am häufigsten am Beispiel von Trockenstress untersucht (zusammengefasst von Raghavendra *et al.*, 2010). Nach dem Einsetzen von Trockenstress steigt der ABA-Gehalt zunächst bis auf ein Maximum an und fällt nach mehreren Stunden auf ein art- und organspezifisches Plateauniveau (Stewart und Voetberg, 1985; Walker-Simmons *et al.*, 1989; Nambara und Marion-Poll, 2005). Gerstenkaryopsen, die sich unter Wassermangelbedingungen entwickeln, zeigen einen höchstens sieben Mal höheren ABA-Gehalt als

ungestresste Karyopsen (Seiler *et al.*, 2011), während der ABA-Gehalt von Weizen- und Reiskaryopsen selbst unter starkem Wassermangel nur bis zu 3,5 Mal höher ist als unter Kontrollbedingungen (Yang *et al.*, 2004a; Yang *et al.*, 2004b). Bis auf eine allgemein höhere ABA-Akkumulation und einen um mehrere Tage früheren ABA-Peak ähnelt der Verlauf der ABA-Akkumulation in trockengestressten Karyopsen jedoch dem in ungestresstem Material. In den Karyopsen der Linie 363 erreicht der ABA-Gehalt nicht nur ein weit höheres Niveau als für Gerstenkaryopsen unter Wassermangel berichtet wurde, sondern steigt auch kontinuierlich an und unterscheidet sich daher von der natürlichen Stress-ABA-Akkumulation. Mögliche Ursachen für den ungewöhnlichen Verlauf der ABA-Akkumulation in den immunmodulierten Gerstenkaryopsen werden im Folgenden diskutiert.

5.1.1 Die immunmodulierten Gerstenkaryopsen zeigen eine verstärkte ABA-Biosynthese

Der endogene ABA-Gehalt in pflanzlichen Geweben wird durch ein dynamisches Gleichgewicht von Biosynthese und Katabolismus reguliert. In sich entwickelnden Samen kommt ein dritter Faktor hinzu: der Import von ABA aus vegetativen Pflanzenteilen über das Phloem (Nambara und Marion-Poll, 2003). In Pflanzen wird ABA indirekt aus Carotenoiden synthetisiert (Nambara und Marion-Poll, 2005). Als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der ABA-Biosynthese wird die Spaltung von 9-cis-Xanthophyllen zu Xanthoxin durch das Enzym 9-cis-Epoxycarotenoid-Dioxygenase (NCED, Schwartz *et al.*, 1997) in den Plastiden angesehen (Nambara und Marion-Poll, 2005). Da Inhibitoren von Transkription und Translation die stressinduzierte ABA-Akkumulation blockieren, ist für einen oder mehrere Schritte der ABA-Biosynthese eine *de novo*-Genexpression notwendig (Quarrie und Lister, 1984; Guerrero und Mullet, 1986).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Genexpressionsanalyse zeigt, dass die Expression zweier NCED-Gene und eines putativen NCED-Gens (HvNCED1, HvNCED2, HvCCD4) im filialen Teil der immunmodulierten Karyopsen am 14. DAF hochreguliert ist. Für viele Pflanzenarten wurde eine direkte Korrelation zwischen NCED mRNA-Level, NCED-Protein und ABA-Gehalt nachgewiesen (Qin und Zeevaart, 1999; Wang *et al.*, 2009; Deluc *et al.*, 2009; Yang und Guo, 2007). Auch Studien zur Überexpression von NCEDs in transgenen Pflanzen belegen eine Abhängigkeit der ABA-Akkumulation von der NCED-Genexpression (Thompson *et al.*, 2000; Qin und Zeevaart, 2002; Zhang *et al.*, 2009b). Daher ist es wahrscheinlich, dass die verstärkte NCED-Expression zu dem erhöhten ABA-Gehalt in den immunmodulierten Karyopsen beiträgt. Da jedoch der ABA-Gehalt in den Karyopsen der Linie 363 bereits vor dem 14. DAF höher ist als im Wildtyp, wird dieser offenbar nicht ausschließlich durch die NCEDs kontrolliert.

In den letzten Jahren häuften sich die Hinweise darauf, dass auch die Aldehydoxidase-Aktivität limitierend für die ABA-Biosynthese sein kann. Aldehydoxidasen katalysieren mit der Umwandlung von ABA-Aldehyd zu ABA den letzten Schritt der ABA-Biosynthese. In Ackerbohne führt die ektopische Expression des AtAAO3-Gens zu einer Verringerung der stomatalen Apertur in Blättern (Melhorn *et al.*, 2008). In der *Arabidopsis saul1*-Mutante korreliert die Akkumulation des AAO3-Proteins und die dadurch erhöhte AAO3-Aktivität in Blättern mit einem gesteigerten ABA-Gehalt (Raab *et al.*, 2009) und im Maisbart ist ein SNP in einem Aldehydoxidasegen signifikant mit dem

ABA-Level assoziiert (Setter *et al.*, 2011). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass in den filialen Geweben der Linie 363 das an der ABA-Biosynthese beteiligte Aldehydoxidase-Gen HvAO1 vom 10. bis 20. DAF hochreguliert ist. Die verstärkte Expression dieses Gens initiiert möglicherweise die ABA-Überproduktion in den immunmodulierten Karyopsen.

Zur Inaktivierung von ABA existieren mehrere alternative Wege (Nambara und Marion-Poll, 2005; Zhou *et al.*, 2004). Der wichtigste von ihnen ist die ABA-Hydroxylierung an der 8'-Position unter Bildung von 8'-Hydroxy-ABA (Nambara und Marion-Poll, 2005). Diese Reaktion wird durch die Cytochrom P450 Monooxygenase ABA-8'-Hydroxylase katalysiert (Krochko *et al.*, 1998). Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Microarray-Analyse wurde kein ABA-8'-Hydroxylase-Gen identifiziert, das eine vom Wildtyp abweichende Expression in der immunmodulierten Linie 363 zeigt. Da die Aktivität der ABA-8'-Hydroxylase hauptsächlich auf der Ebene der Genexpression kontrolliert wird (Yang und Zeevaart, 2006), ist die Rate der ABA-8'-Hydroxylierung in den immunmodulierten Karyopsen im Vergleich zum Wildtyp höchstwahrscheinlich unverändert.

Ein anderer Weg der ABA-Inaktivierung ist die Verknüpfung von ABA und Glukose zu ABA-Glykosylester (Xu *et al.*, 2002). Diese Reaktion ist durch die Wirkung von β -Glukosidasen reversibel (Dietz *et al.*, 2000). In den Karyopsen der transgenen Linie 363 gibt es fünf β -Glukosidase-Gene, die in der maternalen oder filialen Fraktion eine verstärkte Expression zeigen. Der erhöhte ABA-Gehalt in den sich entwickelnden Karyopsen der ABA-immunmodulierten Gerstenlinien ist somit vermutlich auf eine verstärkte Biosynthese von ABA und möglicherweise auf die Freisetzung von gebundener ABA aus ABA-Glykosylestern zurückzuführen.

5.1.2. Die Regulation der ABA-Biosynthese und des ABA-Abbaus

Viele Biosynthesewege werden durch ihre Endprodukte reguliert. Dies ist auch für das Phytohormon ABA der Fall. In Abhängigkeit von der Species und dem genetischen Hintergrund (Xiong und Zhu, 2003) aktiviert ABA sowohl die Expression von Genen der ABA-Biosynthese als auch des ABA-Katabolismus. In *Arabidopsis* zeigen die ABA-Biosynthesegene AtZEP, AtAAO3, AtMCSU und AtNCED3 zusätzlich zu ihrer Regulation durch Stress eine deutliche Aktivierung durch exogene ABA (Xiong und Zhu, 2003; Barrero *et al.*, 2006). Da in vielen ABA-defizienten *Arabidopsis*-Mutanten (*los5*, *aba1*, *aba2*, *aba3*) die Transkriptlevel der ABA-induzierbaren ABA-Biosynthesegene unter Stressbedingungen signifikant niedriger sind als in Wildtyp-Pflanzen (Xiong und Zhu, 2003), reguliert offenbar auch endogene ABA ihre Expression. Barrero und Kollegen (2006) beschreiben, dass die Expression von AtNCED3, AtAAO3 und AtABA1 in *Arabidopsis* sowohl durch ABA-abhängige als auch ABA-unabhängige Signalwege induziert wird. Osmotischer Stress führt zu einer geringen initialen Erhöhung des ABA-Gehaltes, welche wiederum ein positives *Feedback* auf die ABA-Biosynthese ausübt. Auch in keimenden Erdnuss-Samen verstärkt exogene ABA die Transkription des AhNCED1-Gens und erhöht dadurch den endogenen ABA-Gehalt, während Naproxen (ein ABA-Biosyntheseinhibitor) die AhNCED1-Transkription signifikant verringert (Wan und Li, 2006; Hu *et al.*, 2010). Höchstwahrscheinlich trägt auch in den immunmodulierten Gerstensamen eine solche positive *Feedback*-Regulierung der ABA-Biosynthese durch ABA zu den besonders hohen Gehalten dieses Hormons bei.

Allerdings ist unklar, aus welchem Grund die starke ABA-Akkumulation in den immunmodulierten Gerstenkaryopsen den ABA-Abbau nicht oder nicht ausreichend stark fördert, um den Gehalt an freier ABA auf Wildtyp-Niveau zu senken, wie es z.B. nach der Aufhebung von Stresseinflüssen der Fall ist (Xiong und Zhu, 2003; Okamoto *et al.*, 2009). Ein erhöhter ABA-Gehalt fördert den ABA-Katabolismus in vielen Species. So aktiviert exogene ABA in *Arabidopsis* und Vogelkirsche die Expression der ABA-8'-Hydroxylase und fördert auf diese Weise seinen eigenen Abbau (Saito *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2010). Ren und Kollegen (2007) berichten von einer elf Mal höheren ABA-Abbaurrate bei einem durch Stress erhöhtem ABA-Gehalt in Maisblättern als unter Kontrollbedingungen. Jedoch sind Erkenntnisse aus Studien, in denen erhöhte ABA-Gehalte in Folge von Stresseinwirkung untersucht wurden, nur bedingt auf die Situation in den immunmodulierten Gerstenkaryopsen übertragbar, denn die ABA-Akkumulation in den sich entwickelnden Gerstenkaryopsen geschieht in Abwesenheit von Stress.

Denkbar ist, dass ein großer Teil der überschüssigen ABA in Kompartimenten abseits möglicher *Feedback*-Wege zur Regulation des ABA-Gehaltes akkumuliert. ABA ist eine schwache Säure mit einem pK_a von 4,7 und liegt bei einem niedrigen pH-Wert in seiner protonierten, ungeladenen Form (ABA·H) vor. Diese kann ungehindert durch Membranen diffundieren. Erhöht sich der pH-Wert, so dissoziiert ABA und liegt als anionisches ABA^- -Ion mit geringer Membranpermeabilität vor. Die pH-Wert-abhängige ABA-Partitionierung spielt sowohl bei der subzellulären ABA-Verteilung (Hartung *et al.*, 1988) als auch beim Langstreckentransport von ABA (z.B. im Xylemsaft) eine Rolle (Wilkinson und Davies, 1997; Wilkinson *et al.*, 2007). In grünen Pflanzenteilen sind die Chloroplasten bekannte Anionenfallen für ABA, da es durch die photosynthetische Aktivität zu einer Alkalisierung des Chloroplastenstroma kommt (Dodd und Davies, 2010). Die Plastiden in sich entwickelnden Gerstenkaryopsen sind jedoch größtenteils zu stärkespeichernden Amyloplasten differenziert. Chloroplasten befinden sich ausschließlich in der nur wenige Zellreihen umfassenden Chlorenchym-Schicht. Die Amyloplasten kommen aufgrund ihres sauren pHs von ca. 6 (Yang *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2010) als Anionenfalle für ABA nicht in Frage. Ein anderer Raum, in dem ABA mitunter stark akkumuliert, ist der Apoplast. Im Gegensatz zum pH im Cytosol ist der pH-Wert des Apoplasten veränderlich und alkalisiert unter bestimmten Bedingungen wie z.B. unter Stress (Jiang und Hartung, 2008). In den sich entwickelnden Gerstenkaryopsen ist ein solcher basischer Stress-pH jedoch unwahrscheinlich. Einerseits wird in der maternalen Gewebefraktion das Gen der Plasmamembran- H^+ -ATPase stärker exprimiert als im Wildtyp, welche durch aktiven Protonentransport den pH des Apoplasten senkt. Andererseits sind in der filialen Fraktion der Linie 363 die Gene der vakuolären H^+ -translozierenden Pyrophosphatase (V-PPiase) und einer Untereinheit der vakuolären H^+ -ATPase hochreguliert. Beide Gene werden durch ABA induziert (Fukuda und Tanaka, 2006). Diese Enzyme transportieren Protonen über den Tonoplasten und regulieren damit den pH der Vakuole. Über einen bisher unbekanntem Mechanismus sind die pH-Gradienten über die Vakuolen- und Plasmamembran miteinander verknüpft und bilden ein regulatorisches Netzwerk (Martinoia *et al.*, 2007). Durch eine veränderte Expression der V-PPiase wird gleichsam der apoplastische pH verändert. In *Arabidopsis* zeigten Pflanzen ohne V-PPiase-Aktivität einen signifikant alkalischeren vakuolären und apoplastischen pH während V-PPiase überexprimierende Pflanzen einen saureren pH in Apoplast und

Vakuole aufweisen (Martinoia *et al.*, 2007). Die Frage einer möglichen kompartimentspezifischen Akkumulation des ABA-Überschusses in den immunmodulierten Karyopsen ließe sich durch eine ABA-Immunlokalisierung auf subzellulärer Ebene beantworten. Die Immunogold-Markierung hat sich für diesen Zweck als gut geeignet erwiesen (Pastor *et al.*, 1999; Schraut *et al.*, 2004).

Weiterhin deutet die veränderte Expression der oben genannten Gene auf Veränderungen der pH-Verteilung und des H⁺-abhängigen Transportes in den sich entwickelnden immunmodulierten Karyopsen im Vergleich zum Wildtyp hin. Die Anwendung von fluoreszenzbasierten pH-Indikatoren zur Visualisierung des pH-Wertes mit subzellulärer Auflösung (Roos *et al.*, 1998; Roos *et al.*, 2006) wäre äußerst hilfreich, um eine eventuell gestörte pH-Homöostase in den immunmodulierten Gerstensamen zu untersuchen.

Um die *Feedback*-Regulation besser zu verstehen, ist es wichtig herauszufinden, welche Signalkomponenten die Autoregulation der ABA-Biosynthesegene vermitteln. Obwohl viele Bestandteile der ABA-Signalweiterleitung bereits bekannt sind (Raghavendra *et al.*, 2010), ist der genaue Mechanismus zur Kontrolle von zellulären ABA-Gehalten noch nicht aufgeklärt. Hinweise auf die Beteiligung des „*Core signaling*“-Netzwerks (Cutler *et al.*, 2010) an der *Feedback*-Schleife lieferten Studien an der *Arabidopsis abi1*-Mutante, in der die Autoregulation der ABA-Biosynthese durch ABA teilweise beeinträchtigt ist (Xiong und Zhu, 2003). Die homologen Typ 2C-Proteinphosphatasen ABI1 und ABI2 sind als negative Regulatoren der ABA-Signalweiterleitung bekannt. In der *abi1*-Mutante ist exogen applizierte ABA nicht in der Lage, die Expression des NCED3-Gens zu aktivieren. Weiterhin sind in dieser Mutante die Transkriptlevel von ZEP und AAO3 nach ABA-Behandlung signifikant reduziert. Interessanterweise wird die Expression all dieser Gene durch die *abi2*-Mutation nicht beeinflusst (Xiong und Zhu, 2003).

5.1.3. Möglicherweise initiiert ein frühes ABA-Mangelsignal die verstärkte ABA-Akkumulation in den immunmodulierten Gerstenkaryopsen.

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit dokumentierten Beobachtungen herrscht in ABA-immunmodulierten Tabaksamen, die den anti-ABA scFv unter Kontrolle des samenspezifischen USP-Promotors exprimieren, bis zum 21. DAF ein starker Mangel an freier Abscisinsäure (Phillips *et al.*, 1997). In dieser Zeit wird aufgrund der äußerst starken anti-ABA scFv-Expression in den sich entwickelnden Samen nahezu die gesamte freie ABA im ER gebunden. Ähnlich wie im hier untersuchten Gerstenmodell steigt aber auch im Tabak der Gesamt-ABA-Gehalt während der gesamten Samenentwicklung an, während es im Wildtyp einen klaren Peak des ABA-Gehaltes während der Reifungsphase gibt. Schließlich führt die kontinuierliche Erhöhung des Gesamt-ABA-Gehaltes nach dem 21. DAF zu einem starken Überschuss freier Abscisinsäure in den sich entwickelnden Tabaksamen. Auch transgene Kartoffelpflanzen, die den anti-ABA scFv ubiquitär exprimieren, zeigten während der frühen Stadien der Pflanzenentwicklung zunächst eine ABA-Defizienz (Strauss *et al.*, 2001). Durch die kontinuierliche Erhöhung des ABA-Gehaltes in den Kartoffelblättern entwickelten ältere Pflanzen hingegen einen Überschuss an freier ABA.

In beiden Fällen wurde die ABA-Defizienz, die zunächst durch die Expression des anti-ABA Antikörpers hervorgerufen wurde, durch eine verstärkte ABA-Akkumulation überwunden. Trotzdem

akkumulierten die Pflanzen weiterhin ABA und waren, ähnlich wie die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gerstenkaryopsen, nicht in der Lage, den ABA-Gehalt auf einen für den Wildtyp typischen Wert einzuregulieren. Während der Entwicklung der Tabaksamen und der Kartoffelpflanzen wurde höchstwahrscheinlich zur Zeit der ABA-Defizienz ein Signal gesetzt, das die Akkumulation von Abscisinsäure anregt, um dem Mangel entgegenzuwirken. Dieses Signal oder die dadurch ausgelöste physiologische Antwort konnte jedoch nach der Behebung des ABA-Mangels aus bisher unbekanntem Gründen nicht aufgehoben werden. Ähnliches könnte auch auf die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gerstenkaryopsen zutreffen.

Die Expression des anti-ABA scFv beginnt in den 1Ax1-Promotor-Linien ungefähr am 7. DAF (Abb. 36). Zu diesem Entwicklungszeitpunkt ist der ABA-Gehalt der sich entwickelnden Karyopsen noch sehr gering (Abb. 17) und liegt nahe der Detektionsgrenze der von uns angewandten Messmethode. Dies wird durch eine äußerst hohe Standardabweichung deutlich (Abb. 17). Daher könnte die Berechnung freier und scFv-gebundener ABA für den 7. DAF nicht aussagekräftig sein. Es ist möglich, dass zu Beginn der scFv-Expression ein transients Mangel an ABA in den sich entwickelnden Gerstenkaryopsen herrscht. Dieser könnte ein Signal zur Erhöhung des Abscisinsäuregehaltes auslösen und damit zu einer verstärkten ABA-Biosynthese in den betroffenen Geweben sowie zu einem verstärkten Transport von ABA und/oder dessen Vorstufen und/oder ABA-Glykosylester in die sich entwickelnden Karyopsen führen.

Die *Feedback*-Kontrolle von Transportprozessen durch den filialen Bedarf ist gegenwärtig noch nicht gut verstanden (Zhang *et al.*, 2007). Zur Anpassung von Transport- und Transferprozessen zwischen *Source* und *Sink* ist die Übertragung von regulatorischen Signalen aus den sich entwickelnden filialen Geweben notwendig. Die Art dieses Signales ist bisher nicht bekannt. Da jedoch die Existenz eines Hormonsignals nahe liegt (Zhang *et al.*, 2007), könnte der ABA-Gehalt selbst gleichzeitig Auslöser und Übermittler eines ABA-Mangelsignals sein.

Da die Expression des anti-ABA scFv in den sich entwickelnden Gerstenkaryopsen unter Kontrolle des 1Ax1-Promotors wesentlich schwächer ist als die Antikörper-Expression in Tabaksamen unter Kontrolle des USP-Promotors, führt die starke Akkumulation von ABA bereits nach kurzer Zeit zu einem Überschuss dieses Hormons in den filialen Geweben der immunmodulierten Karyopsen.

5.2. Veränderte Signalweiterleitung in Reaktion auf den erhöhten ABA-Gehalt

Der veränderte ABA-Gehalt in den immunmodulierten Karyopsen wirkt sich in beiden Gewebefraktionen unterschiedlich auf die Genexpression aus (Abb. 35). In der filialen Fraktion zeigen viele mit der Speicherung assoziierte Gene eine im Vergleich zum Wildtyp veränderte Expression. In der maternalen Fraktion hingegen ist ein großer Teil der differentiell exprimierten Gene an der Zellteilung und Zellstreckung beteiligt. Beiden Fraktionen gemein ist jeweils eine große Gruppe von Genen, die an der Stressantwort und der Signalweiterleitung beteiligt sind. Dies lässt vermuten, dass die im Vergleich zum Wildtyp veränderte Signalweiterleitung in der filialen Fraktion zum großen Teil mit Stress und Speicherungsprozessen assoziiert ist, während sie in der maternalen Fraktion möglicherweise Stressantworten und Zellproliferationsereignisse nach sich zieht.

Cytoplasmatisches Calcium ist ein ubiquitärer *Second Messenger* in allen Eukaryoten. Bei Pflanzen spielt die intrazelluläre Calciumionenkonzentration besonders in der Signalweiterleitung der biotischen und abiotischen Stressantwort eine wichtige Rolle (Zusammenfassung in Kim *et al.*, 2009). Aber auch mit verschiedenen Phasen des Zellzyklus sind Calciumsignale assoziiert und Eingriffe in den Calcium-Signalweg verhindern häufig die Zellzyklusprogression (Machaca, 2010). Hingegen gibt es bisher keine Berichte über eine Beteiligung von Calciumsignalen an der Steuerung von Speicherprozessen, obwohl der Anstieg von Zuckerkonzentrationen in Tabak-Zellkulturen (Furuichi und Muto, 2005) und vegetativen Organen von *Arabidopsis* (Furuichi *et al.*, 2001) einen transienten Anstieg der Calciumkonzentration im Cytosol zur Folge haben kann.

Der größte Teil der in den immunmodulierten Gerstenkaryopsen differentiell exprimierten Gene für die calciumabhängigen Signalweiterleitung zeigt sowohl in der maternalen als auch in der filialen Gewebefraktion eine vom Wildtyp abweichende Expression (Tab. 8). Möglicherweise sind diese Gene daran beteiligt, die in beiden Fraktionen prominente gewebespezifische Stressantwort auszulösen. Da in der maternalen und der filialen Fraktion der Linie 363 spezifische Kinase-, Phosphatase- und Transkriptionsfaktorgene durch die ABA-Immunmodulierung beeinflusst werden (Tab. 8), sind diese Gene hingegen vermutlich an der Regulation gewebespezifischer Antworten beteiligt.

Der Trehalose-Stoffwechsel spielt eine zentrale Rolle bei der Koordinierung von Metabolismus und Entwicklungsprozessen. Als Signalmolekül wirkt dabei das durch die Trehalosephosphat-Synthase (TPS) synthetisierte Trehalose-6-phosphat (T6P). So zeigen Embryonen der *Arabidopsis tps1* Mutante eine stark verminderte Zellteilungsaktivität (Gomez *et al.*, 2006). Die Trehalosephosphat-Phosphatase (TPP) dephosphoryliert T6P zu Trehalose. In den immunmodulierten Gerstenkaryopsen wird das Gen einer TPS am 7. DAF in der maternalen Fraktion und am 14. DAF in der filialen Fraktion stärker exprimiert als im Wildtyp. Die Expression von TPP-Genen ist in der filialen Fraktion am 10. DAF und in der maternalen Fraktion zu allen untersuchten Entwicklungszeitpunkten erhöht. Die TPS-Aktivität wird sowohl auf Transkriptebene als auch posttranslational reguliert (Paul *et al.*, 2008). TPPs hingegen werden nur durch ihre Genexpression reguliert. In Reis wird die Expression des TPP1-Gens durch ABA stimuliert (Pramanik und Imai, 2005). Auch die Signalwege von ABA und Trehalose sind miteinander verknüpft. In *Arabidopsis* werden einige TPS an verschiedenen Positionen durch SnRK1-Kinasen phosphoryliert (Paul *et al.*, 2008). *Arabidopsis*-Keimlinge, deren Trehalose- und T6P-Gehalt durch die Überexpression einer Trehalosephosphat-Synthase geringfügig erhöht war, zeigten einen ABA-insensitiven Phänotyp (Avonce *et al.*, 2004). Außerdem ist die Keimung von *Arabidopsis tps1-11*, *tps1-12* und *tps1-13* Samen hypersensitiv gegenüber ABA (Gomez *et al.*, 2010).

Trotz der differentiellen Genexpression zeigt die Untersuchung der Metabolitgehalte in beiden Gewebefraktionen der Linie 363 keinen veränderten T6P Gehalt im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 30). Auch die Trehalosegehalte der filialen Fraktion unterscheiden sich nicht von den entsprechenden Wildtyp-Werten. Dennoch weisen die verstärkte TPP-Expression und der hohe Trehalosegehalt zu allen untersuchten Entwicklungszeitpunkten in den maternalen Geweben (Abb. 30) auf einen verstärkten Metabolitfluss durch den T6P-Weg hin. Welche Bedeutung dies für die Modulierung von ABA-Signalen in den immunmodulierten Karyopsen hat, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden.

5.3. Reaktionen der filialen Kornteile auf den erhöhten ABA-Gehalt

In den filialen Kornteilen wurden am 10. und 14. DAF zahlreiche bereits beschriebene Reaktionen auf einen erhöhten ABA-Gehalt beobachtet. So vermittelt ABA physiologische Antworten auf umweltbedingte Stressfaktoren wie die Induktion der Toleranz gegenüber Wasser-, Salz-, Hypoxie- und Kältestress sowie die Verwundungs- und Pathogenantwort (Finkelstein *et al.*, 2002). Die aufgezählten Antworten sind langsam, denn sie benötigen eine *de novo* Genexpression. Übereinstimmend damit, zeigt die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Microarray-Analyse am 10. und 14. DAF zahlreiche stressassoziierte Gene, die in den sich entwickelnden Karyopsen der ABA-immunmodulierten Linie 363 höher exprimiert werden als in Wildtyp-Karyopsen (vgl. Tab. 8).

Weiterhin ist filiale ABA dafür bekannt, die Synthese von Stärke in sich entwickelnden Samen zu stimulieren (Finkelstein *et al.*, 2002). Dies geschieht durch die Aktivierung der an der Stärkespeicherung beteiligten Enzyme. In sich entwickelnden Karyopsen von Weizen und Reis korreliert der ABA-Gehalt eng mit den Aktivitäten der Saccharosesynthase (SuSy), der löslichen Stärkesynthase und des stärkeverzweigenden Enzyms. Die exogene Applikation von ABA führt zu erhöhten Aktivitäten dieser Enzyme, während die Applikation von Fluridon (einem Inhibitor der Carotenoidbiosynthese) den gegenteiligen Effekt hat (Yang *et al.*, 2004a; Tang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009c). Übereinstimmend mit diesen Studien weist die erhöhte Expression mehrerer Gene der Stärkebiosynthese auf eine verstärkte Stärkespeicherung in der filialen Fraktion der Linie 363 am 10. und 14. DAF hin. Speicherstärke entsteht durch die Verknüpfung von ADP-Glukose Einheiten. Die zur ADP-Glukose-Synthese verwendeten Hexosen stammen aus der SuSy-vermittelten Saccharose-Spaltung (Weschke *et al.*, 2000). Dieses in der Linie 363 hochregulierte Enzym gehört neben der AGPase zu den Hauptregulatoren der Stärkebiosynthese in Gerstenkaryopsen (Sreenivasulu *et al.*, 2010a). Die am 10. und 14. DAF vorübergehend verstärkte Stärkespeicherung in den immunmodulierten Karyopsen trägt vermutlich zu dem verringerten Hexosegehalt am 14. DAF bei.

Die SuSy ist durch einen außergewöhnlich hohe Michaeliskonstante (K_m) gekennzeichnet, durch die die Aufrechterhaltung eines hohen Saccharosegehaltes in speicheraktiven Zellen gewährleistet wird (Ross und Davies, 1992; Borisjuk *et al.*, 2004). Daher ist die Hexoseverfügbarkeit in den sich entwickelnden Gerstenkaryopsen unmittelbar vom Saccharoseimport abhängig. Der Transport von Saccharose in sich entwickelnde Getreidekaryopsen gehört jedoch zu den limitierenden Faktoren der Speicherstoffbiosynthese (Weichert *et al.*, 2010) und kann den erhöhten Hexoseverbrauch am 14. DAF möglicherweise nicht ausgleichen. Der Saccharosegehalt in sich entwickelnden Karyopsen ist hingegen unempfindlich gegenüber veränderten Transport- oder Speicherungsprozessen. Dies ist nicht nur auf den bereits erwähnten hohen K_m der SuSy zurückzuführen sondern auch auf eine rasche Anpassung der metabolischen Flüsse an die zur Verfügung stehende Saccharose. So führte die Überexpression des Saccharosetransporters HvSUT1 aus Gerste in sich entwickelnden Weizenkaryopsen zu einer verstärkten Saccharoseaufnahme, der Saccharosegehalt der Karyopsen blieb jedoch konstant (Weichert *et al.*, 2010).

Während der frühen Karyopsenentwicklung sind Invertasen wichtige Regulatoren der Saccharosespaltung. In reproduktiven Organen von Weizen und Reis reprimiert eine hohe ABA-

Konzentration die Expression zellwandgebundener Invertasen und verringert dadurch die Spaltung von Saccharose zu Hexosen (Oliver *et al.*, 2005; Oliver *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2011). Auch in Maiswurzelspitzen unter Trockenstress wird die Expression der zellwandgebundenen Invertase durch ABA reprimiert (Spollen *et al.*, 2008). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Genexpressionsanalyse zeigte jedoch bei allen 14 auf dem 4x44K *Barley Gene Expression Microarray* vertretenen Invertase-Sequenzen keine veränderte Genexpression im Vergleich zum Wildtyp (Spot-IDs: A_13_P002956, A_13_P064931, A_13_P075661, A_13_P078526, A_13_P115535, A_13_P137030, A_13_P137035, A_13_P140255, A_13_P251212, A_13_P251212, A_13_P385232, A_13_P393480, A_13_P404345, A_13_P547134, A_13_P575229). Des Weiteren ist die Invertaseaktivität und damit die Bedeutung dieser Enzyme für die Saccharosespaltung in sich entwickelnden Gerstenkaryopsen am 14. DAF nur noch äußerst gering (Weschke *et al.*, 2003). Der am 14. DAF verringerte Hexosegehalt in den immunmodulierten Karyopsen geht somit vermutlich auf eine verstärkte Stärkespeicherung und eine limitierte SuSy-vermittelte Saccharosespaltung zurück. Eine differentielle Regulation der Invertase-vermittelten Saccharosespaltung jedoch ist unwahrscheinlich.

Auch die Synthese von Speicherproteinen wird durch Abscisinsäure stimuliert (Finkelstein *et al.*, 2002), was am hier untersuchten Gerstenmodell bestätigt wurde. Am 10. DAF kommt es in der filialen Gewebefraktion der Linie 363 zu einer verstärkten Expression von Hordeinen und Speicherglobulinen. Ebenso ist die Expression von sechs Serpin-codierenden Sequenzen in dieser Fraktion am 10. DAF hochreguliert. Neben ihrer putativen Rolle in der Abwehr von Fraßfeinden erfüllen Serpine möglicherweise zusätzlich eine Funktion als Speicherprotein (Finnie *et al.*, 2002). Durch ihren besonders hohen Lysingehalt tragen Serpine zu ca. 5% des Gesamtlysingehaltes von Gerstenkaryopsen bei (Hejgaard, 1982) und ihre Expression wird durch die „*high-Lys*“ Allele *lys1* und *lys3a* reguliert (Brandt *et al.*, 1990). Weiterhin sind in der filialen Fraktion der Linie 363 am 10. bzw. 20. DAF LEA-Gene mehrerer Klassen hochreguliert. LEA-Proteine tragen zur Toleranz von Zellen gegenüber umweltbedingten Stressfaktoren und der Samentrocknung bei (Xu *et al.*, 1996; Sivamani *et al.*, 2000; Tunnacliffe und Wise, 2007). Eine verbesserte Stresstoleranz von Pflanzen korreliert häufig mit einer verstärkten LEA-Proteinexpression. Die LEA-Proteine der Getreidekaryopsen werden besonders im Embryo und dem Aleuron während der späten Speicherphase exprimiert (Tunnacliffe und Wise, 2007). Nur diese beiden Organe überleben die Austrocknung des Samens. Aber auch im Endosperm wurden LEA-Transkripte nachgewiesen (Furtado und Henry, 2005). Die LEA-Genexpression wird ebenfalls durch ABA induziert (Zusammenfassung in Tunnacliffe und Wise, 2007).

Der durch eine verstärkte Proteinspeicherung putativ erhöhte Aminosäure-Bedarf führt vermutlich zu den am 14. DAF verringerten Aminosäuregehalten in den Karyopsen der immunmodulierten Linien, denn der Aminosäuretransport in die Speichergewebe sich entwickelnder Samen ist limitierend für die Proteinspeicherung (Weber *et al.*, 2010; Rolletschek *et al.*, 2005). Die verstärkte Expression dreier Aminosäuretransporter am 14. DAF ist möglicherweise eine Folge des transienten Aminosäuremangels und könnte dazu beitragen, die Aminosäuregehalte in den Karyopsen der Linie 363 bis zum 20. DAF wieder auf Wildtyp-Niveau zu erhöhen.

Die Akkumulation von Speicherprodukten im Gerstenendosperm wird im Allgemeinen durch eine hohe transkriptionelle Aktivität von Genen der Glykolyse begleitet (Sreenivasulu *et al.*, 2004). Die

Expression der meisten glykolyseassoziierten Gene unterscheidet sich zwischen der immunmodulierten Linie und dem Wildtyp nicht. Nur das Gen der Phosphofruktokinase ist am 10. DAF in der filialen Fraktion der Linie 363 hochreguliert. Dieses Enzym katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glykolyse, die Phosphorylierung von Fruktose-6-phosphat zu Fruktose-1,6-bisphosphat (Berg *et al.*, 2003). Daher wird die Aktivität dieses Enzyms auf verschiedenen Ebenen kontrolliert. ATP und Citrat wirken als allosterische Inhibitoren. Die PFK der Säugetiere wird weiterhin durch Fruktose-2,6-bisphosphat allosterisch aktiviert (Berg *et al.*, 2003), was jedoch nicht für alle pflanzlichen PFKs gilt (Mustroph *et al.*, 2007). Zusätzlich findet die Regulation der PFK auf der Ebene der Genexpression statt (Mustroph *et al.*, 2007). Die stabile und transiente Expression einzelner PFK-Gene aus *Arabidopsis* in Tabak-Blättern führt zu einer erhöhten PFK-Enzymaktivität. Aus diesem Grund ist die erhöhte PFK-Expression ein Hinweis auf einen verstärkten Flux durch die Glykolyse am 10. DAF.

Die reifen Karyopsen aller im Rahmen dieser Arbeit untersuchten immunmodulierten Linien zeigen eine im Vergleich zum Wildtyp verzögerte Keimung. Der Anteil an dormanten Körnern unterscheidet sich zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp jedoch nicht. Diese Beobachtung ist in guter Übereinstimmung mit dem erhöhten ABA-Gehalt der reifen immunmodulierten Körner, denn Abscisinsäure ist ein Inhibitor der Samenkeimung und vertieft die Dormanz (Finkelstein *et al.*, 2008). Samen, die aufgrund von Mutationen oder der chemischen Inhibition der ABA-Biosynthese ABA-defizient sind, zeigen eine geringere Dormanz als Wildtyp-Samen, während die Überexpression von ABA-biosynthetischen Enzymen zu einer verstärkten Samenruhe führt (zusammengefasst in Finkelstein *et al.*, 2008). Allerdings wird in Gerstensamen die Fähigkeit zu keimen nicht durch den ABA-Gehalt der reifen trockenen Karyopsen bestimmt. Vielmehr ist sie vom Umfang des ABA-Abbaus nach dem Quellen der Früchte abhängig (Millar *et al.*, 2006). Die verzögerte Keimung der immunmodulierten Karyopsen kann daher damit erklärt werden, dass im Vergleich zum Wildtyp größere ABA-Mengen abgebaut werden müssen, bevor ein Schwellenwert unterschritten wird, der die Samenkeimung zulässt. Dies nimmt in den transgenen Linien mehr Zeit in Anspruch als im Wildtyp.

5.4. Einfluss der ABA-Immunmodulierung auf die maternalen Gewebe der Karyopse

5.4.1. Warum reagieren die maternalen Gewebe auf die ABA-Immunmodulierung unter Kontrolle des 1Ax1-Promotors?

Die Microarray-Analyse der Genexpression zeigt eine deutliche Reaktion der maternalen Gewebe der Karyopse auf die ABA-Immunmodulierung. Dies ist unerwartet, da das anti-ABA scFv in der transgenen Linie 363 unter der Kontrolle des 1Ax1-Promotors exprimiert wird und das Protein daher in der maternalen Gewebefraktion nicht vorliegt. Zwar wurde auch im maternalen Chlorenchym eine 1Ax1-Promotoraktivität nachgewiesen, bei der manuellen Präparation der Gewebefraktionen verbleibt dieses jedoch bei der filialen Fraktion. Die verstärkte Expression einer Vielzahl von ABA-responsiven Genen weist auf einen im Vergleich zum Wildtyp erhöhten ABA-Gehalt in der maternalen Fraktion hin. Unterstützt wird diese Annahme durch die verstärkte Akkumulation von Polyaminen in den maternalen Geweben der immunmodulierten Karyopsen, denn ABA fördert die pflanzliche Polyaminakkumulation. So führt die exogene Applikation von ABA zu einer Erhöhung des Polyamin-

Levels in Zuckerrohrembryonen (Nieves *et al.*, 2001) und dem Xero-Halophyten *Atriplex halimus* (Ben Hassine *et al.*, 2009). Ein geringerer endogener ABA-Gehalt als Folge einer Mutation oder der chemischen Inhibierung der ABA-Biosynthese reduziert hingegen die Akkumulation von Polyaminen in Maiskeimlingen (Liu *et al.*, 2005).

Für einen auch in der maternalen Fraktion erhöhten ABA-Gehalt kann es mehrere Erklärungen geben. Im Folgenden sollen drei mögliche Szenarien erläutert werden.

Zusätzlich zur gesteigerten ABA-Biosynthese in den filialen Geweben der immunmodulierten Karyopsen könnten ABA und/oder ABA-Glykosylester aus vegetativen Pflanzenteilen in die filialen Kornteile importiert werden. Diese erreichen die sich entwickelnde Karyopse über die in das maternale Perikarp eingebetteten Leitbündel und müssen auf ihrem Weg in die filialen Gewebe zunächst die maternalen Gewebe auf symplastischem Wege passieren (Seo und Koshiba, 2011). Möglicherweise führt der bereits sehr hohe ABA-Gehalt in den filialen Geweben zu einem Rückstau von ABA im Perikarp und damit zu einem erhöhten ABA-Gehalt auch in den maternalen Geweben.

Andererseits ist es denkbar, dass eine verstärkte ABA-Biosynthese in den maternalen Geweben selbst zu einer Erhöhung des ABA-Gehaltes führt. ABA wird während der Samenentwicklung sowohl in maternalen als auch in filialen Geweben synthetisiert (Kanno *et al.*, 2010; Karssen *et al.*, 1983). Die Expression von Genen der ABA-Biosynthese unterscheidet sich zwischen der maternalen Fraktion der Linie 363 und dem Wildtyp nicht. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die ABA-Biosynthese bei unveränderter Enzymaktivität substratlimitiert ist. So führt die Überexpression von Genen regulatorischer Enzyme des MEP-Pathway (1-Deoxy-d-Xylulose-5-phosphat Synthase) und der Carotenoid-Biosynthese (Phytoensynthase) in Samen und Keimlingen zu einer verstärkten ABA-Akkumulation (Nambara und Marion-Poll, 2005). Neben dem Import von ABA selbst könnte auch der Import von ABA-Vorstufen eine wichtige Rolle bei der Akkumulation von ABA in den immunmodulierten Kornteilen spielen (Ren *et al.*, 2007). Auch diese müssen das Perikarp auf symplastischem Wege passieren, um die filialen Kornteile zu erreichen. Dadurch könnte die Verfügbarkeit von ABA-Vorstufen in der maternalen Fraktion gesteigert sein und zu einer Erhöhung der ABA-Biosynthese in den maternalen Kornteilen führen.

Schließlich ist es auch vorstellbar, dass ein Teil der in der filialen Fraktion synthetisierten ABA aufgrund eines starken ABA-Konzentrationsgefälles in benachbarte Gewebe entweicht. Dieser Vorgang könnte einem ähnlichen Mechanismus folgen wie das Austreten von ABA aus den Wurzeln in den Boden (ABA-*leakage*, Sauter *et al.*, 2001; Hartung *et al.*, 2002; Christmann *et al.*, 2007).

Fütterungsexperimente mit Isotopen-markierter ABA und ABA-Vorstufen können Aufschluss über die Herkunft des ABA-Überschusses in den maternalen Geweben der immunmodulierten Karyopsen geben (Else *et al.*, 2006). Bisher ist noch unklar, ob ABA auf eine polare Art und Weise zwischen Zellen transportiert wird, wie es für Auxin (Indol-3-Essigsäure) der Fall ist (Seo und Koshiba, 2011). Zusätzlich zum passiven ABA-Transport gibt es jedoch schon seit langem Hinweise auf die Existenz saturierender Komponenten (*Carrier*), die den zellulären Transport von ABA vermitteln (Windsor *et al.*, 1992; Bianco-Colomas *et al.*, 1991). Vor kurzem wurden schließlich zwei plasmamembranständige ABA-Influx- und ein ABA-Efflux-Transporter in *Arabidopsis* entdeckt und charakterisiert (Kang *et al.*, 2010; Kuromori *et al.*, 2010; Kuromori *et al.*, 2011). Auch in Suspensionskulturen von

Gerste wurden ABA-Carrier-Aktivitäten nachgewiesen (Perras *et al.*, 1994). Das zugehörige Gen oder Protein ist hingegen bis heute nicht identifiziert.

5.4.2. Im Perikarp wirken erhöhte ABA-Mengen offenbar wachstumsfördernd

In der maternalen Fraktion der Linie 363 wird besonders am 14. DAF eine Vielzahl von Genen, deren Expression auf aktive Zellteilung und Zellstreckung hinweist, stärker exprimiert als im Wildtyp. Eine starke Aktivität dieser Gene ist in diesem späten Stadium der Perikarpentwicklung ungewöhnlich. Die Expression von zellteilungsassoziierten Genen ist im maternalen Gerstenperikarp zwischen dem 0. und 4. DAF am stärksten und nimmt in der weiteren Entwicklung ab (Radchuk *et al.*, 2011). Die Zellteilungsaktivität stimmt weitgehend mit der Expression der zellteilungsassoziierten Gene überein (Radchuk *et al.*, 2011). Koordiniert mit einer geringeren Zellteilungsaktivität verringert sich während der späten Perikarpentwicklung auch die Expression von Genen, die an der Zellstreckung beteiligt sind (Radchuk *et al.*, 2011).

Lange Zeit galt ABA als allgemeiner Inhibitor pflanzlicher Wachstumsprozesse (Himmelbach *et al.*, 1998), nachdem vor fast 45 Jahren beobachtet wurde, dass ABA die DNA-Replikation in Wurzelspitzen und Embryonen von *Fraxinus excelsior* hemmt (Van Overbeek *et al.*, 1967; Villiers, 1968). Heute kennt man viele weitere Beispiele für die wachstumshemmende Wirkung von ABA. Das Hormon inhibiert das Pflanzenwachstum unter Stressbedingungen (Qin und Zeevaart, 1999; Larkindale und Knight, 2002) und gewebespezifisch unter Nicht-Stressbedingungen. Exogen applizierte ABA inhibiert die S-Phase-Progression in Kallusgewebe von Mais (Dudits *et al.*, 2011) und die ABA-Behandlung von synchronisierten Tabak BY2 G1-Zellen inhibiert die Transition von der G1- zur S-Phase (Swiatek *et al.*, 2002). Weiterhin wird die CDK-Aktivität in Luzerneblättern durch ABA-Applikation selbst in Gegenwart von Auxin und Cytokinin signifikant reduziert (Meszaros *et al.*, 2000). Anhaltspunkte für den molekularen Mechanismus der Zellteilungshemmung durch ABA lieferten Wang und Kollegen (1998), die in *Arabidopsis*-Keimlingen die Aktivierung eines CDK-Inhibitors (ICK1/KRP) durch ABA beobachteten. Die Expression dieses Gens hat eine Verringerung der Cdc2-Kinaseaktivität zur Folge (Wang *et al.*, 1998).

Auch auf die Zellelongation kann ABA eine inhibitorische Wirkung ausüben. So verringert exogene ABA die Zellstreckungsaktivitäten in Maisblättern (Cramer *et al.*, 1998), Reiskoleoptilen (Hoffmann-Benning und Kende, 1992) und embryonalen Kaffeezellen (Da Silva *et al.*, 2008).

Andererseits kann ABA die Zellteilung und das pflanzliche Wachstum in der Abwesenheit von Stress fördern. In ABA-defizienten Mutanten von Tomate und *Arabidopsis* führt die Applikation von ABA zu einem verstärkten Blatt- und Sprosswachstum (Sharp *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2003; LeNoble *et al.*, 2004; Dodd *et al.*, 2009). Dies geschieht vermutlich durch eine Limitierung der Ethylenproduktion. Antagonistische Interaktionen zwischen ABA und Ethylen beeinflussen auch in Getreiden die Zellteilung und Kornfüllung. In sich entwickelnden Reiskaryopsen sind die endospermale Zellteilungs- und Kornfüllungsrate signifikant und positiv mit dem ABA-Gehalt sowie dem Verhältnis von ABA zu ACC (einem Intermediat der Ethylenbiosynthese) korreliert (Yang *et al.*, 2006b). Die Behandlung mit Fluridon hingegen reduziert die Zellteilungsrate und Zellzahl im Reisendosperm.

Somit kann sich eine veränderte ABA-Konzentration in Abhängigkeit vom Gewebe sehr unterschiedlich auf die Zellteilung und Zellstreckung auswirken.

Über den Einfluss von ABA auf das Wachstum des maternalen Getreideperikarps lagen bisher noch keine Informationen vor. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Genexpressionsdaten weisen stark darauf hin, dass ein ABA-Überschuss während der Speicherphase eine wachstumsfördernde Wirkung auf die Perikarpzellen der Gerste hat. Auch der erhöhte Gehalt an den freien Zuckern Xylose, Arabinose und Fucose in der maternalen Gewebefraktion der Linie 363 weist auf eine höhere Dynamik in der Synthese oder Spaltung von Zellwandpolysacchariden und damit auf eine verstärkte Zellelongation hin.

5.4.3. Das Perikarp der Linie 363 zeigt eine dem programmierten Zelltod entgegenwirkende Genexpression

Der programmierte Zelltod in Pflanzen (PCD) weist viele Gemeinsamkeiten zur Apoptose in tierischen Zellen auf, wie die Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung und Freisetzung von ROS (Williams und Dickman, 2008). Zusätzlich haben viele Studien gezeigt, dass vor dem Eintreten des programmierten Zelltods das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\psi_m$) sinkt und die Erhaltung des $\Delta\psi_m$ den PCD abwenden kann (Vacca *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2004).

In der maternalen Fraktion der transgenen Linie 363 werden viele stressresponsive Gene höher exprimiert als im Wildtyp. Viele der zugehörigen Proteinprodukte sind zusätzlich zu ihrer Funktion in der pflanzlichen Stressantwort dafür bekannt, dem programmierten Zelltod entgegenzuwirken. Ein Beispiel hierfür sind die Hitzeschockproteine (HSPs). In der maternalen Fraktion der Linie 363 sind die Gene von zahlreichen HSPs verschiedener Klassen (sHSPs, HSP40, HSP70, HSP101) stärker exprimiert als im Wildtyp. HSPs akkumulieren in Pflanzen in Antwort auf Hitzestress und viele Studien korrelierten die Expression von HSPs mit der Entwicklung von Thermotoleranz (Zusammenfassung in Huang und Xu, 2008). Zusätzlich werden spezifische kleine HSPs (sHSP) in reifenden Samen auch in Abwesenheit von Stress exprimiert (Wehmeyer *et al.*, 1996). Die Expression einiger sHSPs (Colmenero-Flores *et al.*, 1997) aber auch einiger HSP70 (Cho und Hong, 2006) wird durch ABA induziert. In Tieren spielen HSP70 eine antiapoptotische Rolle. Einerseits binden HSP70 direkt an APAF-1 und inhibieren die Bildung der Apoptosomen (Saleh *et al.*, 2000). Andererseits interagieren HSP70 mit Mitgliedern der BCL-2 Familie, stabilisieren das mitochondriale Membranpotential $\Delta\psi_m$ und inhibieren die Freisetzung von Cytochrom C, Endonucleasen und dem Apoptose-induzierenden Faktor aus den Mitochondrien in das Cytosol (Beere, 2004; Stankiewicz *et al.*, 2005). Diese antiapoptotische Rolle von HSP70 in Tieren ist gut beschrieben, aber es gibt wenige Informationen über eine ähnliche Rolle in Pflanzen. Cronjé *et al.* (2004) zeigten, dass die Akkumulation von HSP70/HSC70 in Tabak-Protoplasten negativ mit dem PCD korreliert ist. Weiterhin hat eine Verringerung des $\Delta\psi_m$ in mehreren Mais-Mutanten mit mitochondrialer Dysfunktion die verstärkte Expression von molekularen Chaperonen und HSPs verschiedener Klassen zur Folge, welche die Stresstoleranz der Zellen erhöhen und deren Überleben ermöglichen (Kuzmin *et al.*, 2004). In Tabak führte die Expression eines Einzelketten-Antikörpers gegen sHSPs bereits bei mildem Hitzestress zum Zelltod (Miroshnichenko *et al.*, 2005). Weiterhin induziert ein milder

Hitzeshock in *Arabidopsis*-Suspensionskulturen die Expression von HSP101, HSP70 und sHSPs, die vermutlich eine antiapoptotisch wirken und die Zellen vor einem durch größere Hitze induzierten Zelltod schützen (Rikhvanov *et al.*, 2007). Ein drastischer Hitzeshock hingegen reguliert die Synthese von HSP60 hoch. Die Freisetzung dieser pro-apoptotischen HSPs aus den Mitochondrien ins Cytosol spielt eine Rolle bei der Einleitung des programmierten Zelltodes (Rikhvanov *et al.*, 2007). Unter der Vielzahl der in der Linie 363 hochregulierten HSP-Gene befindet sich keine HSP60-Sequenz. Schließlich unterdrückt die Überexpression des mitochondrialen Hitzeshockproteins mtHSP70 den Hitze- und H₂O₂-induzierten Zelltod in Reis-Protoplasten (Qi *et al.*, 2011). Die Autoren vermuten, dass miHSP70 nicht nur ein hitzespezifischer sondern ein universeller Faktor in der negativen Regulation des PCD in Reisprotoplasten ist.

Der programmierte Zelltod geht mit der Bildung von ROS einher. Die Entgiftung von H₂O₂ verzögert den PCD im Weizenaleuron während die H₂O₂-Akkumulation den Zelltod beschleunigt (Wu *et al.*, 2011). Pflanzen verfügen über effiziente enzymatische und nicht-enzymatische antioxidative Abwehrsysteme, die bei der Kontrolle der ROS-Level zusammenwirken und Zellen vor oxidativem Schaden schützen. Zur enzymatischen ROS-Abwehr gehören Glutathion-S-Transferasen, die Ascorbat-Peroxidase sowie eine Vielzahl anderer Peroxidasen (Gill und Tuteja, 2010). Diese Enzyme werden in der maternalen Fraktion der Linie 363 auf Transkriptionsebene stärker exprimiert als in den entsprechenden Wildtyp-Geweben, wobei einige Enzymklassen durch mehrere hochregulierte Gene vertreten sind (siehe Tab. 8). ABA erhöht zusätzlich die Aktivität antioxidativer Enzyme wie Peroxidasen und Ascorbat-Peroxidase bei Stress (Berli *et al.*, 2010). Die Ascorbat-Peroxidase ist das wichtigste Enzym bei der Beseitigung von ROS in höheren Pflanzen. Sie hat eine höhere Affinität zu H₂O₂ als Katalasen und die meisten Peroxidasen (Gill und Tuteja, 2010). Die Glutathion-S-Transferasen bilden eine große und diverse Gruppe von Enzymen, die die Konjugation von elektrophilen Xenobiotika an das Tripeptid Glutathion katalysieren und sind ebenfalls an der Regulation des PCD beteiligt (Überblick bei Gill und Tuteja, 2010). Anders als vier weitere in der maternalen Fraktion der Linie 363 hochregulierte Peroxidasegene ist das Gen der Gerstenkorn-Peroxidase BP1 niedriger exprimiert als im Wildtyp. Jedoch wurde gezeigt, dass der BP1-Proteinlevel nicht durch Transkription reguliert (March *et al.*, 2007) und die BP1-Aktivität auf Proteinebene kontrolliert wird (Rasmussen *et al.*, 1998).

Zur nicht-enzymatischen ROS-Abwehr gehören Carotenoide, Flavonoide und phenolische Komponenten. Die Expression vieler Flavonoid-Biosynthesegene ist in den maternalen Geweben der Linie 363 am 10. und 14. DAF erhöht. Hierzu gehören die Gene einer Chalcon-Synthase, einer Isoflavon-Reduktase, einer Flavonol-Synthase, einer Ferulat-5-Hydroxylase sowie einer 4-Cumarat-CoA Ligase (Tab. 8). Flavonoide gehören zu den am stärksten bioaktiven pflanzlichen Sekundärmetaboliten. Die meisten Flavonoide übertreffen bekannte Antioxidantien wie Ascorbinsäure und α -Tocopherol in der Beseitigung von ROS und freien Radikalen (Gill und Tuteja, 2010).

ABA beeinflusst den PCD stark gewebespezifisch. Sie beschleunigt die apoptotische DNA-Fragmentierung in Koleoptilen von Weizenkeimlingen (Vanyushin *et al.*, 2004). In den Perigonblättern von Taglilien ruft ein erhöhter ABA-Gehalt vorzeitige Seneszenz und Zelltod hervor (Rubinstein, 2000). Andererseits inhibiert ABA den PCD in sich entwickelnden Gerstenantheren

(Wang *et al.*, 1999). Eine wichtige Rolle für die Regulation des PCD spielt das Verhältnis von ABA zu anderen Phytohormonen. Hohe Cytokinin-Konzentrationen blockieren die Zellproliferation und induzieren den programmierten Zelltod in Möhren- und *Arabidopsis*-Zellkulturen (Carimi *et al.*, 2003). Abscisinsäure verhindert den Cytokinin-induzierten Zelltod. Bei Epidermiszellen über Adventivwurzelpseudostämmen von Reis wird der PCD hingegen durch Ethylen und GA induziert, während ABA den Zelltod verzögert (Steffens und Sauter, 2005). Eine ähnliche Wirkung zeigt ABA in filialen Geweben von Getreidekaryopsen. Im sich entwickelnden Endosperm von ABA-insensitiven *vp1*- und ABA-defizienten *vp9*-Maismutanten ist das Einsetzen und Fortschreiten des PCD beschleunigt (Young und Gallie, 2000). Gleichzeitig ist der Ethylengehalt dieser Karyopsen erhöht. In der Aleuronschicht keimender Gersten- (Wang *et al.*, 1996) und Weizenkörner (Wu *et al.*, 2011) hingegen stimuliert Gibberellinsäure den programmierten Zelltod, während ABA diesen Prozess unterdrückt. ABA-behandelte Aleuron-Protoplasten können für mehr als sechs Monate am Leben erhalten werden, während eine GA-Behandlung innerhalb weniger Tage zum Tod der meisten Zellen führt (Fath *et al.*, 1999).

Bisher liegen keine Studien über den Einfluss von ABA auf den programmierten Zelltod in Getreide-Perikarp vor. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Microarray-Analyse der Genexpression weist stark auf eine antiapoptotische Wirkung erhöhter ABA-Konzentrationen in den maternalen Geweben sich entwickelnder Gerstenkaryopsen hin.

5.4.4. Die Stärkeremobilisierung in den maternalen Geweben wird vermutlich durch ABA gefördert

Das maternale Perikarp erfüllt während der Gerstenkaryopsenentwicklung eine Funktion als Stärke-Zwischenspeicher. Transiente Stärke wird während der frühen Samenentwicklung synthetisiert (Weschke *et al.*, 2000; Sreenivasulu *et al.*, 2004) und bereits ab dem 3. DAF remobilisiert (Radchuk *et al.*, 2009). In der transgenen Linie 363 wird am 10. und 14. DAF in der maternalen Gewebefraktion das β -Amylase-Gen *BAM1* niedriger exprimiert als im Wildtyp, während *BAM2* am 14. DAF hochreguliert ist. *BAM1* wird jedoch im Perikarp im Vergleich zu *BAM2* nur äußerst schwach exprimiert. In einigen Gerstenkultivaren (z.B. Barke) wurde in den maternalen Geweben der sich entwickelnden Karyopsen keine *BAM1*-mRNA gefunden (Radchuk *et al.*, 2009). Daher spielt dieses Enzym im Perikarp offensichtlich eine untergeordnete Rolle. Die Stärkeremobilisierung in den maternalen Geweben der Linie 363 ist daher am 14. DAF vermutlich beschleunigt.

In sich entwickelnden Gerstenkaryopsen beginnt der erste *Peak* der ABA-Akkumulation bereits mit der Anthese (0. DAF, Sreenivasulu *et al.*, 2010b). Bis zum 4. DAF bleibt der ABA-Gehalt sowohl in der maternalen als auch in der filialen Fraktion auf hohem Niveau und fällt anschließend steil ab. Da der spätere *Peak* während der Reifungsphase der Samenentwicklung nicht auf eine maternale ABA-Synthese zurückgeht (Finkelstein *et al.*, 2008), findet die höchste ABA-Akkumulation im Wildtyp-Perikarp vermutlich während der ersten vier Tage nach der Anthese statt. Der hohe ABA-Gehalt in den sich entwickelnden Karyopsen könnte daher am 14. DAF im Perikarp zur Förderung von Prozessen führen, die in diesem Gewebe für ein jüngeres Stadium typisch sind. Hierzu gehören eine

verstärkte Zellteilung und Zellstreckung, aber auch die Remobilisierung transient gespeicherter Stärke und die Unterdrückung des programmierten Zelltods.

5.5. Die Sensitivität gegenüber ABA ist in den immunmodulierten Karyopsen während der späten Kornentwicklung möglicherweise verringert.

Am 10. und 14. DAF zeigen sowohl die filialen als auch die maternalen Gewebe der immunmodulierten Karyopsen eine starke transkriptionelle und metabolische Reaktion auf den veränderten ABA-Gehalt. Hingegen gibt es bereits am 20. DAF kaum noch Unterschiede zwischen den Karyopsen der Linie 363 und dem Wildtyp, obwohl der Gehalt an freier ABA in den immunmodulierten Karyopsen weiter steigt. Interessanterweise gibt es mehrere Hinweise auf eine Repression der ABA-Signalweiterleitung:

Stickstoffmonoxid (NO) trat in den letzten Jahren als wichtiges endogenes Signalmolekül in Pflanzen hervor, das viele physiologische Prozesse beeinflusst (Neill *et al.*, 2008). Beispiele hierfür sind die Spaltöffnungsbewegung und die pflanzliche Pathogenabwehr. Weiterhin dient dieses kleine Molekül als Koregulator bei vielen Entwicklungsprozessen wie der Blütenbildung, der Keimung oder dem Zelltod. Die Synthese von NO wird durch das Phytohormon ABA stimuliert (Neill *et al.*, 2008). Lozano-Juste und Leon (2010a) zeigten an der *Arabidopsis nia1nia2noa1-2* Dreifachmutante, die selbst nach ABA-Induktion keine detektierbaren NO-Mengen produziert, dass NO die Sensitivität gegenüber ABA während des gesamten pflanzlichen Lebenszyklus verringert. Bei den Samen von NO-defizienten Pflanzen wurde eine verstärkte Dormanz und eine geringere Samenkeimung und Keimlingsetablierung als bei Wildtyp-Samen beobachtet. Die Pflanzen zeigten ein vermindertes Wachstum, eine erhöhte Expression ABA-induzierbarer Gene sowie eine starke Resistenz gegenüber Wassermangelbedingungen durch effizientere Spaltöffnungsschließung und geringe Transpiration (Lozano-Juste und Leon, 2010a). Diese Effekte können durch exogene NO-Applikation revertiert werden, was vermuten lässt, dass die Sensitivität gegenüber ABA durch das endogene NO-Level kontrolliert wird. Der genaue Mechanismus dieses Zusammenspiels ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Jedoch berichteten Lozano-Juste und Leon (2010b), dass einige SnRKs und PYR/PYL/RCAR Rezeptoren auf verschiedenen Ebenen durch NO reguliert werden. Die Expression einer Nitratreduktase ist sowohl in der maternalen als auch in der filialen Fraktion der Linie 363 im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Die Nitratreduktase ist ein äußerst kurzlebige Protein mit einer Halbwertszeit von nur wenigen Stunden. Daher ist die Rate der *de novo* Synthese dieses Enzyms sehr hoch. Die Enzymsynthese wird auf der Ebene der Genexpression reguliert (Campbell, 1999; Heldt und Heldt, 2005). Die Nitratreduktase leistet in *Arabidopsis* einen signifikanten Beitrag zur NO-Biosynthese (Lozano-Juste und Leon, 2010a). Zusätzlich stimulieren hypoxische Bedingungen, wie sie in sich entwickelnden Samen herrschen, die NO-Produktion durch die Nitratreduktase (Rockel *et al.*, 2002; Neill *et al.*, 2008). Es ist somit denkbar, dass in den sich entwickelnden immunmodulierten Gerstensamen die ABA-Sensitivität durch eine verstärkte NO-Produktion gesenkt wird. Dies kann zur Anpassung an den stark erhöhten ABA-Gehalt beitragen.

Weiterhin ist in der filialen Fraktion der Linie 363 die Expression eines Gerstenhomologen zu AtMFT (Mother of FT) hochreguliert. AtMFT wird stark in sich entwickelnden Samen und dem Embryo

während der Samenkeimung exprimiert (Xi *et al.*, 2010). Die Funktion dieses Proteins wurde jedoch bisher nur in keimenden Samen näher untersucht. Die MFT-Expression wird sowohl durch exogene als auch durch endogene ABA stark hochreguliert. Dies geschieht direkt durch ABI3 und ABI5, zwei Schlüsselfaktoren der ABA-Signalweiterleitung (Xi *et al.*, 2010). MFT wiederum übt durch die direkte Repression von ABI5 eine negative *Feedback*-Regulation auf die ABA-Signalweiterleitung aus. Ist der ABA-Gehalt hoch, so fördert ABI5 direkt die Expression von MFT, welches wiederum direkt die Expression von ABI5 reprimiert und somit unter bestimmten Umständen die Samenkeimung selbst bei hohem ABA-Gehalt ermöglicht (Xi *et al.*, 2010). *Mft* loss-of-function Mutanten zeigen eine Hypersensitivität gegenüber ABA. Weiterhin dient MFT offenbar als Konvergenzpunkt in der Signalweiterleitung verschiedener Faktoren, denn die zu ABA antagonistische Wirkung von GA und BR wird zumindest teilweise durch die MFT-vermittelte Repression von ABI5 herbeigeführt (Xi *et al.*, 2010; Xi und Yu, 2010). Daher senkt die verstärkte MFT-Expression in den filialen Geweben der Linie 363 möglicherweise die Sensitivität gegenüber ABA.

In der filialen Fraktion sind zwischen dem 10. und 20. DAF neun Gene hochreguliert, die für Ubiquitin, Untereinheiten des 26S-Proteasoms oder Untereinheiten von E3 Ubiquitin-Ligasekomplexen (z.B. RING-H2 Finger Proteine, F-Box Proteine) codieren. In der maternalen Fraktion sind zehn dieser Gene zwischen dem 7. und 14. DAF hochreguliert. Bestandteile des Ubiquitin-Systems haben Einfluss auf die ABA-Sensitivität von Pflanzen. In *Arabidopsis* wirken mehrere RING Finger E3 Ubiquitinligasen als negative Regulatoren der ABA-Signalweiterleitung, indem sie die Konzentration wichtiger Faktoren der ABA-Signalweiterleitung direkt kontrollieren. So markiert AtKEG den bZIP-Transkriptionsfaktor ABI5 durch Ubiquitinierung für den Abbau im 26S Proteasom (Stone *et al.*, 2006). AtAIP2 polyubiquitiniert den B3-Transkriptionsfaktor ABI3 (Zhang *et al.*, 2005). In Reis markiert die RING Finger E3 Ligase OsDSG1 das zu AtABI3 Orthologe OsABI3 (Park *et al.*, 2010). Die Überexpression der RING Finger Proteine führt zu einer verminderten Sensitivität gegenüber ABA, während T-DNA Insertionsmutanten ABA-hypersensitiv sind (Zhang *et al.*, 2005; Stone *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2010).

GABA (γ -Aminobuttersäure) ist eine ubiquitär vorkommende nichtproteinogene Aminosäure. Obwohl zuerst in Pflanzen entdeckt (Steward *et al.*, 1949), wurde GABA viel Aufmerksamkeit in Säugetieren zuteil, wo es wichtige Rollen in der Signaltransduktion der Nerven und der Gehirnentwicklung spielt (Owens und Kriegstein, 2002; Represa und Ben-Ari, 2005). In Pflanzen wurde GABA hauptsächlich als Metabolit mit Funktionen in der anaplerotischen Auffüllung des Citratcyclus und der Kontrolle des C/N-Gleichgewichtes untersucht (zusammengefasst in Fait *et al.*, 2008). Jedoch häufen sich die Hinweise, dass GABA auch in Pflanzen eine Rolle als Signalmolekül spielt. GABA akkumuliert in Pflanzen in großen Mengen in Reaktion auf biotische oder abiotische Stressfaktoren (Kinnersley und Turano, 2000). Die Folgen einer GABA-Akkumulation sind bis heute wenig verstanden. Es wurde gezeigt, dass GABA die Expression des Nitrat-Transporters 2 in Raps stimuliert (Beuve *et al.*, 2004) und die Expression verschiedenerer 14-3-3-Gene in *Arabidopsis* in einer Ca^{2+} -, Ethylen- und ABA-abhängigen Weise unterdrückt (Lancien und Roberts, 2006). Roberts (2007) berichtete als Erster über den Einfluss von exogener GABA auf das Transkriptom von *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen. Jedoch konzentrierte sich diese Studie nicht auf die Identität der Gene, die eine Antwort auf GABA zeigen. In

der filialen Fraktion der Linie 363 ist zwischen dem 7. und 14. DAF der GABA-Gehalt im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Der veränderte GABA-Gehalt geht am 10. DAF mit einer verstärkten Expression des Glutamatdecarboxylase-Gens in beiden Gewebefractionen einher. Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von Glutamat zu GABA. Obwohl GABA die Expression der ACC Synthase (ACS), eines Enzyms der Ethylenbiosynthese, in Sonnenblume induziert (Kathiresan *et al.*, 1997), ist die Expression der ACS in der filialen Fraktion der immunmodulierten Gerstenkaryopsen unverändert (Tab. 8). Auch Renault *et al.* (2011) fanden keine veränderte ACS-Expression in *pop3*-Keimlingen. Die *Arabidopsis pop3*-Mutante akkumuliert große Mengen GABA, da es ihr an einer GABA abbauenden Transaminase mangelt. Daher spekulierten die Autoren, dass ABA vermutlich einen größeren Einfluss auf die Modulierung von GABA-Effekten hat als Ethylen. Interessanterweise erfüllt das in *pop2-1* Keimlingen am stärksten reprimierte Gen (Renault *et al.*, 2011) eine wichtige Funktion in der ABA-Antwort. Hierbei handelt es sich um das wurzelspezifisch exprimierte Arabinogalactan-Protein 30 (AtAGP30). Die *agp30*-Mutante zeigt eine Suppression der ABA-induzierten Keimungsverzögerung sowie eine verringerte Genexpression einiger ABA-regulierter Gene (van Hengel und Roberts, 2003). Möglicherweise wird durch die Akkumulation von GABA und die damit verbundene Repression von Komponenten der ABA-Signalweiterleitung eine geringere ABA-Sensitivität erreicht.

Eine Repression der ABA-Antwort während der späten Karyopsenentwicklung könnte zur Normalisierung des Metabolismus und der Kornentwicklung führen. Dies kann erklären, warum es am 20. DAF kaum noch Unterschiede in der Genexpression und den Metabolitgehalten zwischen den Karyopsen der Linie 363 und dem Wildtyp gibt und das Tausendkorngewicht der reifen immunmodulierten Karyopsen nicht vom Wildtypwert abweicht. In Getreidekörnern ist eine ABA-Akkumulation, deren Verlauf und Stärke der in den immunmodulierten Linien ähnelt, von keinem natürlichen Prozess her bekannt. Dies weist darauf hin, dass durch die Immunmodulierung Mechanismen zur Regulation des ABA-Gehaltes umgangen werden. Trotzdem wurde in den immunmodulierten Linien eine weitgehend normale Samenentwicklung beobachtet, die zur Bildung keimungsfähiger Diasporen führt.

Als sessile Lebewesen sind Pflanzen für eine große Flexibilität bei der physiologischen Adaptierung an externe Stressoren bekannt (Des Marais und Juenger, 2010). Diese physiologische Plastizität gilt offenbar auch für die Anpassung an endogene Störfaktoren.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Pflanzenhormons Abscisinsäure (ABA) auf die maternalen und filialen Gewebe der Gerstenkaryopse während der Kornentwicklung untersucht.

Gerstenpflanzen vom Kultivar 'Igri' wurden durch die Expression eines anti-ABA Einzelkettenantikörpers (scFv) samenspezifisch bzw. ubiquitär immunmoduliert. Die samenspezifische Expression erfolgte unter der Kontrolle des 1Ax1-Promotors aus Weizen und setzte mit dem Beginn der Speicherphase am 7. Tag nach der Blüte (DAF) ein. Die ubiquitäre Immunmodulierung wurde durch den Ubiquitin-Promotor aus Mais reguliert. Stabile, homozygote Gerstenlinien wurden durch die Transformation androgenetischer Pollenkulturen und die Nutzung der Doppelhaploiden-Technik erzeugt. Für jedes Promotorkonstrukt wurden je drei Linien für eine eingehende Untersuchung ausgewählt.

Der anti-ABA scFv aus Gerste bindet mit einer Dissoziationskonstante K_D von $2,08 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ hochspezifisch an freies ABA. Aus der Dissoziationskonstante sowie den ermittelten Gesamt-ABA- und scFv-Gehalten der sich entwickelnden Karyopsen wurde der Gehalt an antikörpergebundener bzw. frei vorliegender Abscisinsäure berechnet. Alle immunmodulierten Gerstenlinien weisen unabhängig vom verwendeten Promotor einen stark erhöhten Gehalt an freier Abscisinsäure in sich entwickelnden und reifen Karyopsen auf. Dieser Effekt ist am stärksten in der 1Ax1-Promotor-Linie 363 ausgeprägt, deren reife Karyopsen 38-mal so viel freie ABA enthalten wie Wildtyp-Körner. Während im Wildtyp die größte ABA-Akkumulation am 14. DAF stattfindet, steigt der ABA-Gehalt in den Karyopsen aller immunmodulierten Linien über den gesamten Entwicklungszeitraum hinweg kontinuierlich an. In Getreidekörnern ist eine ABA-Akkumulation, deren Verlauf und Stärke der in den immunmodulierten Linien ähnelt, von keinem natürlichen Prozess her bekannt. Dies weist darauf hin, dass durch die Immunmodulierung Mechanismen zur Regulation des ABA-Gehaltes umgangen werden.

Der vegetative Phänotyp der anti-ABA immunmodulierten Pflanzen unterscheidet sich weder bei der samenspezifischen noch bei der ubiquitären Immunmodulierung von dem des Wildtyps. Immunmodulierte Karyopsen zeigen jedoch einen unterschiedlich stark ausgeprägten „Knick“-Phänotyp, der auf das Fehlen von Zellen im zentralen Teil des Stärke-Endosperms zurückzuführen ist. Die Penetranz dieses Phänotyps unterscheidet sich stark zwischen den untersuchten Linien.

Die Keimung ist in allen immunmodulierten Linien im Vergleich zum Wildtyp verzögert. Jedoch wird die Vitalität der Embryonen durch die Immunmodulierung nicht beeinträchtigt.

Das Tausendkorngewicht der reifen Körner unterschied sich bei einer Pflanzenanzucht unter feldähnlichen Bedingungen in allen transgenen Linien nicht vom Wildtyp-Wert. Auch die Stärke- und Speicherprotein- sowie die Gesamtkohlenstoff- und Gesamtstickstoffgehalte reifer Karyopsen waren bei drei unabhängig voneinander angezogenen Pflanzengruppen im Vergleich zum Wildtyp unverändert. Sich entwickelnde Karyopsen hingegen zeigen vielfältige Reaktionen auf die ABA-Immunmodulierung. In den Karyopsen aller transgenen Linien lagen am 14. DAF viele Aminosäuren in geringerer Konzentration vor als im Wildtyp. Ebenso wurde für den 14. DAF ein signifikant erhöhtes Saccharose/Hexose-Verhältnis bestimmt, welches ein Indikator für den Entwicklungszustand

der Karyopsen ist. Dies ist auf eine signifikante Reduzierung des Hexosegehaltes bei unverändertem Saccharosegehalt zurückzuführen.

Zur Bestimmung von Metabolitgehalten sowie zur umfassenden Genexpressionsanalyse unter Verwendung des 4x44K *Barley Gene Expression Microarray* wurde die 1Ax1-Promotor-Linie 363 ausgewählt. Karyopsen vom 7., 10. und 14. DAF wurden in eine filiale und eine maternale Gewebefraktion dissektiert, während Proben vom 20. DAF von der Gesamtkaryopse stammen. Die Metabolit- sowie die Microarray-Analyse zeigen die größten Unterschiede zwischen der Linie 363 und dem Wildtyp am 10. und 14. DAF. Die Erhöhung des freien ABA-Gehaltes führt in den immunmodulierten Karyopsen zu einer umfangreichen Hochregulation der Genexpression. In beiden Gewebefraktionen ist eine Vielzahl von Genen betroffen, die an der Stressantwort und der Signalweiterleitung beteiligt sind. In der filialen Fraktion zeigen zahlreiche mit der Protein- und Stärkespeicherung assoziierte Gene eine im Vergleich zum Wildtyp veränderte Expression. In der maternalen Fraktion ist ein großer Teil der differentiell exprimierten Gene an der Zellteilung und Zellstreckung beteiligt. Weiterhin zeigt die maternale Gewebefraktion eine dem programmierten Zelltod entgegenwirkende Genexpression. Dies weist darauf hin, dass der hohe ABA-Gehalt in den sich entwickelnden Karyopsen während der späten Perikarpenwicklung zur Förderung von Prozessen führt, die in diesem Gewebe für ein jüngeres Stadium typisch sind.

Am 20. DAF unterscheiden sich Transkriptom und Metabolite in den immunmodulierten Karyopsen kaum noch vom Wildtyp. Die Microarray-Analyse der Genexpression liefert mehrere Hinweise darauf, dass eine Repression der ABA-Antwort während der späten Karyopsenentwicklung zur Normalisierung des Metabolismus und der Kornentwicklung führt. Faktoren, die vermutlich die Repression der ABA-Antwort bedingen, sind Stickstoffmonoxid, die MFT-vermittelte Signalweiterleitung, die Modulation des Ubiquitin-vermittelten Proteinabbaus und die GABA-vermittelte Signalweiterleitung.

Damit deuten die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten auf eine große physiologische Plastizität sich entwickelnder Gerstenkaryopsen hin, welche die Adaptation von Stoffwechsel und Entwicklung an die unnatürlich hohen ABA-Gehalte ermöglicht.

Summary

In this work the influence of the plant hormone abscisic acid (ABA) on the maternal and filial tissues of barley grains was investigated during grain development. Therefor barley cv. 'Igri' plants were immunomodulated either ubiquitously or grain specifically by the expression of an anti-ABA single chain variable fragment (scFv). Grain specific expression was achieved under the control of the wheat 1Ax1 promoter showing activity from the beginning of the seed storage phase around the 7th day after flowering (DAF) onwards. The ubiquitous expression was regulated by the maize Ubiquitin promoter. Stable homozygous barley lines were generated by the transformation of androgenic pollen cultures followed by genome duplication. For detailed analyses three lines for each promoter construct were chosen.

The anti-ABA scFv from barley binds with a dissociation constant K_D of $2,08 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ highly specifically to ABA. From the dissociation constant and the total ABA and scFv content of the developing caryopses the content of antibody-bound and free ABA, respectively, was calculated. Independently of the promoter used, all immunomodulated barley lines show a highly elevated level of free ABA in developing and ripe grains. This effect is most pronounced in the 1Ax1-promoter line 363, where ripe caryopses contain 38 times as much ABA as wild type grains. While in wild type grains the highest ABA accumulation occurs at 14th DAF, the ABA content in caryopses of all immunomodulated lines increases continuously throughout the entire development. In cereal grains an ABA accumulation similar to that of the immunomodulated lines is not known from any natural process. This suggests that mechanisms for ABA level regulation are circumvented by immunomodulation.

The vegetative phenotype of the anti-ABA immunomodulated plants does not differ from wild type, even in Ubiquitin-promoter lines. Some of the immunomodulated caryopses, however, show a 'kink' phenotype with variable expressivity, which is due to a lack of cells in the central part of the starchy endosperm. The penetrance of this phenotype differs strongly between the lines investigated.

The germination is delayed in all immunomodulated lines compared to wild type. Nevertheless the vitality of the embryo is not impaired by the ABA-immunomodulation.

The thousand grain weight of plants grown under field-near conditions did not differ from that of the wild type. Also the starch and storage protein contents of ripe grains were unchanged in three batches of transgenic plants grown independently from each other. Accordingly, the total carbon and total nitrogen contents of ripe grains were not altered. Developing caryopses, however, show multiple reactions to the ABA-immunomodulation. At 14th DAF in the immunomodulated grains of all lines the concentration of many amino acids was lower than in wild type. Furthermore a significantly higher sucrose/hexose ratio was determined for immunomodulated grains 14th DAF, which serves as indicator for the developmental state of the caryopses. This is due to a significant reduction of the hexose content but unaltered sucrose concentrations.

For both metabolite measurements and a comprehensive gene expression analysis using the '4x44K Barley Gene Expression Microarray' the 1Ax1 promoter line 363 was chosen. Caryopses of the 7th, 10th and 14th DAF were dissected into the maternal and the filial fraction whereas for the 20th DAF entire caryopses were used. The metabolite and microarray analyses show the main differences

between line 363 and wild type at the 10th and 14th DAF. The elevated ABA level leads to a broad upregulation of gene expression. In both tissue fractions multiple genes are affected, which are involved in stress response and signal transduction. Additionally in the filial fraction numerous genes associated with storage protein and starch accumulation show a higher expression than in wild type. In the maternal fraction a considerable number of differentially expressed genes is involved in cell division and cell elongation. Furthermore the maternal fraction shows a gene expression which antagonizes programmed cell death. This indicates that the high ABA-level in the immunomodulated grains during late pericarp development leads to a promotion of processes, which are characteristic for a younger developmental stage of this tissue.

At 20th DAF the immunomodulated grains differ hardly from wild type. The microarray analysis of gene expression suggests that a repression of the ABA response during late stages of grain development leads to a normalization of the metabolism and development of the caryopses. Factors, which probably account for a repression of the ABA response are nitric oxide, MFT mediated signaling, the modulation of Ubiquitin mediated protein degradation and GABA signaling.

This work suggests that developing barley caryopses possess a high degree of physiological plasticity which allows the adaptation to unnaturally high ABA contents.

7. Literatur

- Acharya BR, Assmann SM** (2009) Hormone interactions in stomatal function. *Plant Molecular Biology* **69**: 451-462
- Allan AC, Fricker MD, Ward JL, Beale MH, Trewavas AJ** (1994) Two Transduction Pathways Mediate Rapid Effects of Abscisic Acid in Commelina Guard Cells. *Plant Cell* **6**: 1319-1328
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ** (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410
- An YQ, Lin L** (2011) Transcriptional regulatory programs underlying barley germination and regulatory functions of Gibberellin and abscisic acid. *BMC Plant Biol* **11**: 105
- Anderson BE, Ward JM, Schroeder JI** (1994) Evidence for an Extracellular Reception Site for Abscisic Acid in Commelina Guard Cells. *Plant Physiology* **104**: 1177-1183
- Arend M, Schnitzler J-P, Ehlting B, Hansch R, Lange T, Rennenberg H, Himmelbach A, Grill E, Fromm J** (2009) Expression of the Arabidopsis mutant *abi1* gene alters ABA sensitivity, stomatal development and growth morphology in Grey poplars (*Populus x canescens* (Ait.) Sm.). *Plant Physiology*
- Artsaenko O, Peisker M, zur Nieden U, Fiedler U, Weiler EW, Muntz K, Conrad U** (1995) Expression of a single-chain Fv antibody against abscisic acid creates a wilted phenotype in transgenic tobacco. *Plant J* **8**: 745-750
- Avonce N, Leyman B, Mascorro-Gallardo JO, Van Dijck P, Thevelein JM, Iturriaga G** (2004) The Arabidopsis trehalose-6-P synthase *AtTPS1* gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. *Plant Physiology* **136**: 3649-3659
- Ay N, Clauss K, Barth O, Humbeck K** (2008) Identification and characterization of novel senescence-associated genes from barley (*Hordeum vulgare*) primary leaves. *Plant Biol (Stuttg)* **10 Suppl 1**: 121-135
- Barber D, Sanchez-Monge R, García-Olmeda F, Salcedo G, Méndez E** (1986) Evolutionary implications of sequential homologies among members of the trypsin / [alpha]-amylase inhibitor family (CM-proteins) in wheat and barley. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **873**: 147-151
- Bari R, Jones JD** (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* **69**: 473-488
- Barrero JM, Piqueras P, Gonzalez-Guzman M, Serrano R, Rodriguez PL, Ponce MR, Micol JL** (2005) A mutational analysis of the *ABA1* gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development. *Journal of Experimental Botany* **56**: 2071-2083
- Barrero JM, Rodriguez PL, Quesada V, Piqueras P, Ponce MR, Micol JL** (2006) Both abscisic acid (ABA)-dependent and ABA-independent pathways govern the induction of *NCED3*, *AAO3* and *ABA1* in response to salt stress. *Plant, Cell & Environment* **29**: 2000-2008
- Bartels D, Thompson R** (1986) Synthesis of messenger-RNAs coding for abundant endosperm proteins during wheat grain development. *Plant Science* **46**: 117-125
- Bäumlein H, Wobus U, Pustell J, Kafatos FC** (1986) The legumin gene family: structure of a B type gene of *Vicia faba* and a possible legumin gene specific regulatory element. *Nucleic Acids Res* **14**: 2707-2720

- Beere HM** (2004) "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci* **117**: 2641-2651
- Ben Hassine A, Ghanem ME, Bouzid S, Lutts S** (2009) Abscisic acid has contrasting effects on salt excretion and polyamine concentrations of an inland and a coastal population of the Mediterranean xero-halophyte species *Atriplex halimus*. *Annals of Botany* **104**: 925-936
- Benjamini Y, Hochberg Y** (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **57**: 289-300
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L** (2003) Stryer Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin
- Berli FJ, Moreno D, Piccoli P, Hespanhol-Viana L, Silva MF, Bressan-Smith R, Cavagnaro JB, Bottini R** (2010) Abscisic acid is involved in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaf tissues to ultraviolet-B radiation by enhancing ultraviolet-absorbing compounds, antioxidant enzymes and membrane sterols. *Plant, Cell & Environment* **33**: 1-10
- Beuve N, Rispail N, Laine P, Cliquet JB, Ourry A, Le Deunff E** (2004) Putative role of γ -aminobutyric acid (GABA) as a long-distance signal in up-regulation of nitrate uptake in *Brassica napus* L. *Plant, Cell & Environment* **27**: 1035-1046
- Bianco-Colomas J, Barthe P, Orlandini M, Le Page-Degivry MT** (1991) Carrier-Mediated Uptake of Abscisic Acid by Suspension-Cultured *Amaranthus tricolor* Cells. *Plant Physiology* **95**: 990-996
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP** (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* **19**: 185-193
- Borg H, Grimes DW** (1986) Depth development of roots with time - an empirical description. *Transactions of the Asae* **29**: 194-197
- Borisjuk L, Rolletschek H, Radchuk R, Weschke W, Wobus U, Weber H** (2004) Seed development and differentiation: a role for metabolic regulation. *Plant Biol (Stuttg)* **6**: 375-386
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Brady SM, Song S, Dhugga KS, Rafalski JA, Benfey PN** (2007) Combining expression and comparative evolutionary analysis. The COBRA gene family. *Plant Physiology* **143**: 172-187
- Brandt A, Svendsen I, Hejgaard J** (1990) A plant serpin gene. Structure, organization and expression of the gene encoding barley protein Z4. *Eur J Biochem* **194**: 499-505
- Brunori A, Forino L, Frediani M, Ruberti F** (1993) Cell number and polyploidy in the starchy endosperm of *Triticum*. *J. Genet. Breed.* **47**: 217-220
- Buchanan CD, Lim S, Salzman RA, Kagiampakis I, Morishige DT, Weers BD, Klein RR, Pratt LH, Cordonnier-Pratt MM, Klein PE, Mullet JE** (2005) Sorghum bicolor's transcriptome response to dehydration, high salinity and ABA. *Plant Molecular Biology* **58**: 699-720
- Campbell WH** (1999) Nitrate Reductase Structure, Function and Regulation: Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 277-303

- Carbonero P, Salcedo R, Sanchez-Monge R, Garcia-Maroto F, Royo J, Gomez L, Mena M, Medina J, Diaz I** (1993) A multigene family from cereals which encodes inhibitors of trypsin and heterologous α -amylases. In: Avilex F (ed) Innovations on Proteases and their Inhibitors. Walter de Gruyter, Berlin/New-York, 333–348
- Carimi F, Zottini M, Formentin E, Terzi M, Lo Schiavo F** (2003) Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta* **216**: 413-421
- Cervelli M, Bianchi M, Cona A, Crosatti C, Stanca M, Angelini R, Federico R, Mariottini P** (2006) Barley polyamine oxidase isoforms 1 and 2, a peculiar case of gene duplication. *FEBS Journal* **273**: 3990-4002
- Cervera M, Esteban O, Gil M, Gorris MT, Martinez MC, Pena L, Cambra M** (2010) Transgenic expression in citrus of single-chain antibody fragments specific to Citrus tristeza virus confers virus resistance. *Transgenic Res* **19**: 1001-1015
- Chandler P, Robertson M** (1994) Gene Expression Regulated by Abscisic Acid and its Relation to Stress Tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **45**: 113-141
- Chen G, Shi Q, Lips SH, Sagi M** (2003) Comparison of growth of flacca and wild-type tomato grown under conditions diminishing their differences in stomatal control. *Plant Science* **164**: 753-757
- Cheng W-H, Chiang M-H, Hwang S-G, Lin P-C** (2009) Antagonism between abscisic acid and ethylene in Arabidopsis acts in parallel with the reciprocal regulation of their metabolism and signaling pathways. *Plant Molecular Biology* **71**: 61-80
- Cho EK, Hong CB** (2006) Over-expression of tobacco NtHSP70-1 contributes to drought-stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep* **25**: 349-358
- Christensen AH, Quail PH** (1996) Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res* **5**: 213-218
- Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH** (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology* **18**: 675-689
- Christmann A, Moes D, Himmelbach A, Yang Y, Tang Y, Grill E** (2006) Integration of abscisic acid signalling into plant responses. *Plant Biol (Stuttg)* **8**: 314-325
- Christmann A, Weiler EW, Steudle E, Grill E** (2007) A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *Plant J* **52**: 167-174
- Colmenero-Flores JM, Campos F, Garciarrubio A, Covarrubias AA** (1997) Characterization of Phaseolus vulgaris cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Molecular Biology* **35**: 393-405
- Conrad U, Fiedler U** (1998) Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant Molecular Biology* **38**: 101-109
- Conrad U, Manteuffel R** (2001) Immunomodulation of phytohormones and functional proteins in plant cells. *Trends in Plant Science* **6**: 399-402
- Conrad U, Plagmann I, Malchow S, Sack M, Floss DM, Kruglov AA, Nedospasov SA, Rose-John S, Scheller J** (2011) ELPylated anti-human TNF therapeutic single-domain antibodies for prevention of lethal septic shock. *Plant Biotechnology Journal* **9**: 22-31

- Corbett KD, Berger JM** (2003) Emerging Roles for Plant Topoisomerase VI. *Chemistry & Biology* **10**: 107-111
- Cornejo M-J, Luth D, Blankenship KM, Anderson OD, Blechl AE** (1993) Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice. *Plant Molecular Biology* **23**: 567-581
- Cornish K, Zeevaart JA** (1985) Abscisic Acid Accumulation by Roots of *Xanthium strumarium* L. and *Lycopersicon esculentum* Mill. in Relation to Water Stress. *Plant Physiology* **79**: 653-658
- Cosgrove DJ** (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 850-861
- Cramer GR, Krishnan K, Abrams SR** (1998) Kinetics of maize leaf elongation IV. Effects of (+)- and (-)-abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* **49**: 191-198
- Cronje MJ, Weir IE, Bornman L** (2004) Salicylic acid-mediated potentiation of Hsp70 induction correlates with reduced apoptosis in tobacco protoplasts. *Cytometry A* **61**: 76-87
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR** (2010) Abscisic acid: Emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 651-679
- Czuchajowska Z, Klamczynski A, Paszczynska B, Baik B-K** (1998) Structure and Functionality of Barley Starches. *Cereal Chemistry* **75**: 747-754
- Da Silva EA, Toorop PE, Van Lammeren AA, Hilhorst HW** (2008) ABA inhibits embryo cell expansion and early cell division events during coffee (*Coffea arabica* 'Rubi') seed germination. *Annals of Botany* **102**: 425-433
- Dahl SW, Rasmussen SK, Hejgaard J** (1996) Heterologous Expression of Three Plant Serpins with Distinct Inhibitory Specificities. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 25083-25088
- De Buck S, Jacobs A, Van Montagu M, Depicker A** (1999) The DNA sequences of T-DNA junctions suggest that complex T-DNA loci are formed by a recombination process resembling T-DNA integration. *Plant J* **20**: 295-304
- De Jaeger G, Buys E, Eeckhout D, De Wilde C, Jacobs A, Kapila J, Angenon G, Van Montagu M, Gerats T, Depicker A** (1999) High level accumulation of single-chain variable fragments in the cytosol of transgenic *Petunia hybrida*. *European Journal of Biochemistry* **259**: 426-434
- De Neve M, De Buck S, Jacobs A, Van Montagu M, Depicker A** (1997) T-DNA integration patterns in co-transformed plant cells suggest that T-DNA repeats originate from co-integration of separate T-DNAs. *Plant J* **11**: 15-29
- Deluc LG, Quilici DR, Decendit A, Grimplet J, Wheatley MD, Schlauch KA, Merillon JM, Cushman JC, Cramer GR** (2009) Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavor and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay. *BMC Genomics* **10**: 212
- Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM** (1982) Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J Mol Appl Genet* **1**: 561-573
- Des Marais DL, Juenger TE** (2010) Pleiotropy, plasticity, and the evolution of plant abiotic stress tolerance. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1206**: 56-79
- Devereux J, Haerberli P, Smithies O** (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* **12**: 387-395

- Di Carli M, Villani ME, Bianco L, Lombardi R, Perrotta G, Benvenuto E, Donini M** (2010) Proteomic analysis of the plant-virus interaction in cucumber mosaic virus (CMV) resistant transgenic tomato. *J Proteome Res* **9**: 5684-5697
- Dietz KJ, Sauter A, Wichert K, Messdaghi D, Hartung W** (2000) Extracellular beta-glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves. *Journal of Experimental Botany* **51**: 937-944
- Dodd IC, Davies WJ** (2010) Hormones and the Regulation of Water Balance. In: Davies PJ (ed) Plant Hormones. Springer Netherlands, 519-548
- Dodd IC, Theobald JC, Richer SK, Davies WJ** (2009) Partial phenotypic reversion of ABA-deficient flacca tomato (*Solanum lycopersicum*) scions by a wild-type rootstock: normalizing shoot ethylene relations promotes leaf area but does not diminish whole plant transpiration rate. *Journal of Experimental Botany* **60**: 4029-4039
- Doucet-Chabeaud G, Godon C, Brutesco C, de Murcia G, Kazmaier M** (2001) Ionising radiation induces the expression of PARP-1 and PARP-2 genes in Arabidopsis. *Mol Genet Genomics* **265**: 954-963
- Dubovskaya LV, Bakakina YS, Kolesneva EV, Sodel DL, McAinsh MR, Hetherington AM, Volotovskii ID** (2011) cGMP-dependent ABA-induced stomatal closure in the ABA-insensitive Arabidopsis mutant *abi1-1*. *New Phytol* **191**: 57-69
- Dudits D, Abraham E, Miskolczi P, Ayaydin F, Bilgin M, Horvath GV** (2011) Cell-cycle control as a target for calcium, hormonal and developmental signals: the role of phosphorylation in the retinoblastoma-centred pathway. *Annals of Botany* **107**: 1193-1202
- Duffus C, Cochrane M** (1993) Formation of the barley grain: morphology, physiology and biochemistry. In: MacGregor A, Bhatti R (eds) Barley: Chemistry and Technology. American Association of Cereal Chemists, St Paul, 31-72
- Dwyer LM, Steward DW, Balchin D** (1988) Rooting characteristics of corn, soybeans and barley as a function of available water and soil physical characteristics. *Canadian journal of soil science* **68**: 121-132
- Eagles CF, Wareing PF** (1963) Dormancy Regulators in Woody Plants: Experimental Induction of Dormancy in *Betula pubescens*. *Nature* **199**: 874-875
- Else MA, Taylor JM, Atkinson CJ** (2006) Anti-transpirant activity in xylem sap from flooded tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants is not due to pH-mediated redistributions of root- or shoot-sourced ABA. *Journal of Experimental Botany* **57**: 3349-3357
- Erbán A, Schauer N, Fernie AR, Kopka J** (2007) Nonsupervised construction and application of mass spectral and retention time index libraries from time-of-flight gas chromatography-mass spectrometry metabolite profiles. *Methods Mol Biol* **358**: 19-38
- Eto J, Suzuki Y, Ohkawa H, Yamaguchi I** (2003) Anti-herbicide single-chain antibody expression confers herbicide tolerance in transgenic plants. *FEBS Lett* **550**: 179-184
- Evan GI, Lewis GK, Ramsay G, Bishop JM** (1985) Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* **5**: 3610-3616
- Exner V, Taranto P, Schönrock N, Gruissem W, Hennig L** (2006) Chromatin assembly factor CAF-1 is required for cellular differentiation during plant development. *Development* **133**: 4163-4172

- Fait A, Fromm H, Walter D, Galili G, Fernie AR** (2008) Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends in Plant Science* **13**: 14-19
- Fath A, Bethke PC, Belligni MV, Spiegel YN, Jones RL** (2001) Signalling in the cereal aleurone: hormones, reactive oxygen and cell death. *New Phytologist* **151**: 99-107
- Fath A, Bethke PC, Jones RL** (1999) Barley aleurone cell death is not apoptotic: characterization of nuclease activities and DNA degradation. *Plant J* **20**: 305-315
- Fiedler U, Conrad U** (1995) High-level production and long-term storage of engineered antibodies in transgenic tobacco seeds. *Biotechnology (N Y)* **13**: 1090-1093
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C** (2008) Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 387-415
- Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD** (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* **14 Suppl**: S15-45
- Finkelstein RR, Gibson SI** (2002) ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd? *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 26-32
- Finnie C, Melchior S, Roepstorff P, Svensson B** (2002) Proteome Analysis of Grain Filling and Seed Maturation in Barley. *Plant Physiology* **129**: 1308-1319
- Floss DM, Sack M, Stadlmann J, Rademacher T, Scheller J, Stöger E, Fischer R, Conrad U** (2008) Biochemical and functional characterization of anti-HIV antibody-ELP fusion proteins from transgenic plants. *Plant Biotechnology Journal* **6**: 379-391
- Fraser PD, Bramley PM** (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* **43**: 228-265
- Frey A, Godin B, Bonnet M, Sotta B, Marion-Poll A** (2004) Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *Nicotiana glauca*. *Planta* **218**: 958-964
- Fu X, Deng J, Yang H, Masuda T, Goto F, Yoshihara T, Zhao G** (2010) A novel EP-involved pathway for iron release from soya bean seed ferritin. *Biochem J* **427**: 313-321
- Fujii H, Chinnusamy V, Rodrigues A, Rubio S, Antoni R, Park SY, Cutler SR, Sheen J, Rodriguez PL, Zhu JK** (2009) In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* **462**: 660-664
- Fujita Y, Fujita M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2011) ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *J Plant Res* **124**: 509-525
- Fukuda A, Tanaka Y** (2006) Effects of ABA, auxin, and gibberellin on the expression of genes for vacuolar H⁺-inorganic pyrophosphatase, H⁺-ATPase subunit A, and Na⁺/H⁺ antiporter in barley. *Plant Physiol Biochem* **44**: 351-358
- Furtado A, Henry R, Scott K, Meech S** (2003) The promoter of the *asi* gene directs expression in the maternal tissues of the seed in transgenic barley. *Plant Molecular Biology* **52**: 787-799
- Furtado A, Henry RJ** (2005) The wheat *Em* promoter drives reporter gene expression in embryo and aleurone tissue of transgenic barley and rice. *Plant Biotechnology Journal* **3**: 421-434

- Furuichi T, Mori IC, Takahashi K, Muto S** (2001) Sugar-induced increase in cytosolic Ca²⁺ in *Arabidopsis thaliana* whole plants. *Plant Cell Physiol* **42**: 1149-1155
- Furuichi T, Muto S** (2005) H⁺-coupled sugar transporter, an initiator of sugar-induced Ca²⁺-signaling in plant cells. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DP, Firoozabady E** (1983) Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* **220**: 1049-1051
- Gao Z, He X, Zhao B, Zhou C, Liang Y, Ge R, Shen Y, Huang Z** (2010) Overexpressing a putative aquaporin gene from wheat, TaNIP, enhances salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **51**: 767-775
- Gebauer M, Skerra A** (2009) Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* **13**: 245-255
- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Stange A, Marten I, Bauer H, Ache P, Matschi S, Liese A, Al-Rasheid KA, Romeis T, Hedrich R** (2009) Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 21425-21430
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J** (2004) Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* **5**: R80
- Gill SC, Von Hippel PH** (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**: 319-326
- Gill SS, Tuteja N** (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* **48**: 909-930
- Gilroy S, Jones RL** (1994) Perception of Gibberellin and Abscisic Acid at the External Face of the Plasma Membrane of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Aleurone Protoplasts. *Plant Physiology* **104**: 1185-1192
- Goda H, Sasaki E, Akiyama K, Maruyama-Nakashita A, Nakabayashi K, Li W, Ogawa M, Yamauchi Y, Preston J, Aoki K, Kiba T, Takatsuto S, Fujioka S, Asami T, Nakano T, Kato H, Mizuno T, Sakakibara H, Yamaguchi S, Nambara E, Kamiya Y, Takahashi H, Hirai MY, Sakurai T, Shinozaki K, Saito K, Yoshida S, Shimada Y** (2008) The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. *Plant J* **55**: 526-542
- Gomez LD, Baud S, Gilday A, Li Y, Graham IA** (2006) Delayed embryo development in the *Arabidopsis* trehalose-6-phosphatase synthase 1 mutant is associated with altered cell wall structure, decreased cell division and starch accumulation. *Plant J* **46**: 69-84
- Gomez LD, Gilday A, Feil R, Lunn JE, Graham IA** (2010) AtTPS1-mediated trehalose 6-phosphate synthesis is essential for embryogenic and vegetative growth and responsiveness to ABA in germinating seeds and stomatal guard cells. *Plant J* **64**: 1-13
- Gruis DF, Guo H, Selinger D, Tian Q, Olsen OA** (2006) Surface position, not signaling from surrounding maternal tissues, specifies aleurone epidermal cell fate in maize. *Plant Physiology* **141**: 898-909
- Guerrero F, Mullet JE** (1986) Increased Abscisic Acid Biosynthesis during Plant Dehydration Requires Transcription. *Plant Physiology* **80**: 588-591

- Guo D, Liang J, Li L** (2009) Abscisic acid (ABA) inhibition of lateral root formation involves endogenous ABA biosynthesis in *Arachis hypogaea* L. *Plant Growth Regulation* **58**: 173-179
- Halford NG, Field JM, Blair H, Urwin P, Moore K, Robert L, Thompson R, Flavell RB, Tatham AS, Shewry PR** (1992) Analysis of HMW glutenin subunits encoded by chromosome 1A of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) indicates quantitative effects on grain quality. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **83**: 373-378
- Harris PJ, Chavan RR, Ferguson LR** (2005) Production and characterisation of two wheat-bran fractions: an aleurone-rich and a pericarp-rich fraction. *Mol Nutr Food Res* **49**: 536-545
- Hartung W, Leport L, Ratcliffe RG, Sauter A, Duda R, Turner NC** (2002) Abscisic acid concentration, root pH and anatomy do not explain growth differences of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and lupin (*Lupinus angustifolius* L.) on acid and alkaline soils. *Plant and Soil* **240**: 191-199
- Hartung W, Radin JW, Hendrix DL** (1988) Abscisic Acid Movement into the Apoplastic solution of Water-Stressed Cotton Leaves: Role of Apoplastic pH. *Plant Physiology* **86**: 908-913
- Hartung W, Slovik S** (1991) Physicochemical properties of plant growth regulators and plant tissues determine their distribution and redistribution: stomatal regulation by abscisic acid in leaves. *New Phytologist* **119**: 361-382
- Hayashi T, Kaida R** (2011) Functions of xyloglucan in plant cells. *Mol Plant* **4**: 17-24
- He G, Rooke L, Steele S, Bekes F, Gras P, Tatham A, Fido R, Barcelo P, Shewry P, Lazzeri P** (1999) Transformation of pasta wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum) with high-molecular-weight glutenin subunit genes and modification of dough functionality. *Molecular Breeding* **5**: 377-386
- Hejgaard J** (1982) Purification and properties of protein Z – a major albumin of barley endosperm. *Physiol Plant* **54**: 174-182
- Heldt H-W, Heldt F** (2005) Nitrate assimilation is essential for the synthesis of organic matter. *Plant Biochemistry* (Third Edition). Academic Press, Burlington, 275-308
- Henrissat B** (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* **280** (Pt 2): 309-316
- Herrera-Medina MJ, Steinkellner S, Vierheilig H, Ocampo Bote JA, Garcia Garrido JM** (2007) Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. *New Phytol* **175**: 554-564
- Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K** (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* **342**: 76-78
- Himmelbach A, Iten M, Grill E** (1998) Signalling of abscisic acid to regulate plant growth. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **353**: 1439-1444
- Hirano T** (2005) Condensins: organizing and segregating the genome. *Curr Biol* **15**: R265-275
- Ho T-hD, Gomez-Cadenas A, Zentella R, Casaretto J** (2003) Crosstalk Between Gibberellin and Abscisic Acid in Cereal Aleurone. *Journal of Plant Growth Regulation* **22**: 185-194
- Hoffmann-Benning S, Kende H** (1992) On the role of abscisic Acid and gibberellin in the regulation of growth in rice. *Plant Physiology* **99**: 1156-1161

- Horsman J, McLean MD, Olea-Popelka FC, Hall JC** (2007) Picloram resistance in transgenic tobacco expressing an anti-picloram scFv antibody is due to reduced translocation. *J Agric Food Chem* **55**: 106-112
- Hu B, Wan XR, Liu XH, Guo DL, Li L** (2010) Abscisic acid (ABA)-mediated inhibition of seed germination involves a positive feedback regulation of ABA biosynthesis in *Arachis hypogaea* L. *Afr. J. Biotechnol.* **9**: 1578-1586
- Huang B, Xu C** (2008) Identification and characterization of proteins associated with plant tolerance to heat stress. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**: 1230-1237
- Hunter DA, Ferrante A, Vernieri P, Reid MS** (2004) Role of abscisic acid in perianth senescence of daffodil (*Narcissus pseudonarcissus* "Dutch Master"). *Physiol Plant* **121**: 313-321
- Inoue H, Nojima H, Okayama H** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28
- Inouhe M, Inada G, Thomas BR, Nevins DJ** (2000) Cell wall autolytic activities and distribution of cell wall glucanases in *Zea mays* L. seedlings. *Int J Biol Macromol* **27**: 151-156
- Inze D, De Veylder L** (2006) Cell cycle regulation in plant development. *Annu Rev Genet* **40**: 77-105
- ISTA** (2008) International rules for seed testing. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Schweiz
- Jacobsen JV, Pearce DW, Poole AT, Pharis RP, Mander LN** (2002) Abscisic acid, phaseic acid and gibberellin contents associated with dormancy and germination in barley. *Physiol Plant* **115**: 428-441
- Jadhav AS, Taylor DC, Giblin M, Ferrie AM, Ambrose SJ, Ross AR, Nelson KM, Irina Zaharia L, Sharma N, Anderson M, Fobert PR, Abrams SR** (2008) Hormonal regulation of oil accumulation in Brassica seeds: metabolism and biological activity of ABA, 7'-, 8'- and 9'-hydroxy ABA in microspore derived embryos of *B. napus*. *Phytochemistry* **69**: 2678-2688
- Jain M, Tyagi AK, Khurana JP** (2006) Overexpression of putative topoisomerase 6 genes from rice confers stress tolerance in transgenic Arabidopsis plants. *Febs J* **273**: 5245-5260
- Jeannette E, Rona JP, Bardat F, Cornel D, Sotta B, Miginiac E** (1999) Induction of RAB18 gene expression and activation of K⁺ outward rectifying channels depend on an extracellular perception of ABA in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant J* **18**: 13-22
- Ji X, Dong B, Shiran B, Talbot MJ, Edlington JE, Hughes T, White RG, Gubler F, Dolferus R** (2011) Control of abscisic acid catabolism and abscisic acid homeostasis is important for reproductive stage stress tolerance in cereals. *Plant Physiology* **156**: 647-662
- Jiang F, Hartung W** (2008) Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. *Journal of Experimental Botany* **59**: 37-43
- Jobling SA, Jarman C, Teh MM, Holmberg N, Blake C, Verhoeven ME** (2003) Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments. *Nat Biotechnol* **21**: 77-80
- Jürgens G** (2005) Plant cytokinesis: fission by fusion. *Trends Cell Biol* **15**: 277-283

- Kaida R, Satoh Y, Bulone V, Yamada Y, Kaku T, Hayashi T, Kaneko TS** (2009) Activation of beta-glucan synthases by wall-bound purple acid phosphatase in tobacco cells. *Plant Physiology* **150**: 1822-1830
- Kaida R, Serada S, Norioka N, Norioka S, Neumetzler L, Pauly M, Sampedro J, Zarra I, Hayashi T, Kaneko TS** (2010) Potential role for purple acid phosphatase in the dephosphorylation of wall proteins in tobacco cells. *Plant Physiology* **153**: 603-610
- Kang J, Hwang JU, Lee M, Kim YY, Assmann SM, Martinoia E, Lee Y** (2010) PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 2355-2360
- Kanno Y, Jikumaru Y, Hanada A, Nambara E, Abrams SR, Kamiya Y, Seo M** (2010) Comprehensive hormone profiling in developing Arabidopsis seeds: examination of the site of ABA biosynthesis, ABA transport and hormone interactions. *Plant Cell Physiol* **51**: 1988-2001
- Karsen CM, Brinkhorst-van der Swan DLC, Breeklund AE, Koornneef M** (1983) Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **157**: 158-165
- Kathiresan A, Tung P, Chinnappa CC, Reid DM** (1997) gamma-Aminobutyric acid stimulates ethylene biosynthesis in sunflower. *Plant Physiology* **115**: 129-135
- Kim MC, Chung WS, Yun DJ, Cho MJ** (2009) Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants. *Mol Plant* **2**: 13-21
- Kinnersley AM, Turano FJ** (2000) Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Crit. Rev. Plant Sci.* **19**: 479-509
- Kohli A, Gahakwa D, Vain P, Laurie DA, Christou P** (1999) Transgene expression in rice engineered through particle bombardment: molecular factors controlling stable expression and transgene silencing. *Planta* **208**: 88-97
- Komari T, Hiei Y, Saito Y, Murai N, Kumashiro T** (1996) Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J* **10**: 165-174
- Kontermann RE** (2010) Alternative antibody formats. *Curr Opin Mol Ther* **12**: 176-183
- Kovaleva L, Zakharova E** (2003) Hormonal status of the pollen-pistil system at the progamic phase of fertilization after compatible and incompatible pollination in *Petunia hybrida* L. *Sexual Plant Reproduction* **16**: 191-196
- Kreis M, Shewry P** (1992) The control of protein synthesis in developing barley seeds. In: Shewry P (ed) *Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology*. Alden Press, Oxford, 319-333
- Krochko JE, Abrams GD, Loewen MK, Abrams SR, Cutler AJ** (1998) (+)-Abscisic acid 8'-hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Physiology* **118**: 849-860
- Kumlehn J, Serazetdinova L, Hensel G, Becker D, Loerz H** (2006) Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnology Journal* **4**: 251-261

- Kuromori T, Miyaji T, Yabuuchi H, Shimizu H, Sugimoto E, Kamiya A, Moriyama Y, Shinozaki K** (2010) ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 2361-2366
- Kuromori T, Sugimoto E, Shinozaki K** (2011) Arabidopsis mutants of AtABCG22, an ABC transporter gene, increase water transpiration and drought susceptibility. *Plant J*
- Kuzmin EV, Karpova OV, Elthon TE, Newton KJ** (2004) Mitochondrial respiratory deficiencies signal up-regulation of genes for heat shock proteins. *J Biol Chem* **279**: 20672-20677
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lancien M, Roberts MR** (2006) Regulation of Arabidopsis thaliana 14-3-3 gene expression by gamma-aminobutyric acid. *Plant, Cell & Environment* **29**: 1430-1436
- Larkindale J, Knight MR** (2002) Protection against heat stress-induced oxidative damage in Arabidopsis involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiology* **128**: 682-695
- LeNoble ME, Spollen WG, Sharp RE** (2004) Maintenance of shoot growth by endogenous ABA: genetic assessment of the involvement of ethylene suppression. *Journal of Experimental Botany* **55**: 237-245
- Lin BL, Wang HJ, Wang JS, Zaharia LI, Abrams SR** (2005) Abscisic acid regulation of heterophylly in *Marsilea quadrifolia* L.: effects of R-(-) and S-(+) isomers. *Journal of Experimental Botany* **56**: 2935-2948
- Lindh I, Wallin A, Kalbina I, Savenstrand H, Engstrom P, Andersson S, Strid A** (2009) Production of the p24 capsid protein from HIV-1 subtype C in Arabidopsis thaliana and Daucus carota using an endoplasmic reticulum-directing SEKDEL sequence in protein expression constructs. *Protein Expr Purif* **66**: 46-51
- Liu J, Jiang M-Y, Zhou Y-F, Liu Y-L** (2005) Production of Polyamines Is Enhanced by Endogenous Abscisic Acid in Maize Seedlings Subjected to Salt Stress. *Journal of Integrative Plant Biology* **47**: 1326-1334
- Losada A, Hirano T** (2005) Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins. *Genes Dev* **19**: 1269-1287
- Lozano-Juste J, Leon J** (2010a) Enhanced abscisic acid-mediated responses in nia1nia2noa1-2 triple mutant impaired in NIA/NR- and AtNOA1-dependent nitric oxide biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology* **152**: 891-903
- Lozano-Juste J, Leon J** (2010b) Nitric oxide modulates sensitivity to ABA. *Plant Signal Behav* **5**: 314-316
- Lundgard R, Svensson B** (1989) A 39 kD barley seed protein of the serpin superfamily inhibits alpha-chymotrypsin. *Carlsberg Res Commun* **54**: 173-180
- Luo ZB, Janz D, Jiang X, Gobel C, Wildhagen H, Tan Y, Rennenberg H, Feussner I, Polle A** (2009) Upgrading root physiology for stress tolerance by ectomycorrhizas: insights from metabolite and transcriptional profiling into reprogramming for stress anticipation. *Plant Physiology* **151**: 1902-1917

- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E** (2009) Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors. *Science*
- MacGregor A, Dushnicky L** (1989) Starch degradation in endosperms of developing barley kernels. Institute of Brewing, London
- Machaca K** (2010) Ca(2+) signaling, genes and the cell cycle. *Cell Calcium* **48**: 243-250
- March TJ, Able JA, Schultz CJ, Able AJ** (2007) A novel late embryogenesis abundant protein and peroxidase associated with black point in barley grains. *Proteomics* **7**: 3800-3808
- Martinoia E, Maeshima M, Neuhaus HE** (2007) Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany* **58**: 83-102
- Marzluff WF, Wagner EJ, Duronio RJ** (2008) Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nat Rev Genet* **9**: 843-854
- McCarty DR** (1995) Genetic Control and Integration of Maturation and Germination Pathways in Seed Development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**: 71-93
- McElroy D, Brettell RIS** (1994) Foreign gene expression in transgenic cereals. *Trends in Biotechnology* **12**: 62-68
- McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove DJ** (1992) Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* **4**: 1425-1433
- Meier U** (2001) Entwicklungsstadien mono- und dikotyler Pflanzen. Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft, 2. Auflage
- Melcher K, Zhou XE, Xu HE** (2010) Thirsty plants and beyond: structural mechanisms of abscisic acid perception and signaling. *Curr Opin Struct Biol* **20**: 722-729
- Melhorn V, Matsumi K, Koiwai H, Ikegami K, Okamoto M, Nambara E, Bittner F, Koshiba T** (2008) Transient expression of AtNCED3 and AAO3 genes in guard cells causes stomatal closure in *Vicia faba*. *J Plant Res* **121**: 125-131
- Mersereau M, Pazour GJ, Das A** (1990) Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. *Gene* **90**: 149-151
- Mertens R, Deus-Neumann B, Weiler EW** (1983) Monoclonal antibodies for the detection and quantitation of the endogenous plant growth regulator, abscisic acid. *FEBS Lett* **160**: 269-272
- Meshi T, Taoka KI, Iwabuchi M** (2000) Regulation of histone gene expression during the cell cycle. *Plant Molecular Biology* **43**: 643-657
- Meszaros T, Miskolczi P, Ayaydin F, Pettko-Szandtner A, Peres A, Magyar Z, Horvath GV, Bako L, Feher A, Dudits D** (2000) Multiple cyclin-dependent kinase complexes and phosphatases control G2/M progression in alfalfa cells. *Plant Molecular Biology* **43**: 595-605
- Miao Y, Lv D, Wang P, Wang XC, Chen J, Miao C, Song CP** (2006) An Arabidopsis glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses. *Plant Cell* **18**: 2749-2766
- Michalek W, Kunzel G, Graner A** (1999) Sequence analysis and gene identification in a set of mapped RFLP markers in barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* **42**: 849-853

- Miersch O, Neumerkel J, Dippe M, Stenzel I, Wasternack C** (2008) Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytol* **177**: 114-127
- Millar AA, Jacobsen JV, Ross JJ, Helliwell CA, Poole AT, Scofield G, Reid JB, Gubler F** (2006) Seed dormancy and ABA metabolism in Arabidopsis and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. *Plant J* **45**: 942-954
- Miroshnichenko S, Tripp J, Nieden U, Neumann D, Conrad U, Manteuffel R** (2005) Immunomodulation of function of small heat shock proteins prevents their assembly into heat stress granules and results in cell death at sublethal temperatures. *Plant J* **41**: 269-281
- Mullis KB, Faloona FA** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350
- Munro S, Pelham HR** (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**: 899-907
- Murphy KM, Travers P, Walport M, Seidler L, Hauer-Siller I** (2009) Janeway Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag
- Mustroph A, Sonnewald U, Biemelt S** (2007) Characterisation of the ATP-dependent phosphofructokinase gene family from Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett* **581**: 2401-2410
- Nakashima K, Fujita Y, Kanamori N, Katagiri T, Umezawa T, Kidokoro S, Maruyama K, Yoshida T, Ishiyama K, Kobayashi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2009) Three Arabidopsis SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant Cell Physiol* **50**: 1345-1363
- Nambara E, Marion-Poll A** (2003) ABA action and interactions in seeds. *Trends in Plant Science* **8**: 213-217
- Nambara E, Marion-Poll A** (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 165-185
- Neill S, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Wilson I** (2008) Nitric oxide evolution and perception. *Journal of Experimental Botany* **59**: 25-35
- Neri D, Montigiani S, Kirkham PM** (1996) Biophysical methods for the determination of antibody-antigen affinities. *Trends in Biotechnology* **14**: 465-470
- Nieves N, Martínez M, Castillo R, Blanco M, González-Olmedo J** (2001) Effect of abscisic acid and jasmonic acid on partial desiccation of encapsulated somatic embryos of sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **65**: 15-21
- Nishimura N, Sarkeshik A, Nito K, Park SY, Wang A, Carvalho PC, Lee S, Caddell DF, Cutler SR, Chory J, Yates JR, Schroeder JI** (2010) PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in Arabidopsis. *Plant J* **61**: 290-299
- Nölke G, Cobanov P, Uhde-Holzem K, Reustle G, Fischer R, Schillberg S** (2009) Grapevine fanleaf virus (GFLV)-specific antibodies confer GFLV and Arabis mosaic virus (ArMV) resistance in Nicotiana benthamiana. *Mol Plant Pathol* **10**: 41-49

- North HM, Almeida AD, Boutin J-P, Frey A, To A, Botran L, Sotta B, Marion-Poll A** (2007) The Arabidopsis ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *The Plant Journal* **50**: 810-824
- Ohkuma K, Lyon JL, Addicott FT, Smith OE** (1963) Abscisin II, an Abscission-Accelerating Substance from Young Cotton Fruit. *Science* **142**: 1592-1593
- Ohta M, Guo Y, Halfter U, Zhu JK** (2003) A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 11771-11776
- Okamoto M, Tanaka Y, Abrams SR, Kamiya Y, Seki M, Nambara E** (2009) High Humidity Induces Abscisic Acid 8'-Hydroxylase in Stomata and Vasculature to Regulate Local and Systemic Abscisic Acid Responses in Arabidopsis. *Plant Physiology* **149**: 825-834
- Oliver SN, Dennis ES, Dolferus R** (2007) ABA regulates apoplastic sugar transport and is a potential signal for cold-induced pollen sterility in rice. *Plant Cell Physiol* **48**: 1319-1330
- Oliver SN, Van Dongen JT, Alfred SC, Mamun EA, Zhao X, Saini HS, Fernandes SF, Blanchard CL, Sutton BG, Geigenberger P, Dennis ES, Dolferus R** (2005) Cold-induced repression of the rice anther-specific cell wall invertase gene OSINV4 is correlated with sucrose accumulation and pollen sterility. *Plant, Cell & Environment* **28**: 1534-1551
- Olsen OA** (2001) Endosperm Development: Cellularization and Cell Fate Specification. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 233-267
- Orlando DA, Brady SM, Koch JD, Dinneny JR, Benfey PN** (2009) Manipulating large-scale Arabidopsis microarray expression data: identifying dominant expression patterns and biological process enrichment. *Methods Mol Biol* **553**: 57-77
- Osborne TB** (1924) The vegetable proteins. 2nd edition. Monographs on Biochemistry. London: Longmans green and Co. 1924. Pric 9s. net. Journal of the Society of Chemical Industry. John Wiley & Sons, Ltd, London, p 440
- Owen M, Gandecha A, Cockburn B, Whitelam G** (1992) Synthesis of a functional anti-phytochrome single-chain Fv protein in transgenic tobacco. *Biotechnology (N Y)* **10**: 790-794
- Owens DF, Kriegstein AR** (2002) Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* **3**: 715-727
- Pandey R, Mishra A, Garg GK** (2008) Plant promoter driven heterologous expression of HMW glutenin gene(s) subunit in E. coli. *Mol Biol Rep* **35**: 153-162
- Parent B, Hachez C, Redondo E, Simonneau T, Chaumont F, Tardieu F** (2009) Drought and abscisic acid effects on aquaporin content translate into changes in hydraulic conductivity and leaf growth rate: a trans-scale approach. *Plant Physiology* **149**: 2000-2012
- Park GG, Park JJ, Yoon J, Yu SN, An G** (2010) A RING finger E3 ligase gene, *Oryza sativa* Delayed Seed Germination 1 (OsDSG1), controls seed germination and stress responses in rice. *Plant Molecular Biology* **74**: 467-478
- Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow Tff, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu JK, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR** (2009) Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. *Science*

- Park YW, Baba Ki, Furuta Y, Iida I, Sameshima K, Arai M, Hayashi T** (2004) Enhancement of growth and cellulose accumulation by overexpression of xyloglucanase in poplar. *FEBS Lett* **564**: 183-187
- Pastor A, López-Carbonell M, Alegre L** (1999) Abscisic acid immunolocalization and ultrastructural changes in water-stressed lavender (*Lavandula stoechas* L.) plants. *Physiol Plant* **105**: 272-279
- Paul MJ, Primavesi LF, Jhurrea D, Zhang Y** (2008) Trehalose metabolism and signaling. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 417-441
- Peng RH, Yao QH, Xiong AS, Cheng ZM, Li Y** (2006) Codon-modifications and an endoplasmic reticulum-targeting sequence additively enhance expression of an *Aspergillus* phytase gene in transgenic canola. *Plant Cell Rep* **25**: 124-132
- Perras MR, Abrams SR, Balsevich JJ** (1994) Characterization of an abscisic acid carrier in suspension-cultured barley cells. *Journal of Experimental Botany* **45**: 1565-1573
- Petrucelli S, Otegui MS, Lareu F, Tran Dinh O, Fichette AC, Circosta A, Rumbo M, Bardor M, Carcamo R, Gomord V, Beachy RN** (2006) A KDEL-tagged monoclonal antibody is efficiently retained in the endoplasmic reticulum in leaves, but is both partially secreted and sorted to protein storage vacuoles in seeds. *Plant Biotechnology Journal* **4**: 511-527
- Phillips J, Artsaenko O, Fiedler U, Horstmann C, Mock HP, Muntz K, Conrad U** (1997) Seed-specific immunomodulation of abscisic acid activity induces a developmental switch. *Embo J* **16**: 4489-4496
- Popko J, Hansch R, Mendel RR, Polle A, Teichmann T** (2010) The role of abscisic acid and auxin in the response of poplar to abiotic stress. *Plant Biol (Stuttg)* **12**: 242-258
- Pramanik MH, Imai R** (2005) Functional identification of a trehalose 6-phosphate phosphatase gene that is involved in transient induction of trehalose biosynthesis during chilling stress in rice. *Plant Molecular Biology* **58**: 751-762
- Qi Y, Wang H, Zou Y, Liu C, Liu Y, Wang Y, Zhang W** (2011) Over-expression of mitochondrial heat shock protein 70 suppresses programmed cell death in rice. *FEBS Lett* **585**: 231-239
- Qin X, Zeevaart JA** (1999) The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 15354-15361
- Qin X, Zeevaart JA** (2002) Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. *Plant Physiology* **128**: 544-551
- Quarrie S, Galfre G** (1985) Use of different hapten-protein conjugates immobilized on nitrocellulose to screen monoclonal antibodies to abscisic acid. *Anal Biochem* **151**: 389-399
- Quarrie S, Lister P** (1984) Effects of inhibitors of protein synthesis on abscisic acid accumulation in wheat. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **114**: 309-314
- Raab S, Drechsel G, Zarepour M, Hartung W, Koshiba T, Bittner F, Hoth S** (2009) Identification of a novel E3 ubiquitin ligase that is required for suppression of premature senescence in *Arabidopsis*. *Plant J* **59**: 39-51
- Radchuk R, Conrad U, Saalbach I, Giersberg M, Emery RJ, Kuster H, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Weschke W, Weber H** (2010) Abscisic acid deficiency of developing pea embryos achieved by

immunomodulation attenuates developmental phase transition and storage metabolism. *Plant J* **64**: 715-730

Radchuk V, Weier D, Radchuk R, Weschke W, Weber H (2011) Development of maternal seed tissue in barley is mediated by regulated cell expansion and cell disintegration and coordinated with endosperm growth. *Journal of Experimental Botany* **62**: 1217-1227

Radchuk VV, Borisjuk L, Sreenivasulu N, Merx K, Mock HP, Rolletschek H, Wobus U, Weschke W (2009) Spatiotemporal profiling of starch biosynthesis and degradation in the developing barley grain. *Plant Physiology* **150**: 190-204

Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E (2010) ABA perception and signalling. *Trends in Plant Science* **15**: 395-401

Ram HYM, Jaiswal VS (1972) Induction of male flowers on female plants of *Cannabis sativa* by gibberellins and its inhibition by abscisic acid. *Planta* **105**: 263-266

Ramon M, Rolland FU, Sheen J (2009) Sugar Sensing and Signaling. The Arabidopsis Book. American Society of Plant Biologists

Ramsay G, Evan GI, Bishop JM (1984) The protein encoded by the human proto-oncogene c-myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 7742-7746

Rasmussen CB, Hiner AN, Smith AT, Welinder KG (1998) Effect of calcium, other ions, and pH on the reactions of barley peroxidase with hydrogen peroxide and fluoride. Control of activity through conformational change. *J Biol Chem* **273**: 2232-2240

Ravishankar K, Uma Shaanker R, Ganeshiah K (1995) War of hormones over resource allocation to seeds: Strategies and counter-strategies of offspring and maternal parent. *Journal of Biosciences* **20**: 89-103

Ren H, Gao Z, Chen L, Wei K, Liu J, Fan Y, Davies WJ, Jia W, Zhang J (2007) Dynamic analysis of ABA accumulation in relation to the rate of ABA catabolism in maize tissues under water deficit. *Journal of Experimental Botany* **58**: 211-219

Ren J, Sun L, Wu J, Zhao S, Wang C, Wang Y, Ji K, Leng P (2010) Cloning and expression analysis of cDNAs for ABA 8'-hydroxylase during sweet cherry fruit maturation and under stress conditions. *Journal of Plant Physiology* **167**: 1486-1493

Renault H, El Amrani A, Palanivelu R, Updegraff EP, Yu A, Renou JP, Preuss D, Bouchereau A, Deleu C (2011) GABA Accumulation Causes Cell Elongation Defects and a Decrease in Expression of Genes Encoding Secreted and Cell Wall-Related Proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **52**: 894-908

Represa A, Ben-Ari Y (2005) Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends Neurosci* **28**: 278-283

Rikhvanov EG, Gamburg KZ, Varakina NN, Rusaleva TM, Fedoseeva IV, Tauson EL, Stupnikova IV, Stepanov AV, Borovskii GB, Voinikov VK (2007) Nuclear-mitochondrial cross-talk during heat shock in *Arabidopsis* cell culture. *Plant J* **52**: 763-778

Ritchie S, Swanson SJ, Gilroy S (2000) Physiology of the aleurone layer and starchy endosperm during grain development and early seedling growth: new insights from cell and molecular biology. *Seed Science Research* **10**: 193-212

- Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JD** (2011) Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just JASMONATE-SALICYLATE Antagonism. *Annu Rev Phytopathol* **49**: 317-343
- Roberts MR** (2007) Does GABA Act as a Signal in Plants?: Hints from Molecular Studies. *Plant Signal Behav* **2**: 408-409
- Robertson M, Walker-Simmons M, Munro D, Hill RD** (1989) Induction of alpha-amylase inhibitor synthesis in barley embryos and young seedlings by abscisic Acid and dehydration stress. *Plant Physiology* **91**: 415-420
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM** (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Botany* **53**: 103-110
- Rodriguez-Concepcion M, Boronat A** (2002) Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiology* **130**: 1079-1089
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J** (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 675-709
- Rolletschek H, Hosein F, Miranda M, Heim U, Gotz KP, Schlereth A, Borisjuk L, Saalbach I, Wobus U, Weber H** (2005) Ectopic expression of an amino acid transporter (VfAAP1) in seeds of *Vicia narbonensis* and pea increases storage proteins. *Plant Physiology* **137**: 1236-1249
- Rook F, Hadingham SA, Li Y, Bevan MW** (2006) Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant, Cell & Environment* **29**: 426-434
- Roos W, Evers S, Hieke M, Tschöpe M, Schumann B** (1998) Shifts of intracellular pH distribution as a part of the signal mechanism leading to the elicitation of benzophenanthridine alkaloids . Phytoalexin biosynthesis in cultured cells of *eschscholtzia californica*. *Plant Physiology* **118**: 349-364
- Roos W, Viehweger K, Dordschbal B, Schumann B, Evers S, Steighardt J, Schwartze W** (2006) Intracellular pH signals in the induction of secondary pathways--the case of *Eschscholzia californica*. *Journal of Plant Physiology* **163**: 369-381
- Ross HA, Davies HV** (1992) Purification and Characterization of Sucrose Synthase from the Cotyledons of *Vicia faba* L. *Plant Physiology* **100**: 1008-1013
- Rozen S, Skaletsky H** (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**: 365-386
- Rubinstein B** (2000) Regulation of cell death in flower petals. *Plant Molecular Biology* **44**: 303-318
- Saab IN, Sharp RE, Pritchard J, Voetberg GS** (1990) Increased endogenous abscisic Acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potentials. *Plant Physiology* **93**: 1329-1336
- Saalbach I, Giersberg M, Conrad Udo** (2001) High-level expression of a single-chain Fv fragment (scFv) antibody in transgenic pea seeds. *Journal of Plant Physiology* **158**: 529-533
- Sabelli PA, Larkins BA** (2009) The development of endosperm in grasses. *Plant Physiology* **149**: 14-26
- Safarnejad MR, Fischer R, Commandeur U** (2009) Recombinant-antibody-mediated resistance against Tomato yellow leaf curl virus in *Nicotiana benthamiana*. *Arch Virol* **154**: 457-467

- Saito S, Hirai N, Matsumoto C, Ohgashi H, Ohta D, Sakata K, Mizutani M** (2004) Arabidopsis CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiology* **134**: 1439-1449
- Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES** (2000) Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* **2**: 476-483
- Sambrook J, Russell DW** (2001) Molecular cloning - a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press., New York, USA
- Santiago J, Rodrigues A, Saez A, Rubio S, Antoni R, Dupeux F, Park SY, Marquez JA, Cutler SR, Rodriguez PL** (2009) Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *Plant J* **60**: 575-588
- Sato A, Sato Y, Fukao Y, Fujiwara M, Umezawa T, Shinozaki K, Hibi T, Taniguchi M, Miyake H, Goto DB, Uozumi N** (2009) Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. *Biochem J* **424**: 439-448
- Sauter A, Davies WJ, Hartung W** (2001) The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from root to shoot. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1991-1997
- Schouten A, Roosien J, van Engelen FA, de Jong GA, Borst-Vremsen AW, Zilverentant JF, Bosch D, Stiekema WJ, Gommers FJ, Schots A, Bakker J** (1996) The C-terminal KDEL sequence increases the expression level of a single-chain antibody designed to be targeted to both the cytosol and the secretory pathway in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology* **30**: 781-793
- Schraut D, Ullrich CI, Hartung W** (2004) Lateral ABA transport in maize roots (*Zea mays*): visualization by immunolocalization. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1635-1641
- Schubert D, Lechtenberg B, Forsbach A, Gils M, Bahadur S, Schmidt R** (2004) Silencing in Arabidopsis T-DNA transformants: the predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. *Plant Cell* **16**: 2561-2572
- Schwartz A, Wu WH, Tucker EB, Assmann SM** (1994) Inhibition of inward K⁺ channels and stomatal response by abscisic acid: an intracellular locus of phytohormone action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 4019-4023
- Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JA** (2003) Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant Physiology* **131**: 1591-1601
- Schwartz SH, Tan BC, Gage DA, Zeevaart JA, McCarty DR** (1997) Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* **276**: 1872-1874
- Schweighofer A, Hirt H, Meskiene I** (2004) Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends in Plant Science* **9**: 236-243
- Seiler C, Harshavardhan VT, Rajesh K, Reddy PS, Strickert M, Rolletschek H, Scholz U, Wobus U, Sreenivasulu N** (2011) ABA biosynthesis and degradation contributing to ABA homeostasis during barley seed development under control and terminal drought-stress conditions. *Journal of Experimental Botany*
- Seo M, Koshiba T** (2011) Transport of ABA from the site of biosynthesis to the site of action. *J Plant Res*

- Setter TL, Yan J, Warburton M, Ribaut JM, Xu Y, Sawkins M, Buckler ES, Zhang Z, Gore MA** (2011) Genetic association mapping identifies single nucleotide polymorphisms in genes that affect abscisic acid levels in maize floral tissues during drought. *Journal of Experimental Botany* **62**: 701-716
- Sharp RE, LeNoble ME, Else MA, Thorne ET, Gherardi F** (2000) Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene. *Journal of Experimental Botany* **51**: 1575-1584
- Shewry PR, Halford NG** (2002) Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* **53**: 947-958
- Shewry PR, Napier JA, Tatham AS** (1995) Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 945-956
- Sirichandra C, Gu D, Hu HC, Davanture M, Lee S, Djaoui M, Valot B, Zivy M, Leung J, Merlot S, Kwak JM** (2009a) Phosphorylation of the Arabidopsis AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS Lett* **583**: 2982-2986
- Sirichandra C, Wasilewska A, Vlad F, Valon C, Leung J** (2009b) The guard cell as a single-cell model towards understanding drought tolerance and abscisic acid action. *Journal of Experimental Botany* **60**: 1439-1463
- Sivamani E, Bahieldin A, Wraith JM, Al-Niemi T, Dyer WE, Ho TD, Qu R** (2000) Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant Science* **155**: 1-9
- Smyth GK** (2005) Limma: linear models for microarray data. In: Gentleman R, Carey V, Dudoit S, Irizarry R, Huber W (eds) *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. Springer, New York, USA, 397-420
- Snaith PJ, Mansfield TA** (1982) Stomatal sensitivity to abscisic acid: can it be defined? *Plant, Cell & Environment* **5**: 309-311
- Sørensen M, Cameron-Mills V, Brandt A** (1989) Transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression in developing barley endosperm. *Molecular and General Genetics MGG* **217**: 195-201
- Spollen WG, Tao W, Valliyodan B, Chen K, Hejlek LG, Kim JJ, Lenoble ME, Zhu J, Bohnert HJ, Henderson D, Schachtman DP, Davis GE, Springer GK, Sharp RE, Nguyen HT** (2008) Spatial distribution of transcript changes in the maize primary root elongation zone at low water potential. *BMC Plant Biol* **8**: 32
- Sreenivasulu N, Altschmied L, Radchuk V, Gubatz S, Wobus U, Weschke W** (2004) Transcript profiles and deduced changes of metabolic pathways in maternal and filial tissues of developing barley grains. *Plant J* **37**: 539-553
- Sreenivasulu N, Borisjuk L, Junker BH, Mock HP, Rolletschek H, Seiffert U, Weschke W, Wobus U** (2010a) Barley grain development toward an integrative view. *Int Rev Cell Mol Biol* **281**: 49-89
- Sreenivasulu N, Radchuk V, Alawady A, Borisjuk L, Weier D, Staroske N, Fuchs J, Miersch O, Strickert M, Usadel B, Wobus U, Grimm B, Weber H, Weschke W** (2010b) De-regulation of abscisic acid contents causes abnormal endosperm development in the barley mutant seg8. *The Plant Journal* **64**: 589-603

- Sreenivasulu N, Radchuk V, Strickert M, Miersch O, Weschke W, Wobus U** (2006) Gene expression patterns reveal tissue-specific signaling networks controlling programmed cell death and ABA-regulated maturation in developing barley seeds. *The Plant Journal* **47**: 310-327
- Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD** (2005) Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem* **280**: 38729-38739
- Steffens B, Sauter M** (2005) Epidermal cell death in rice is regulated by ethylene, gibberellin, and abscisic acid. *Plant Physiology* **139**: 713-721
- Steward F, Thompson J, Dent C** (1949) γ -Amino butyric acid: A constituent of the potato tuber? *Science* **110**: 439-440
- Stevens R, Mariconti L, Rossignol P, Perennes C, Cella R, Bergounioux C** (2002) Two E2F sites in the Arabidopsis MCM3 promoter have different roles in cell cycle activation and meristematic expression. *J Biol Chem* **277**: 32978-32984
- Stewart CR, Voetberg G** (1985) Relationship between Stress-Induced ABA and Proline Accumulations and ABA-Induced Proline Accumulation in Excised Barley Leaves. *Plant Physiology* **79**: 24-27
- Stöger E, Vaquero C, Torres E, Sack M, Nicholson L, Drossard J, Williams S, Keen D, Perrin Y, Christou P, Fischer R** (2000) Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Molecular Biology* **42**: 583-590
- Stone SL, Williams LA, Farmer LM, Vierstra RD, Callis J** (2006) KEEP ON GOING, a RING E3 ligase essential for Arabidopsis growth and development, is involved in abscisic acid signaling. *Plant Cell* **18**: 3415-3428
- Strauss M, Kauder F, Peisker M, Sonnewald U, Conrad U, Heineke D** (2001) Expression of an abscisic acid-binding single-chain antibody influences the subcellular distribution of abscisic acid and leads to developmental changes in transgenic potato plants. *Planta* **213**: 361-369
- Suzuki Y, Mizuno T, Urakami E, Yamaguchi I, Asami T** (2008) Immunomodulation of bioactive gibberellin confers gibberellin-deficient phenotypes in plants. *Plant Biotechnology Journal* **6**: 355-367
- Swiatek A, Lenjou M, Van Bockstaele D, Inze D, Van Onckelen H** (2002) Differential effect of jasmonic acid and abscisic acid on cell cycle progression in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiology* **128**: 201-211
- Szostkiewicz I, Richter K, Kepka M, Demmel S, Ma Y, Korte A, Assaad FF, Christmann A, Grill E** (2010) Closely related receptor complexes differ in their ABA selectivity and sensitivity. *Plant J* **61**: 25-35
- Taiz L, Zeiger E** (2002) *Plant Physiology*. Ed 3. Sinauer, Sunderland, MA, USA
- Takahashi T, Kakehi J** (2010) Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Annals of Botany* **105**: 1-6
- Tanaka Y, Sano T, Tamaoki M, Nakajima N, Kondo N, Hasezawa S** (2005) Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant Physiology* **138**: 2337-2343

- Tanaka Y, Sano T, Tamaoki M, Nakajima N, Kondo N, Hasezawa S** (2006) Cytokinin and auxin inhibit abscisic acid-induced stomatal closure by enhancing ethylene production in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **57**: 2259-2266
- Tang T, Xie H, Wang Y, Lu B, Liang J** (2009) The effect of sucrose and abscisic acid interaction on sucrose synthase and its relationship to grain filling of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* **60**: 2641-2652
- Tavladoraki P, Benvenuto E, Trinca S, De Martinis D, Cattaneo A, Galeffi P** (1993) Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature* **366**: 469-472
- ten Hoopen P, Hunger A, Muller A, Hause B, Kramell R, Wasternack C, Rosahl S, Conrad U** (2007) Immunomodulation of jasmonate to manipulate the wound response. *Journal of Experimental Botany* **58**: 2525-2535
- Thiel J, Muller M, Weschke W, Weber H** (2009) Amino acid metabolism at the maternal-filial boundary of young barley seeds: a microdissection-based study. *Planta* **230**: 205-213
- Thomas TH, Wareing PF, Robinson PM** (1965) Chemistry And Physiology of 'Dormins' In Sycamore: Action of the Sycamore 'Dormin' as a Gibberellin Antagonist. *Nature* **205**: 1270-1272
- Thompson AJ, Jackson AC, Symonds RC, Mulholland BJ, Dadswell AR, Blake PS, Burbidge A, Taylor IB** (2000) Ectopic expression of a tomato 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene causes over-production of abscisic acid. *Plant J* **23**: 363-374
- Torres E, Gonzalez-Melendi P, Stöger E, Shaw P, Twyman RM, Nicholson L, Vaquero C, Fischer R, Christou P, Perrin Y** (2001) Native and Artificial Reticuloplasmins Co-Accumulate in Distinct Domains of the Endoplasmic Reticulum and in Post-Endoplasmic Reticulum Compartments. *Plant Physiology* **127**: 1212-1223
- Trivellini A, Ferrante A, Vernieri P, Serra G** (2011) Effects of abscisic acid on ethylene biosynthesis and perception in *Hibiscus rosa-sinensis* L. flower development. *Journal of Experimental Botany*
- Tunnacliffe A, Wise MJ** (2007) The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften* **94**: 791-812
- Urakami E, Yamaguchi I, Asami T, Conrad U, Suzuki Y** (2008) Immunomodulation of gibberellin biosynthesis using an anti-precursor gibberellin antibody confers gibberellin-deficient phenotypes. *Planta* **228**: 863-873
- Vacca RA, de Pinto MC, Valenti D, Passarella S, Marra E, De Gara L** (2004) Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant Physiology* **134**: 1100-1112
- van Hengel AJ, Roberts K** (2003) AtAGP30, an arabinogalactan-protein in the cell walls of the primary root, plays a role in root regeneration and seed germination. *Plant J* **36**: 256-270
- Van Overbeek J, Loeffler JE, Mason MI** (1967) Dormin (Abscisin II), inhibitor of plant DNA synthesis. *Science* **156**: 1497-1499
- Vanyushin BF, Bakeeva LE, Zamyatnina VA, Aleksandrushkina NI** (2004) Apoptosis in plants: specific features of plant apoptotic cells and effect of various factors and agents. *Int Rev Cytol* **233**: 135-179

- Viehweger K, Schwartz W, Schumann B, Lein W, Roos W** (2006) The Galpha protein controls a pH-dependent signal path to the induction of phytoalexin biosynthesis in *Eschscholzia californica*. *Plant Cell* **18**: 1510-1523
- Villiers TA** (1968) An autoradiographic study of the effect of the plant hormone abscisic acid on nucleic acid and protein metabolism. *Planta* **82**: 342-354
- Walker-Simmons M, Kudrna DA, Warner RL** (1989) Reduced Accumulation of ABA during Water Stress in a Molybdenum Cofactor Mutant of Barley. *Plant Physiology* **90**: 728-733
- Wan XR, Li L** (2006) Regulation of ABA level and water-stress tolerance of *Arabidopsis* by ectopic expression of a peanut 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene. *Biochem Biophys Res Commun* **347**: 1030-1038
- Wandelt CI, Khan MR, Craig S, Schroeder HE, Spencer D, Higgins TJ** (1992) Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants. *Plant J* **2**: 181-192
- Wang H, Qi Q, Schorr P, Cutler Adrian J, Crosby WL, Fowke LC** (1998) ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *The Plant Journal* **15**: 501-510
- Wang M, Hoekstra S, van Bergen S, Lamers GE, Oppedijk BJ, van der Heijden MW, de Priester W, Schilperoort RA** (1999) Apoptosis in developing anthers and the role of ABA in this process during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. *Plant Molecular Biology* **39**: 489-501
- Wang M, Oppedijk BJ, Lu X, Van Duijn B, Schilperoort RA** (1996) Apoptosis in barley aleurone during germination and its inhibition by abscisic acid. *Plant Molecular Biology* **32**: 1125-1134
- Wang X, Wang Z, Dong J, Wang M, Gao H** (2009) Cloning of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene and the responses of *Caragana korshinskii* to a variety of abiotic stresses. *Genes Genet Syst* **84**: 397-405
- Wasilewska A, Vlad F, Sirichandra C, Redko Y, Jammes F, Valon C, Frei dit Frey N, Leung J** (2008) An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Mol Plant* **1**: 198-217
- Weber H, Borisjuk L, Heim U, Sauer N, Wobus U** (1997) A role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds. *Plant Cell* **9**: 895-908
- Weber H, Sreenivasulu N, Weschke W** (2010) Molecular Physiology of Seed Maturation and Seed Storage Protein Biosynthesis. In: Pua EC, Davey MR (eds) *Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives*. Springer Berlin Heidelberg, 83-104
- Wehmeyer N, Hernandez LD, Finkelstein RR, Vierling E** (1996) Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiology* **112**: 747-757
- Weichert N, Saalbach I, Weichert H, Kohl S, Erban A, Kopka J, Hause B, Varshney A, Sreenivasulu N, Strickert M, Kumlehn J, Weschke W, Weber H** (2010) Increasing sucrose uptake capacity of wheat grains stimulates storage protein synthesis. *Plant Physiology* **152**: 698-710
- Weiner JJ, Peterson FC, Volkman BF, Cutler SR** (2010) Structural and functional insights into core ABA signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 495-502

- Weschke W, Panitz R, Gubatz S, Wang Q, Radchuk R, Weber H, Wobus U** (2003) The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. *Plant J* **33**: 395-411
- Weschke W, Panitz R, Sauer N, Wang Q, Neubohn B, Weber H, Wobus U** (2000) Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. *Plant J* **21**: 455-467
- Wigger J, Phillips J, Peisker M, Hartung W, zur Nieden U, Artsaenko O, Fiedler U, Conrad U** (2002) Prevention of stomatal closure by immunomodulation of endogenous abscisic acid and its reversion by abscisic acid treatment: physiological behaviour and morphological features of tobacco stomata. *Planta* **215**: 413-423
- Wilkinson S, Bacon MA, Davies WJ** (2007) Nitrate signalling to stomata and growing leaves: interactions with soil drying, ABA, and xylem sap pH in maize. *Journal of Experimental Botany* **58**: 1705-1716
- Wilkinson S, Davies WJ** (1997) Xylem Sap pH Increase: A Drought Signal Received at the Apoplastic Face of the Guard Cell That Involves the Suppression of Saturable Abscisic Acid Uptake by the Epidermal Symplast. *Plant Physiology* **113**: 559-573
- Wilkinson S, Davies WJ** (2010) Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, Cell & Environment* **33**: 510-525
- Williams B, Dickman M** (2008) Plant programmed cell death: can't live with it; can't live without it. *Mol Plant Pathol* **9**: 531-544
- Windsor ML, Milborrow BV, McFarlane IJ** (1992) The Uptake of (+)-S- and (-)-R-Abscisic Acid by Suspension Culture Cells of Hopbush (*Dodonaea viscosa*). *Plant Physiology* **100**: 54-62
- Wingler A, Roitsch T** (2008) Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. *Plant Biol (Stuttg)* **10 Suppl 1**: 50-62
- Wobus U, Sreenivasulu N, Borisjuk L, Rolletschek H, Panitz R, Gubatz S, Weschke W** (2005) Molecular physiology and genomics of developing barley grains.
- Wu M, Huang J, Xu S, Ling T, Xie Y, Shen W** (2011) Haem oxygenase delays programmed cell death in wheat aleurone layers by modulation of hydrogen peroxide metabolism. *Journal of Experimental Botany* **62**: 235-248
- Xi W, Liu C, Hou X, Yu H** (2010) MOTHER OF FT AND TFL1 regulates seed germination through a negative feedback loop modulating ABA signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**: 1733-1748
- Xi W, Yu H** (2010) MOTHER OF FT AND TFL1 regulates seed germination and fertility relevant to the brassinosteroid signaling pathway. *Plant Signal Behav* **5**: 1315-1317
- Xiong L, Zhu JK** (2003) Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiology* **133**: 29-36
- Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho T, Wu R** (1996) Expression of a Late Embryogenesis Abundant Protein Gene, HVA1, from Barley Confers Tolerance to Water Deficit and Salt Stress in Transgenic Rice. *Plant Physiology* **110**: 249-257
- Xu ZJ, Nakajima M, Suzuki Y, Yamaguchi I** (2002) Cloning and characterization of the abscisic acid-specific glucosyltransferase gene from adzuki bean seedlings. *Plant Physiology* **129**: 1285-1295

- Xue B, Zhang A, Jiang M** (2009) Involvement of polyamine oxidase in abscisic acid-induced cytosolic antioxidant defense in leaves of maize. *Journal of Integrative Plant Biology* **51**: 225-234
- Yajima W, Verma SS, Shah S, Rahman MH, Liang Y, Kav NN** (2010) Expression of anti-sclerotinia scFv in transgenic *Brassica napus* enhances tolerance against stem rot. *N Biotechnol* **27**: 816-821
- Yamamoto A, Kagaya Y, Usui H, Hobo T, Takeda S, Hattori T** (2010) Diverse roles and mechanisms of gene regulation by the *Arabidopsis* seed maturation master regulator FUS3 revealed by microarray analysis. *Plant Cell Physiol* **51**: 2031-2046
- Yamazaki D, Yoshida S, Asami T, Kuchitsu K** (2003) Visualization of abscisic acid-perception sites on the plasma membrane of stomatal guard cells. *Plant J* **35**: 129-139
- Yang H, Fu X, Li M, Leng X, Chen B, Zhao G** (2010) Protein association and dissociation regulated by extension peptide: a mode for iron control by phytoferritin in seeds. *Plant Physiology* **154**: 1481-1491
- Yang J, Barr LA, Fahnestock SR, Liu ZB** (2005) High yield recombinant silk-like protein production in transgenic plants through protein targeting. *Transgenic Res* **14**: 313-324
- Yang J, Guo Z** (2007) Cloning of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene (SgNCED1) from *Stylosanthes guianensis* and its expression in response to abiotic stresses. *Plant Cell Rep* **26**: 1383-1390
- Yang J, Zhang J, Liu K, Wang Z, Liu L** (2006a) Abscisic acid and ethylene interact in wheat grains in response to soil drying during grain filling. *New Phytologist* **171**: 293-303
- Yang J, Zhang J, Wang Z, Liu K, Wang P** (2006b) Post-anthesis development of inferior and superior spikelets in rice in relation to abscisic acid and ethylene. *Journal of Experimental Botany* **57**: 149-160
- Yang J, Zhang J, Wang Z, Xu G, Zhu Q** (2004a) Activities of key enzymes in sucrose-to-starch conversion in wheat grains subjected to water deficit during grain filling. *Plant Physiology* **135**: 1621-1629
- Yang JC, Zhang JH, Ye YX, Wang ZQ, Zhu QS, Liu LJ** (2004b) Involvement of abscisic acid and ethylene in the responses of rice grains to water stress during filling. *Plant, Cell & Environment* **27**: 1055-1064
- Yang SH, Zeevaart JA** (2006) Expression of ABA 8'-hydroxylases in relation to leaf water relations and seed development in bean. *Plant J* **47**: 675-686
- Yang Y, Sulpice R, Himmelbach A, Meinhard M, Christmann A, Grill E** (2006c) Fibrillin expression is regulated by abscisic acid response regulators and is involved in abscisic acid-mediated photoprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 6061-6066
- Yao N, Eisfelder BJ, Marvin J, Greenberg JT** (2004) The mitochondrion--an organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **40**: 596-610
- Yao Q, Cong L, Chang JL, Li KX, Yang GX, He GY** (2006) Low copy number gene transfer and stable expression in a commercial wheat cultivar via particle bombardment. *Journal of Experimental Botany* **57**: 3737-3746
- Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2010) AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively

regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant J* **61**: 672-685

Young TE, Gallie DR (2000) Regulation of programmed cell death in maize endosperm by abscisic acid. *Plant Molecular Biology* **42**: 397-414

Zhang S, Cai Z, Wang X (2009a) The primary signaling outputs of brassinosteroids are regulated by abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 4543-4548

Zhang WH, Zhou Y, Dibley KE, Tyerman SD, Furbank RT, Patrick JW (2007) Nutrient loading of developing seeds. *Functional Plant Biology* **34**: 314

Zhang X, Garreton V, Chua NH (2005) The AIP2 E3 ligase acts as a novel negative regulator of ABA signaling by promoting ABI3 degradation. *Genes Dev* **19**: 1532-1543

Zhang Y, Tan J, Guo Z, Lu S, He S, Shu W, Zhou B (2009b) Increased abscisic acid levels in transgenic tobacco over-expressing 9 cis-epoxycarotenoid dioxygenase influence H₂O₂ and NO production and antioxidant defences. *Plant, Cell & Environment* **32**: 509-519

Zhang ZC, Xue YG, Wang ZQ, Yang JC, Zhang JH (2009c) The relationship of grain filling with abscisic acid and ethylene under non-flooded mulching cultivation. Cambridge University Press, Cambridge

Zhao W, Teo GSL, Kumar N, Karp JM (2010) Chemistry and material science at the cell surface. *Materials Today* **13**: 14-21

Zheng Z, Xu X, Crosley RA, Greenwalt SA, Sun Y, Blakeslee B, Wang L, Ni W, Sopko MS, Yao C, Yau K, Burton S, Zhuang M, McCaskill DG, Gachotte D, Thompson M, Greene TW (2010) The protein kinase SnRK2.6 mediates the regulation of sucrose metabolism and plant growth in Arabidopsis. *Plant Physiology* **153**: 99-113

Zhou R, Cutler AJ, Ambrose SJ, Galka MM, Nelson KM, Squires TM, Loewen MK, Jadhav AS, Ross AR, Taylor DC, Abrams SR (2004) A new abscisic acid catabolic pathway. *Plant Physiology* **134**: 361-369

Zhu J-K (2002) Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 247-273

8. Anhang

8.1. Semiquantitative Western Blots zur Einschätzung der anti-ABA scFv-Akkumulation in sich entwickelnden Karyopsen verschiedener immunmodulierter Linien

7. DAF

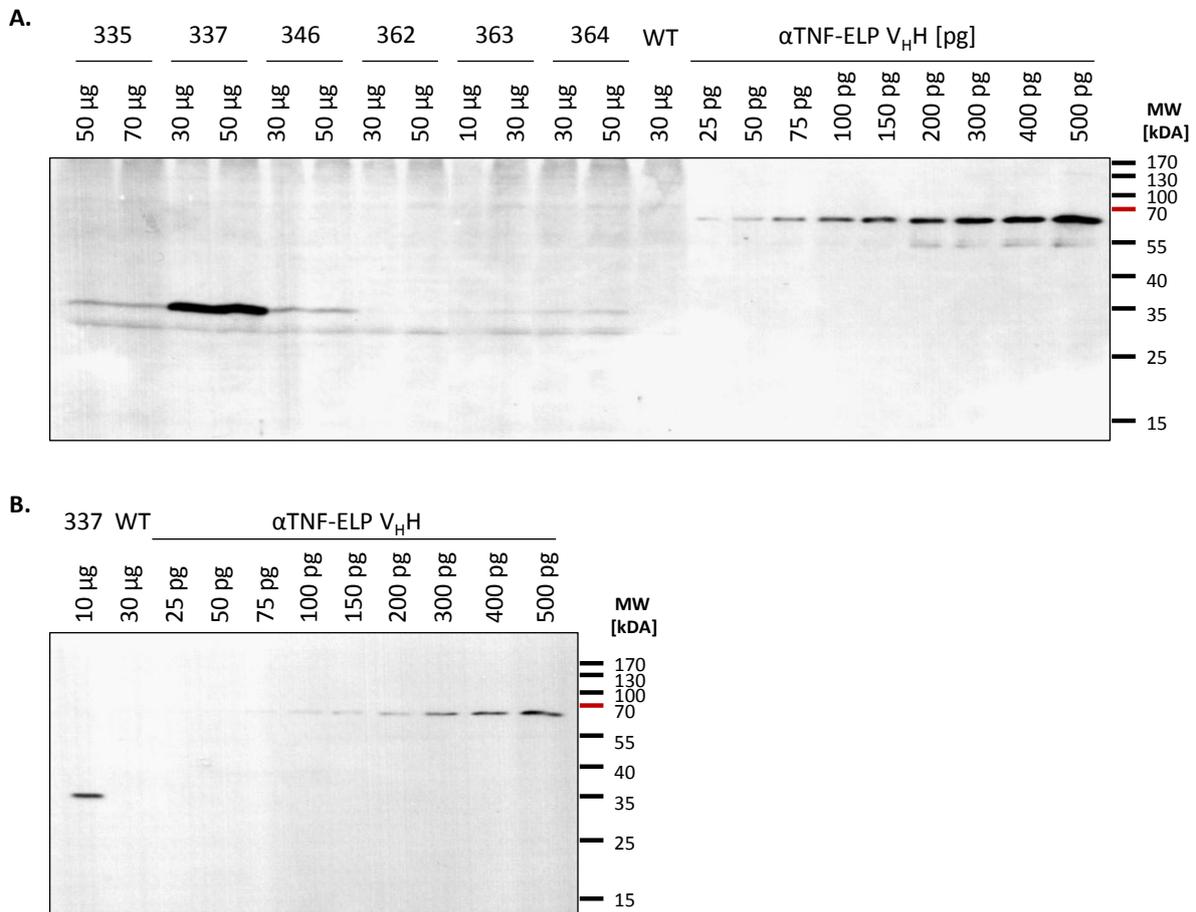


Abb. 36: Semiquantitativer Western Blot zur Einschätzung der anti-ABA scFv-Akkumulation in sich entwickelnden Karyopsen der in Tab. 2 gelisteten immunmodulierten Gerstenlinien am 7. DAF. Pro Spur wurden verschiedene Mengen Samenproteinextrakt und unterschiedliche Mengen des α TNF-ELP V_HH-Antikörpers aufgetragen. Nach der Trennung der Proteine im SDS-PAA-Gel (12%) unter reduzierenden Bedingungen erfolgte die Detektion im Western Blot mit dem anti-c-myc Antikörper gefolgt von einem anti-Maus IgG Peroxidasekonjugat und anschließender ECL-Reaktion (vgl. 3.6.1. bis 3.6.3.).

10. DAF

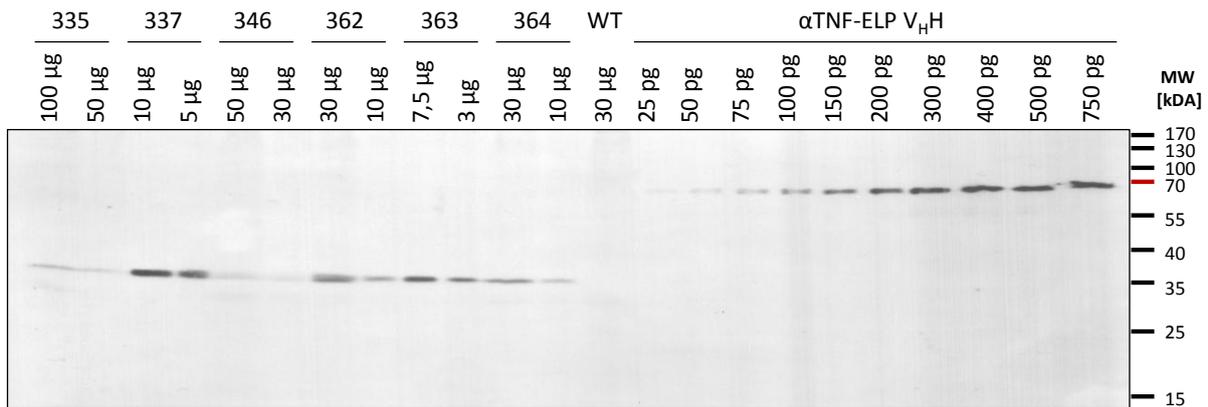
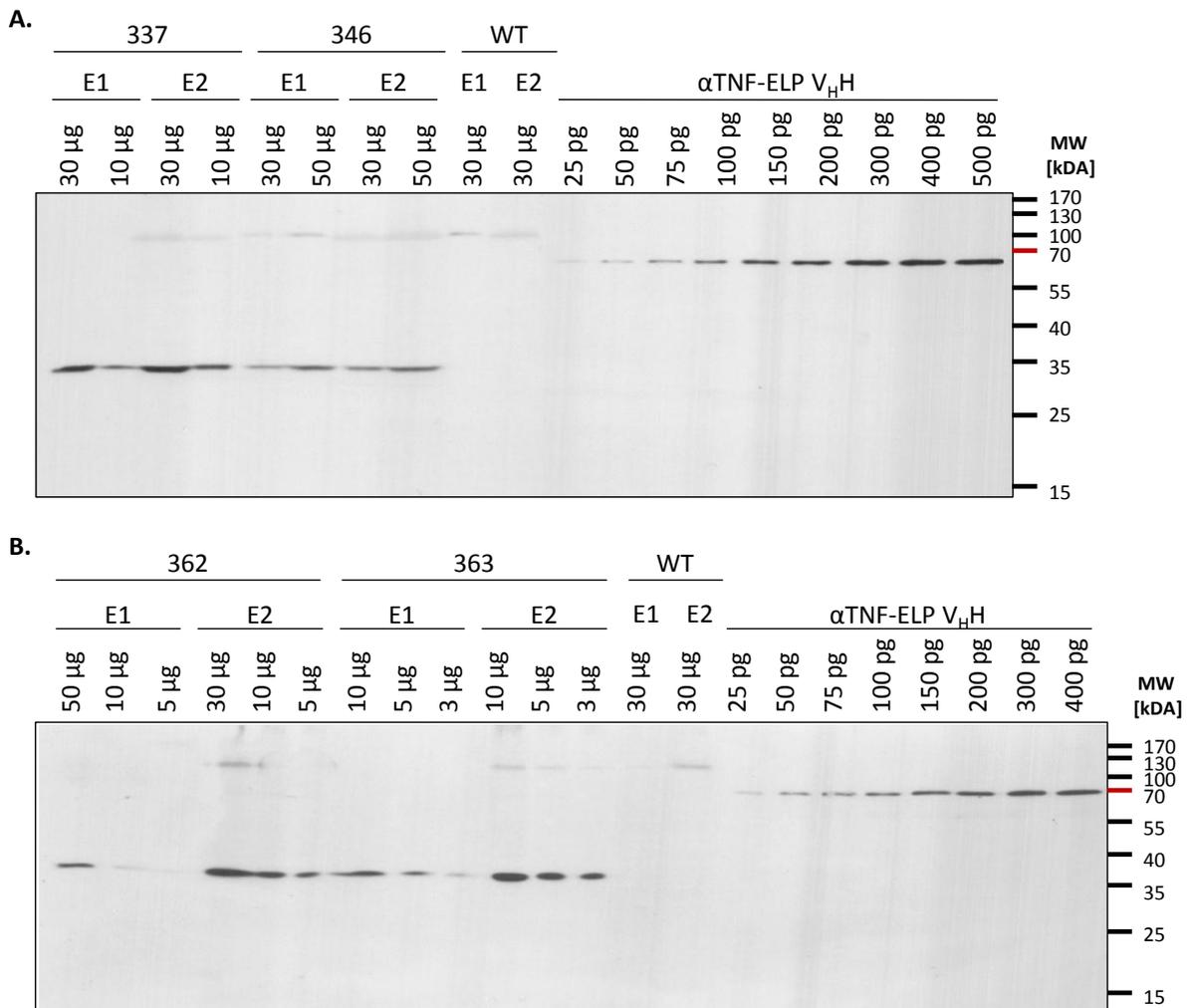


Abb. 37: Semiquantitativer Western Blot zur Einschätzung der anti-ABA scFv-Akkumulation in sich entwickelnden Karyopsen der in Tab. 2 gelisteten immunmodulierten Gerstenlinien am 10. DAF. Pro Spur wurden verschiedene Mengen Samenproteinextrakt und unterschiedliche Mengen des α TNF-ELP V_HH-Antikörpers aufgetragen. Nach der Trennung der Proteine im SDS-PAA-Gel (12%) unter reduzierenden Bedingungen erfolgte die Detektion im Western Blot mit dem anti-c-myc Antikörper gefolgt von einem anti-Maus IgG Peroxidasekonjugat und anschließender ECL-Reaktion (vgl. 3.6.1. bis 3.6.3.).

14. DAF



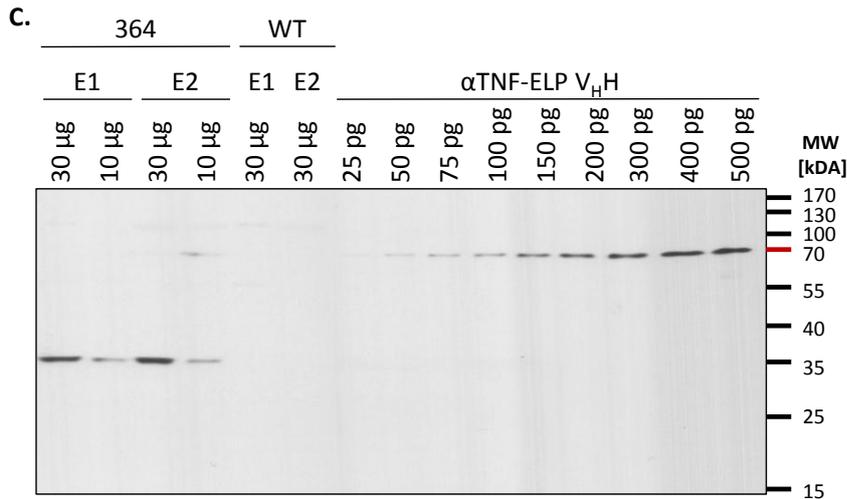


Abb. 38: Semiquantitativer Western Blot zur Einschätzung der anti-ABA scFv-Akkumulation in sich entwickelnden Karyopsen der in Tab. 2 gelisteten immunmodulierten Gerstenlinien am 14. DAF. Aufgrund der schwachen Transgenexpression in der Linie 335, wurden für die Karyopsen dieser Linie im Western Blot gesondert untersucht (siehe Abb. 41). Pro Spur wurden verschiedene Mengen Samenproteinextrakt und unterschiedliche Mengen des α TNF-ELP V_HH-Antikörpers aufgetragen. Nach der Trennung der Proteine im SDS-PAA-Gel (12%) unter reduzierenden Bedingungen erfolgte die Detektion im Western Blot mit dem anti-c-myc Antikörper gefolgt von einem anti-Maus IgG Peroxidasekonjugat und anschließender ECL-Reaktion (vgl. 3.6.1. bis 3.6.3.).

20. DAF

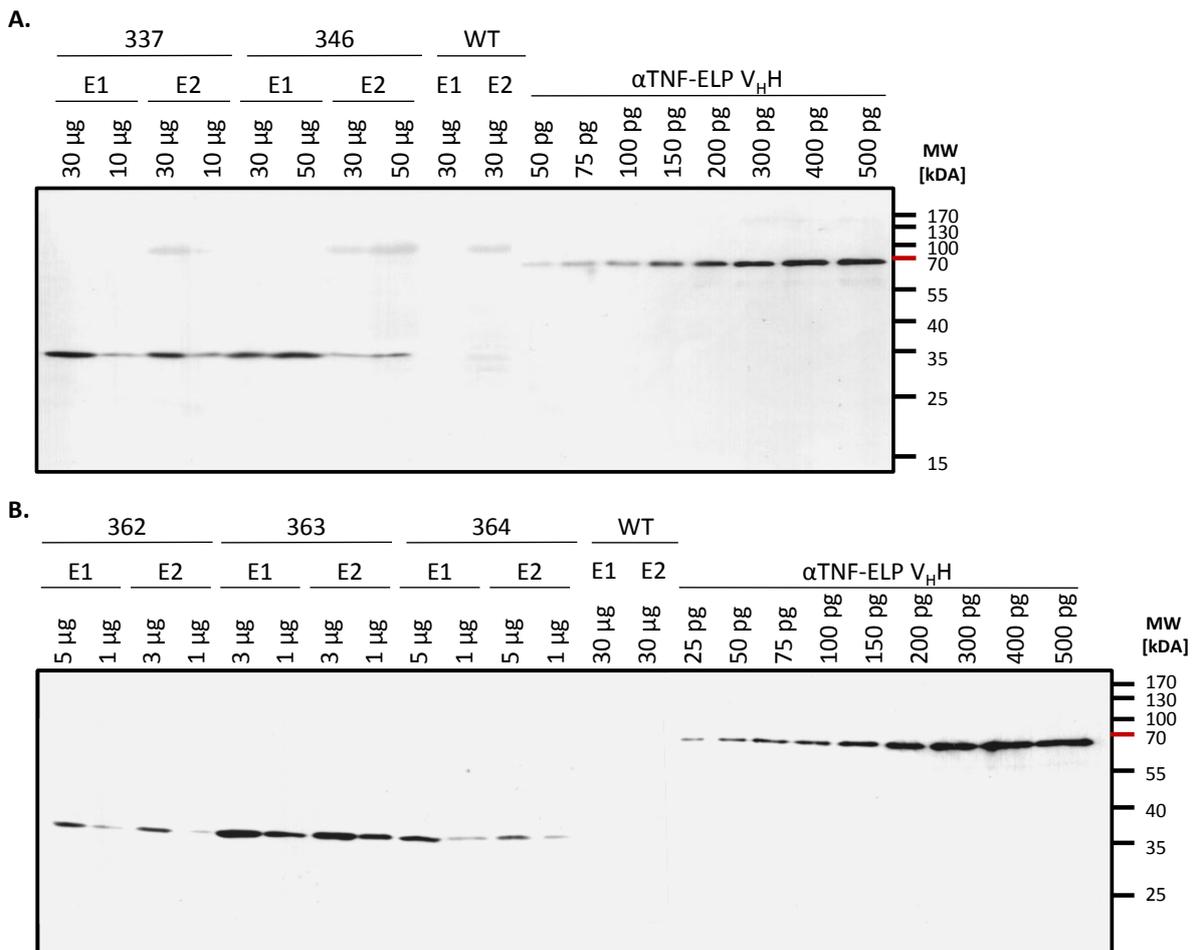
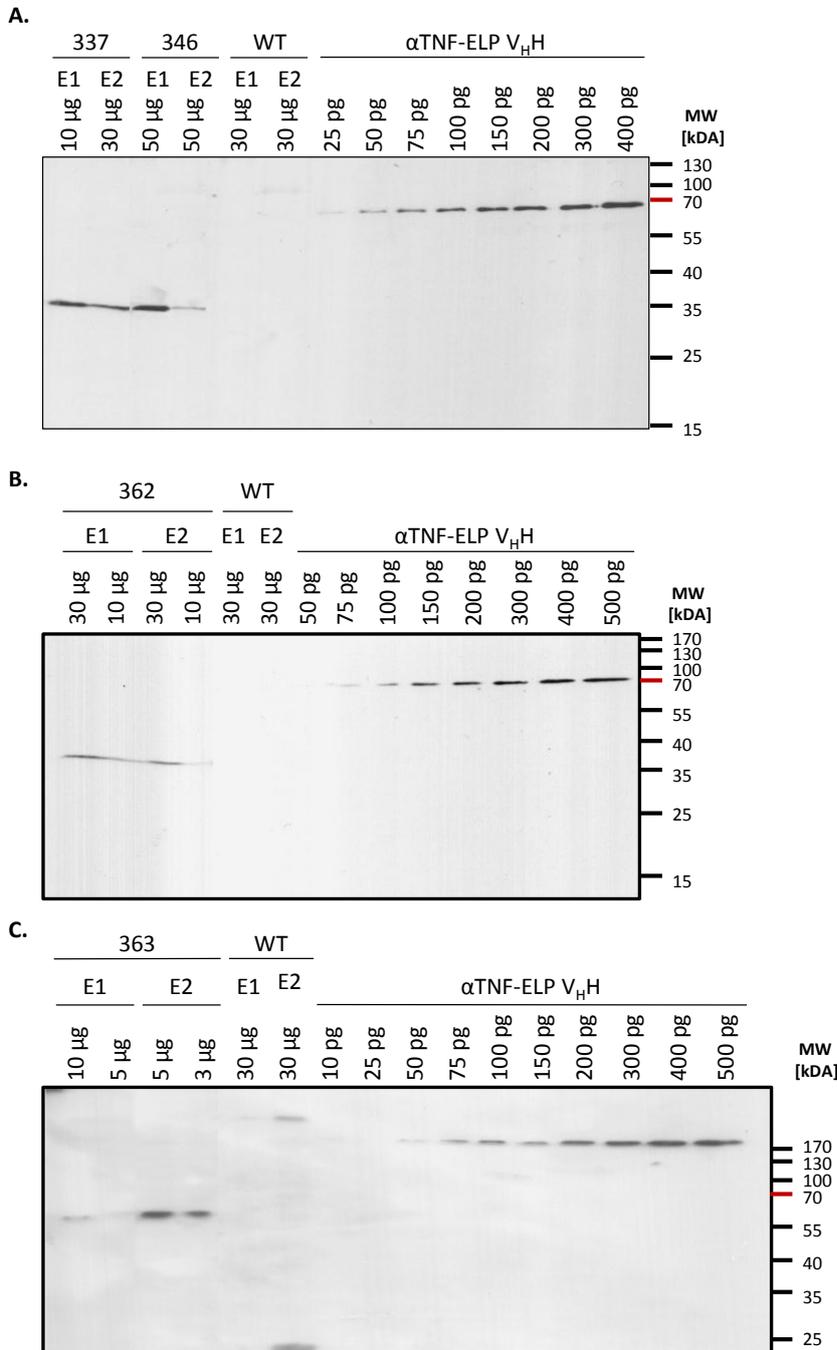


Abb. 39: Semiquantitativer Western Blot zur Einschätzung der anti-ABA scFv-Akkumulation in sich entwickelnden Karyopsen der in Tab. 2 gelisteten immunmodulierten Gerstenlinien am 20. DAF.

Aufgrund der schwachen Transgenexpression in der Linie 335, wurden für die Karyopsen dieser Linie im Western Blot gesondert untersucht (siehe Abb. 41). Pro Spur wurden verschiedene Mengen Samenproteinextrakt und unterschiedliche Mengen des α TNF-ELP V_HH-Antikörpers aufgetragen. Nach der Trennung der Proteine im SDS-PAA-Gel (12%) unter reduzierenden Bedingungen erfolgte die Detektion im Western Blot mit dem anti-c-myc Antikörper gefolgt von einem anti-Maus IgG Peroxidasekonjugat und anschließender ECL-Reaktion (vgl. 3.6.1. bis 3.6.3.).

Reife Karyopsen



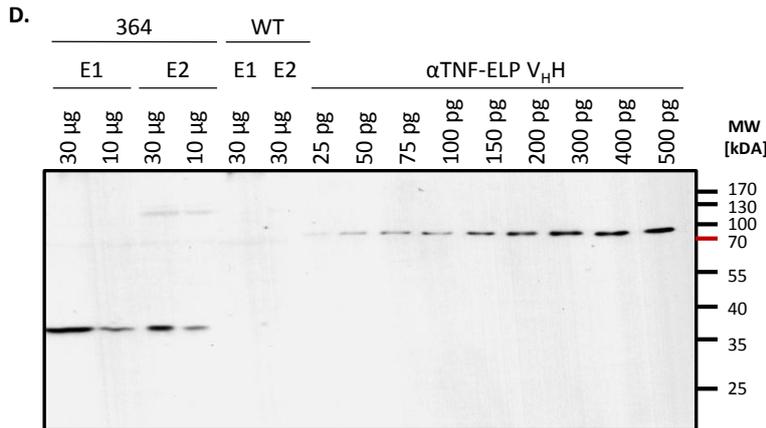


Abb. 40: Semiquantitativer Western Blot zur Einschätzung der anti-ABA scFv-Akkumulation in reifen Karyopsen der in Tab. 2 gelisteten immunmodulierten Gerstenlinien. Aufgrund der schwachen Transgenexpression in der Linie 335, wurden für die Karyopsen dieser Linie im Western Blot gesondert untersucht (siehe Abb. 41). Pro Spur wurden verschiedene Mengen Samenproteinextrakt und unterschiedliche Mengen des α TNF-ELP V_HH-Antikörpers aufgetragen. Nach der Trennung der Proteine im SDS-PAA-Gel (12%) unter reduzierenden Bedingungen erfolgte die Detektion im Western Blot mit dem anti-c-myc Antikörper gefolgt von einem anti-Maus IgG Peroxidasekonjugat und anschließender ECL-Reaktion (vgl. 3.6.1. bis 3.6.3.).

Proben der Linie 335

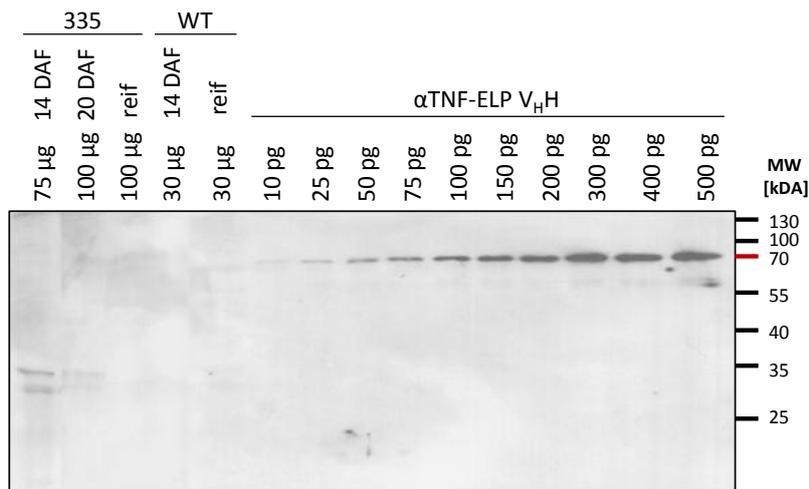


Abb. 41: Semiquantitativer Western Blot zur Einschätzung der anti-ABA scFv-Akkumulation in sich entwickelnden Karyopsen der immunmodulierten Gerstenlinie 335. Pro Spur wurden verschiedene Mengen Samenproteinextrakt und unterschiedliche Mengen des α TNF-ELP V_HH-Antikörpers aufgetragen. Nach der Trennung der Proteine im SDS-PAA-Gel (12%) unter reduzierenden Bedingungen erfolgte die Detektion im Western Blot mit dem anti-c-myc Antikörper gefolgt von einem anti-Maus IgG Peroxidasekonjugat und anschließender ECL-Reaktion (vgl. 3.6.1. bis 3.6.3.).

8.2. Absolutwerte der Microarray-Signalintensitäten von zwischen Linie 363 und Wildtyp differentiell exprimierten Genen

Tab. 10: Normalisierte Absolutwerte der Signalintensitäten im Microarray von zwischen Karyopsen der ABA-immunmodulierten Linie 363 und dem Wildtyp differentiell exprimierten Genen. Als differentiell exprimiert wurden solche Gene definiert, deren Expressionsstärke sich zwischen Wildtyp und Linie 363 in mindestens einer Gewebefraktion zu mindestens einem Entwicklungszeitpunkt um mindestens das Doppelte unterscheidet. Eine zwischen Wildtyp und Linie 363 signifikant verschiedene Expression ($t < 0,05$, Signifikanztest nach Benjamini und Hochberg, 1995) ist durch Fettdruck der entsprechenden Werte hervorgehoben. Das das \log_2 -transformierte Expressionsverhältnis zwischen Wildtyp und Linie 363 für die hier aufgeführten Gene ist in Tab. 8 angegeben. Der Farbcode hebt die Zeitpunkte und Stärke der deregulierten Genexpression hervor:

$$x = \log_2 \frac{[\text{Expression Linie 363}]}{[\text{Expression Wildtyp}]}$$

$-\infty < x \leq -2$ $-2 < x \leq -1$ $-1 < x < 1$ $1 \leq x < 2$ $2 \leq x < 4$ $4 \leq x < \infty$

Sequenz-ID	Annotation	Maternale Fraktion WT				Filiale Fraktion WT				Maternale Fraktion 363			Filiale Fraktion 363			
		7DAF	10DAF	14DAF		7DAF	10DAF	14DAF	20DAF	7DAF	10DAF	14DAF	7DAF	10DAF	14DAF	20DAF
ABA-Metabolismus																
A_13_P047996	HvNCED1	100,8	156,2	395,9	46,0	62,1	79,0	83,7	95,9	143,4	304,5	46,5	47,2	204,0	54,2	
A_13_P056111	HvNCED2	697,3	296,6	1669,3	150,2	185,9	367,2	241,3	924,6	661,1	2074,8	201,9	133,2	927,8	297,5	
A_13_P297012	HvCCD4	1332,8	2461,0	2103,2	76,6	145,7	225,4	927,5	1541,5	2394,3	2273,5	69,1	124,0	476,3	1205,7	
A_13_P255677	β -Glucosidase	27,9	24,0	26,6	26,4	25,3	63,3	65,8	26,3	23,6	26,8	26,0	23,8	53,6	133,9	
A_13_P261512	β -Glucosidase	43,0	80,4	587,1	30,8	28,1	128,5	159,0	60,5	99,7	315,1	26,1	26,0	374,1	243,2	
A_13_P449253	β -Glucosidase	894,2	785,7	4889,4	370,7	619,5	1255,8	2618,5	1703,7	1583,9	3042,2	429,8	886,1	1747,0	2757,1	
A_13_P571179	β -Glucosidase	846,3	234,4	80,0	2305,1	925,4	771,7	699,5	421,7	200,6	162,9	2000,7	549,7	633,3	705,5	
A_13_P085896	β -Glucosidase	6805,0	2290,4	169,8	92,4	51,8	24,2	27,7	3549,0	2074,9	351,1	66,0	38,0	23,6	28,8	
Signalweiterleitung - Calcium																
A_13_P440286	Ca ²⁺ -bindendes Protein, EF-Hand	762,0	132,1	691,7	249,7	360,2	828,1	652,1	1228,6	513,9	650,1	378,5	445,5	1560,4	531,8	
A_13_P407836	Ca ²⁺ -bindendes Protein	272,8	73,3	210,5	70,5	39,9	50,2	61,5	369,4	156,8	259,9	86,8	32,1	57,2	43,5	
A_13_P473013	Calmodulin	6631,7	2459,2	6635,4	313,4	178,1	200,7	282,1	7799,8	7930,3	8038,3	425,0	175,5	515,3	318,3	
A_13_P159590	Calmodulin	6418,3	2582,6	7137,7	352,5	185,4	203,5	266,8	7012,3	8363,3	7955,7	430,7	215,5	487,1	306,0	
A_13_P132815	Ca ²⁺ -bindendes Protein, EF-Hand	39673,5	10938,9	26098,4	10307,6	4027,4	5289,5	3379,4	63734,7	37262,5	34007,6	13101,1	4210,6	14170,8	5158,6	
A_13_P188229	Calcium-transportierende ATPase, putativ	1144,3	169,3	262,2	251,6	234,1	194,3	514,6	1515,3	412,2	313,5	274,6	172,1	638,4	352,5	
A_13_P168135	Calmodulin-bindendes Protein, putativ	432,8	125,0	440,8	260,0	105,4	187,3	63,6	881,7	520,8	419,7	371,5	84,7	420,6	98,7	
A_13_P445748	Ca ²⁺ -bindendes Protein	113,3	220,6	89,3	623,8	1442,6	2103,4	1496,7	74,4	197,4	369,0	815,8	4924,4	2954,8	2088,7	
A_13_P348572	Calnexin	8014,8	6465,5	7684,6	11299,5	15768,8	15814,3	12288,9	8924,8	9138,4	8503,9	14755,6	23927,0	32420,2	17153,6	
A_13_P042536	Ca ²⁺ -bindendes Protein, EF-Hand	22,7	28,6	30,0	27,0	51,4	60,3	55,4	24,2	27,9	28,4	27,3	104,7	67,2	55,0	
A_13_P489935	Calmodulin-bindende Proteinphosphatase, putativ	79,5	72,2	62,1	69,5	63,3	60,3	51,3	98,6	100,6	64,5	67,8	149,4	76,7	68,1	
A_13_P548494	Calmodulin-bindendes Protein	336,5	277,2	409,5	334,1	432,8	1391,9	1760,2	605,8	353,9	431,4	376,7	1011,3	1468,5	1826,4	
Signalweiterleitung - Kinase																
A_13_P183859	Proteinkinasedomäne enthaltendes Protein	645,6	616,5	248,3	3800,1	3117,3	1310,5	532,8	434,4	560,1	527,2	3678,8	2380,6	1094,1	553,6	
A_13_P129385	Serin/Threonin-Kinase	465,1	314,2	926,3	182,9	258,0	369,6	417,4	1426,9	535,4	823,2	312,6	341,7	491,1	444,1	

Sequenz-ID	Annotation	Maternale Fraktion WT				Filiale Fraktion WT				Maternale Fraktion 363			Filiale Fraktion 363			
		7DAF	10DAF	14DAF		7DAF	10DAF	14DAF	20DAF	7DAF	10DAF	14DAF	7DAF	10DAF	14DAF	20DAF
A_13_P464203	Serin/Threonin-Kinase	2534,0	1474,9	2190,5	1264,0	717,9	717,7	682,9	4085,4	3333,4	2343,5	1517,5	893,8	1048,2	712,7	
A_13_P213164	Serin/Threonin-Kinase	1452,5	914,2	3070,3	723,2	1707,3	2003,8	2005,2	2758,1	1960,6	2529,7	1098,0	2343,6	3318,6	1629,9	
A_13_P186239	Proteinkinasedomäne enthaltendes Protein	1173,1	414,5	1333,2	167,6	146,8	186,6	110,0	1388,8	1143,9	1458,3	152,4	145,6	267,7	135,4	
A_13_P053686	Rezeptorkinase mit leuzinreichen Repeats	421,8	130,7	318,7	55,3	27,4	30,4	60,6	412,9	273,9	233,4	59,1	29,1	37,1	47,6	
A_13_P174265	Serin/Threonin-Kinase	12750,6	1805,1	11763,6	2166,7	1162,6	1094,3	1297,7	22029,9	10488,7	14649,3	4287,5	1359,4	4697,8	963,8	
A_13_P156135	CBL-interagierende Proteinkinase	10847,8	2401,9	5879,4	2162,8	1595,1	2051,2	1062,4	22913,6	7482,5	5600,9	3355,6	1165,0	5178,7	1103,5	
A_13_P167635	Serin/Threonin-spezifische Rezeptorkinase	23,8	25,9	31,4	25,4	25,9	28,0	28,9	24,9	26,8	33,2	29,1	26,7	75,9	210,5	
A_13_P237143	Serin/Threonin-spezifische Rezeptorkinase	24,1	25,0	24,9	23,1	24,0	24,1	23,8	23,8	27,3	24,1	23,9	24,8	33,0	49,8	
A_13_P477915	Serin/Threonin-Kinase	178,3	254,9	488,7	209,0	218,7	185,4	305,4	169,1	272,1	401,6	209,0	234,9	384,6	472,1	
A_13_P052366	Rezeptorkinase	1710,2	596,9	1293,8	497,3	247,8	323,2	377,2	2909,4	894,1	994,7	583,7	254,3	682,9	348,4	
A_13_P424401	Serin/Threonin-Kinase	44,5	38,5	55,6	37,4	75,3	180,9	132,8	49,5	41,7	53,2	37,5	185,2	161,2	245,8	
A_13_P489865	Zellwand-assoziierte Kinase	30,0	30,7	31,6	29,3	32,5	54,2	44,9	30,3	32,6	31,2	29,4	71,5	59,5	63,1	
A_13_P248273	CBL-interagierende Proteinkinase	346,8	482,4	114,4	125,6	127,6	135,8	150,7	434,7	309,3	155,7	139,7	316,9	146,7	302,9	
A_13_P193114	Rezeptorkinase	36,0	59,8	39,1	38,2	41,5	44,5	48,7	43,4	53,0	40,4	36,8	92,1	54,6	48,0	
A_13_P518869	Serin/Threonin-spezifische Rezeptorkinase	38,4	38,1	45,5	40,4	36,6	33,0	29,1	38,9	38,2	39,6	38,0	78,3	34,1	30,3	
A_13_P008516	Rezeptorkinase	22,7	21,9	33,5	20,9	22,1	22,2	22,8	26,3	22,5	26,7	41,8	22,2	24,1	21,8	
Signalweiterleitung - Phosphatase																
A_13_P096400	Saure Phosphatase, putativ	137,6	98,1	79,9	56,1	86,4	43,2	101,3	65,8	64,0	106,7	40,6	46,5	64,1	284,8	
A_13_P239175	Serin/Threonin-Phosphatase, putativ	735,7	77,3	619,1	155,9	84,2	100,4	60,7	1338,8	448,5	669,6	254,1	80,7	232,0	58,3	
A_13_P400350	Serin/Threonin-Phosphatase, regulatorische UE	73,2	89,1	75,1	74,0	93,3	78,3	61,8	79,2	82,8	80,0	74,2	191,7	97,0	87,1	
Signalweiterleitung - Transkriptionsfaktoren																
A_13_P105570	B3-Transkriptionsfaktor	54,2	46,7	28,1	241,5	303,7	113,7	106,4	41,7	48,8	60,6	238,2	255,9	121,9	135,2	
A_13_P057231	B3-Transkriptionsfaktor	261,9	104,5	562,7	165,6	351,0	932,0	752,7	936,3	286,9	583,9	196,0	658,0	1406,1	653,9	
A_13_P567134	bHLH Transkriptionsfaktor	247,7	98,8	196,1	77,5	68,9	89,0	76,8	684,1	153,2	206,2	77,2	102,9	96,3	90,4	
A_13_P397955	bHLH DNA-Bindedomäne-enthaltendes Protein	24606,8	16010,2	4172,1	6828,5	4956,5	3890,6	7549,1	30243,6	16257,0	11900,3	7156,5	6733,6	3125,6	8260,9	
A_13_P084621	bHLH DNA-Bindedomäne-enthaltendes Protein	48261,6	23087,6	6431,5	10911,4	8316,7	6131,3	10210,8	48824,2	25052,8	16553,2	10166,6	9784,8	4151,8	11639,1	
A_13_P554779	bHLH Transkriptionsfaktor	77,8	227,3	495,1	284,1	195,0	181,6	154,2	185,3	318,2	270,3	381,7	233,3	134,5	202,9	
A_13_P177819	bHLH Transkriptionsfaktor	918,4	257,1	1335,6	76,8	35,7	62,1	57,5	3085,3	953,4	1141,1	70,0	33,9	235,2	45,6	
A_13_P145215	bZIP Transkriptionsfaktor	122,1	53,5	76,4	126,2	94,8	70,7	75,3	269,8	88,5	93,6	155,8	100,7	99,8	95,4	
A_13_P021631	bZIP Transkriptionsfaktor	714,7	797,9	389,8	586,1	168,7	99,6	267,5	645,8	1260,9	976,2	407,7	160,5	73,0	283,4	
A_13_P049116	HSF-Typ DNA-Bindedomäne-enthaltendes Protein	807,2	2027,8	1328,5	1124,7	1087,0	846,6	728,8	1630,9	3594,6	1530,6	1263,3	1132,3	1053,8	602,0	
A_13_P182659	HSF-Typ DNA-Bindedomäne-enthaltendes Protein	2348,2	7158,6	4045,7	3508,6	3716,1	3129,0	2723,6	6251,7	11072,9	5371,7	3949,3	3441,4	3121,0	2071,8	
A_13_P110065	MADS-Box Protein	347,4	324,9	446,0	89,5	83,4	81,4	146,8	659,0	662,5	507,7	126,5	108,6	91,1	210,0	
A_13_P158675	MYB Transkriptionsfaktor	118,9	75,3	176,5	89,4	203,4	256,8	331,4	342,8	158,4	219,9	105,9	306,3	321,9	356,5	
A_13_P174985	MYB Transkriptionsfaktor	950,1	207,9	1412,4	107,2	251,7	596,8	726,5	1490,8	1492,6	1589,6	123,5	354,3	819,6	1020,9	
A_13_P402005	MYB Transkriptionsfaktor	119,5	77,8	42,8	572,9	408,8	216,5	204,3	84,1	82,1	94,3	676,7	413,7	253,6	180,5	

Sequenz-ID	Annotation	Maternale Fraktion WT				Filiale Fraktion WT				Maternale Fraktion 363			Filiale Fraktion 363			
		7DAF	10DAF	14DAF		7DAF	10DAF	14DAF	20DAF	7DAF	10DAF	14DAF	7DAF	10DAF	14DAF	20DAF
A_13_P517529	MYB Transkriptionsfaktor	79,7	39,0	296,6	50,2	29,6	41,7	37,2	69,1	94,4	315,9	59,8	31,1	76,2	41,1	
A_13_P421415	NAC Transkriptionsfaktor	28180,1	7299,2	27819,5	7157,7	5017,8	8633,8	2678,9	44086,2	27429,9	23078,8	6963,6	3450,8	10271,7	3914,2	
A_13_P004176	NAC Transkriptionsfaktor	12716,7	3156,1	12945,4	3479,0	2582,9	4417,7	1420,4	20355,4	11938,1	10437,1	3168,2	1787,7	4801,8	1955,6	
A_13_P576509	PHD Transkriptionsfaktor	1724,7	514,7	3820,9	373,5	327,1	759,3	707,8	1755,1	1695,5	3077,0	540,3	365,5	1842,0	553,0	
A_13_P497119	PHD-Transkriptionsfaktor	647,2	518,5	767,8	279,7	386,7	590,0	626,4	1667,3	943,5	756,7	325,7	494,1	1029,2	472,5	
A_13_P075311	WRKY Transkriptionsfaktor	4464,7	820,0	8777,5	617,3	167,0	732,0	440,8	8191,1	5450,3	7863,0	786,6	150,8	2893,1	635,5	
A_13_P151415	WRKY Transkriptionsfaktor	8710,0	2237,8	9009,8	680,6	205,3	237,2	123,3	12597,7	8241,3	10243,6	844,4	124,0	525,9	123,6	
A_13_P155985	Zinkfinger Transkriptionsfaktor	1448,0	1317,6	822,3	6310,3	5452,6	4969,3	4212,1	795,7	1071,0	1684,8	6006,4	5406,6	4501,6	4258,3	
A_13_P579614	Zinkfinger Transkriptionsfaktor	143,6	32,7	169,4	61,6	47,7	86,2	56,4	409,0	97,4	187,4	95,0	46,5	116,4	55,6	
A_13_P408241	Zinkfinger Transkriptionsfaktor	1029,4	886,3	2298,3	534,6	1083,2	2602,0	3400,1	1614,9	2285,7	2209,6	719,3	2125,2	3802,0	3567,1	
A_13_P226709	Zinkfinger Transkriptionsfaktor	396,6	68,8	248,1	40,8	31,4	67,9	46,8	638,2	242,7	297,0	40,1	28,1	143,9	46,4	
A_13_P165035	Zinkfinger Transkriptionsfaktor	6246,1	2276,4	12672,3	543,3	775,1	2822,7	3399,3	11724,4	10143,2	13292,3	799,4	1542,7	5943,1	3303,7	
A_13_P038806	Zinkfinger Transkriptionsfaktor	7271,7	2089,2	9151,9	2292,5	976,2	1313,6	1085,0	11323,0	6139,3	8249,7	2589,0	1058,5	3363,6	1647,7	
A_13_P150290	Zinkfingerdomäne-enthaltendes Protein	2115,3	365,0	1915,7	1349,5	260,2	537,1	1427,3	11164,2	2251,6	1864,4	2146,2	251,5	2080,8	968,2	
A_13_P200164	Zinkfinger Transkriptionsfaktor	1065,5	1016,1	1004,9	305,1	388,1	488,7	364,1	921,6	1042,2	1283,0	334,3	311,5	435,1	753,7	
A_13_P017271	Zinkfinger Transkriptionsfaktor, stressassoziiert	1179,9	1382,1	894,8	775,7	1474,9	2972,7	3116,5	2088,3	1802,4	1018,2	917,9	2151,9	4023,3	6961,1	
A_13_P021971	Zinkfinger Transkriptionsfaktor	60,0	41,7	82,1	22,9	23,4	60,8	254,1	57,8	48,1	57,8	24,0	25,5	79,5	574,7	
A_13_P169420	Zinkfinger Transkriptionsfaktor	2095,7	1467,8	3820,1	1113,4	874,1	653,1	416,0	2173,7	1798,3	4004,8	1339,5	882,7	842,6	937,9	
A_13_P321957	Zinkfinger Transkriptionsfaktor	93,4	107,1	108,4	90,4	101,0	92,9	119,4	109,8	128,9	115,2	106,7	237,9	126,4	125,8	
A_13_P357567	AP2/EREBP Transkriptionsfaktor	92,4	125,6	137,6	137,6	822,5	497,1	484,5	105,2	129,6	189,9	167,3	1371,1	796,9	2743,1	
A_13_P328062	AP2/EREBP Transkriptionsfaktor	75,2	95,7	92,2	109,7	571,3	306,5	241,5	77,4	86,7	117,5	107,8	646,7	426,2	1353,6	
A_13_P359547	AP2/EREBP Transkriptionsfaktor	35,3	39,5	30,0	31,7	40,0	45,2	40,4	32,7	36,0	30,7	33,2	111,0	59,5	51,1	
A_13_P055001	bHLH Transkriptionsfaktor	20,9	24,6	26,0	22,3	25,1	78,1	212,3	21,6	24,1	26,0	24,6	25,7	149,9	475,9	
A_13_P247228	bHLH Transkriptionsfaktor	48,2	76,2	196,5	46,3	391,5	5365,0	21241,2	47,7	59,3	167,1	46,1	1712,9	6895,0	11186,3	
A_13_P157295	bZIP Transkriptionsfaktor	33,8	35,4	31,5	298,5	204,7	287,1	152,0	29,8	36,9	37,9	343,5	595,7	273,0	125,1	
A_13_P152875	Homeobox-Transkriptionsfaktor	32,1	30,2	31,5	35,4	64,4	46,1	52,2	34,5	29,9	30,3	37,8	136,0	49,3	56,3	
A_13_P478150	Homeobox-Transkriptionsfaktor	48,7	54,3	51,2	58,6	77,9	71,6	51,3	62,4	60,2	57,5	53,0	172,6	90,7	68,2	
A_13_P075391	MADS-Box Transkriptionsfaktor	242,2	220,1	536,2	150,7	141,0	148,9	156,4	301,2	295,7	311,0	144,5	213,4	192,4	314,6	
A_13_P361297	MADS-Box Transkriptionsfaktor	88593,0	53335,3	35562,9	9569,3	9612,8	13275,7	9269,3	78698,7	74886,6	42901,5	5517,5	7708,5	8196,2	30054,5	
A_13_P000236	MADS-Box Transkriptionsfaktor	87,6	121,1	169,4	85,5	125,1	590,4	608,9	73,4	93,5	156,1	86,1	349,6	674,4	1471,0	
A_13_P396115	MYB Transkriptionsfaktor	577,0	391,5	658,8	270,8	209,2	200,6	116,9	605,5	578,2	558,9	301,1	236,3	222,8	252,4	
A_13_P156630	MYB Transkriptionsfaktor	189,1	53,8	318,9	72,1	49,3	71,7	150,1	177,7	89,4	213,6	62,4	39,0	184,9	188,7	
A_13_P152705	MYB Transkriptionsfaktor	1014,9	4054,2	18803,6	1214,7	1640,4	4576,0	11557,2	1320,0	3548,4	9631,5	1463,8	3336,0	4007,8	8155,3	
A_13_P341882	NAC Transkriptionsfaktor	50,2	149,6	1855,9	67,4	3992,7	19598,1	23368,0	41,7	89,1	1335,3	76,8	13570,1	27588,0	24451,6	
Signalweiterleitung - anderes																
A_13_P416840	Nitratreduktase	216,3	202,9	121,3	510,2	172,4	154,9	122,1	193,5	424,3	504,0	535,9	389,7	100,2	143,9	

Sequenz-ID	Annotation	Maternale Fraktion WT				Filiale Fraktion WT				Maternale Fraktion 363			Filiale Fraktion 363			
		7DAF	10DAF	14DAF		7DAF	10DAF	14DAF	20DAF	7DAF	10DAF	14DAF	7DAF	10DAF	14DAF	20DAF
A_13_P247903	Trehalose-6-phosphat Synthase	5067,0	5420,1	14311,3	1436,9	1259,3	3948,6	3087,1	10546,6	8564,3	12895,7	1295,4	1401,4	9090,5	2337,9	
A_13_P125685	Trehalosephosphat Phosphatase	367,9	138,2	279,0	125,8	73,8	41,0	40,0	814,1	318,6	318,5	144,6	47,3	48,6	42,9	
A_13_P056101	Trehalosephosphat Phosphatase	139,4	297,8	255,1	193,5	444,6	1003,3	842,0	110,7	195,0	510,8	178,6	943,2	1202,9	1079,6	
A_13_P353617	Guanylatcyclase	1252,1	1688,1	2703,5	707,3	480,5	340,4	289,1	2327,4	3555,0	2773,3	812,5	544,9	483,3	252,6	
A_13_P450028	Guanylatcyclase	2995,5	3957,8	6220,3	1535,1	1121,4	826,3	712,3	5785,2	9329,0	6430,2	1875,4	1408,5	1230,3	625,4	
A_13_P280809	Homolog zu AtMFT	47,9	112,5	58,3	58,0	61,0	54,9	49,3	71,4	78,9	63,3	53,6	181,2	80,8	65,1	
Glykolyse																
A_13_P273269	Phosphofruktokinase	24,9	24,5	35,2	25,7	45,8	151,9	109,5	27,0	24,3	33,2	25,5	96,1	132,5	195,9	
Speicherung und Remobilisierung																
A_13_P303717	Saccharose Synthase	93,0	147,6	127,9	82,3	106,6	99,8	110,3	119,9	145,1	135,1	85,0	304,9	131,8	130,8	
A_13_P122235	Stärkeinitiiierendes Protein	119,6	118,9	320,2	240,7	188,8	511,9	740,5	170,1	168,1	218,5	280,5	238,2	1093,5	961,2	
A_13_P081986	Stärkeverzweigendes Enzym	3295,2	3108,0	6441,9	3271,3	14225,6	90678,0	102121,7	2652,7	2425,9	5025,6	2678,7	30879,4	80699,9	115072,1	
A_13_P289797	Limit Dextrinase	48,2	43,1	41,4	46,8	92,7	142,5	186,3	51,3	45,7	43,6	51,9	202,3	193,8	272,7	
A_13_P000166	α-Amylase AMY3	25,8	25,5	23,9	21,9	31,9	116,9	142,0	24,4	25,2	29,9	23,1	64,9	87,0	113,1	
A_13_P346212	β-Amylase BAM1	51,2	164,1	11731,9	46,7	7279,8	92034,3	82888,8	59,1	104,9	4960,1	53,1	39183,1	101872,0	93787,5	
A_13_P121089	β-Amylase BAM1	32,8	92,8	5978,8	43,3	6892,9	99067,2	88034,5	43,5	66,4	2715,6	47,3	39381,5	103779,4	88040,5	
A_13_P366907	β-Amylase BAM1	55,2	148,6	10228,8	37,7	7812,9	96079,3	77492,4	78,3	111,2	4688,4	43,1	43047,9	100043,7	94348,9	
A_13_P006606	β-Amylase BAM1	65,7	287,2	13596,3	54,9	7024,8	91521,3	91650,1	74,3	149,9	6408,3	59,5	41018,6	89574,1	92731,4	
A_13_P229694	β-Amylase BAM1	33,6	208,0	16616,1	39,1	5685,3	89285,0	90938,8	39,3	94,8	6574,6	39,6	34526,2	90207,5	99928,4	
A_13_P275664	β-Amylase BAM1	142,1	374,7	12955,2	112,2	6067,6	85605,8	102444,8	134,7	196,4	6276,6	100,2	28439,1	76132,4	115234,6	
A_13_P281219	β-Amylase BAM1	54,2	435,6	27754,7	46,5	10793,3	93006,1	75908,4	51,6	159,9	11464,9	52,8	50069,8	82691,1	81727,7	
A_13_P236194	β-Amylase BAM1	51,7	375,9	28331,4	46,7	12750,3	94662,8	81709,9	67,1	175,7	12265,3	62,0	52678,7	71141,0	79898,0	
A_13_P578614	β-Amylase BAM1	47,7	82,1	3605,8	46,8	6535,9	121861,9	83039,2	51,8	64,5	1523,9	63,1	30523,4	96966,7	89803,6	
A_13_P230644	β-Amylase BAM1	745,1	665,7	3458,4	90,2	6300,4	111135,4	88145,4	975,3	422,9	1566,8	78,7	29020,1	96753,9	94858,1	
A_13_P344947	β-Amylase BAM1	32,4	134,9	11594,8	43,4	8737,3	119948,2	77317,1	40,7	85,7	4652,4	45,4	38901,9	85583,7	87098,6	
A_13_P053816	β-Amylase BAM2	190605,0	112877,7	5837,6	6530,9	892,1	213,6	48,0	174034,7	101509,2	16143,4	3351,5	525,9	160,4	68,0	
A_13_P303162	β-Amylase BAM2	232486,3	55603,7	2207,8	3848,8	836,1	564,2	383,1	249832,9	57926,1	5172,3	2406,8	638,6	503,9	387,5	
A_13_P229794	β-Amylase BAM2	132955,9	124903,4	9152,9	8708,9	1059,1	282,9	58,7	158440,4	143325,4	27539,8	5274,1	764,8	216,8	114,9	
A_13_P258482	β-Amylase BAM2	188367,9	81728,4	3786,9	4685,9	881,8	249,7	71,2	224656,8	92807,5	12188,2	2569,8	518,3	179,6	105,9	
A_13_P303677	Methionin Synthase	122,5	273,0	145,8	154,6	138,3	126,6	190,0	146,8	174,8	163,3	139,7	287,1	152,9	234,7	
A_13_P355872	Asparagin Synthetase	24,7	44,2	1661,4	24,6	211,2	9025,0	10704,3	25,3	41,3	879,5	24,0	1108,8	7443,4	11413,7	
A_13_P355652	Asparagin Synthetase	22,8	24,6	203,7	27,6	55,9	1572,9	1534,0	21,9	24,1	109,2	30,6	159,3	1440,7	1534,4	
A_13_P021211	Asparagin Synthetase	25,1	27,2	204,2	23,9	53,0	1145,6	1282,4	25,3	26,0	151,3	23,2	117,2	889,5	1334,3	
A_13_P135200	Asparagin Synthetase	23,9	27,8	185,4	23,5	46,1	966,9	1142,6	24,3	29,5	138,2	22,8	101,9	821,5	1399,6	
A_13_P490690	Dihydroxysäure-Dehydratase	40,3	43,7	44,6	46,9	38,2	45,6	35,2	45,7	52,8	53,1	41,2	77,8	52,4	56,3	
A_13_P047096	Aminotransferase	97,5	98,4	572,3	517,7	1489,9	17203,9	23968,3	70,5	81,3	669,9	736,2	9049,3	17103,1	27211,9	

Sequenz-ID	Annotation	Maternale Fraktion WT			Filiale Fraktion WT				Maternale Fraktion 363			Filiale Fraktion 363			
		7DAF	10DAF	14DAF	7DAF	10DAF	14DAF	20DAF	7DAF	10DAF	14DAF	7DAF	10DAF	14DAF	20DAF
A_13_P420280	Pyridoxin-Biosynthese Protein	53,3	57,7	58,6	121,1	303,8	330,8	178,3	56,1	66,8	71,8	142,7	753,7	358,8	211,0
A_13_P285219	Pyridoxin-Biosynthese Protein	30,0	30,1	33,5	39,0	41,0	37,3	29,3	33,5	34,5	35,1	38,1	88,7	45,0	37,9
A_13_P316582	Anthranilat-Phosphoribosyltransferase	50,5	66,4	46,8	45,8	55,9	45,5	47,5	49,5	53,7	49,0	47,2	124,3	59,0	51,1
A_13_P213884	Anthranilat-Phosphoribosyltransferase	28,2	28,8	27,9	27,8	40,0	37,3	37,7	27,5	29,1	29,5	29,0	87,2	42,2	47,6
A_13_P115155	Glutamate decarboxylase	1034,4	184,2	428,2	379,8	93,5	140,8	1039,9	1312,7	516,7	449,4	577,1	115,5	284,8	542,0
A_13_P155355	L-Asparaginase	1430,1	2150,9	12619,2	350,2	587,4	2091,4	12245,0	1469,3	4410,7	15071,3	351,1	1671,5	1658,0	18028,0
A_13_P651993	Hordein B	284,9	2636,6	52477,8	164,1	53688,1	111302,1	139783,2	141,4	1356,9	29970,7	508,3	109413,5	125607,7	136094,9
A_13_P643214	Hordein B	60,5	352,1	4686,0	75,1	10913,8	42189,4	61886,9	46,0	204,8	3024,6	148,5	27603,8	45620,9	59155,6
A_13_P631917	Hordein B	120,1	611,9	8879,9	153,3	18106,0	59398,5	82648,3	71,3	366,6	5025,5	311,8	42746,1	65109,7	76888,1
A_13_P641604	Hordein B	47,0	221,1	3659,3	50,6	10334,6	36362,0	47963,8	44,7	141,1	2289,4	95,6	23746,3	39896,2	50483,5
A_13_P588554	Hordein C	70,9	759,3	7900,0	48,5	6746,0	42191,9	75321,2	56,6	355,0	5408,2	55,6	17916,5	41388,0	54965,3
A_13_P075891	Hordein D	22,2	32,3	129,8	23,8	212,6	1129,6	1512,6	26,1	28,5	98,8	22,8	522,3	1105,1	1348,7
A_13_P125730	Hordein D	23,6	26,9	104,6	25,4	175,5	1237,9	234,6	23,0	27,4	143,0	25,8	570,8	2175,1	252,9
A_13_P642609	γ-Hordein	68,8	191,8	1915,9	65,0	7412,1	28946,8	54174,7	47,1	149,2	1513,0	125,0	17365,5	31936,9	42667,3
A_13_P604643	γ-Hordein	33,4	53,1	387,4	42,0	2433,8	11858,8	19670,3	37,1	48,6	340,2	55,5	5260,7	13164,8	18173,9
A_13_P120960	Hordein	47,9	68,4	85,0	84,0	766,2	803,2	538,6	36,6	73,8	117,6	112,8	1611,6	1027,2	738,0
A_13_P440711	Samenspeicherglobulin	33,5	80,0	492,5	59,6	2658,5	11375,5	14137,5	33,5	59,4	352,5	65,5	7091,6	15276,9	10500,6
A_13_P439836	Samenspeicherglobulin	38,9	92,7	970,8	73,3	4089,0	17322,5	23391,1	31,7	63,7	650,9	88,6	9943,4	22807,0	16943,0
A_13_P441396	Samenspeicherglobulin	51,0	133,5	1320,5	106,0	6392,8	28748,4	26831,2	37,6	82,4	790,0	109,8	13040,9	27880,3	21799,6
A_13_P353262	Globulin	99,2	690,4	19646,8	243,8	9640,4	85603,0	89534,7	79,2	349,2	10180,0	273,2	34176,2	91727,6	100468,8
A_13_P565319	Globulin	52,8	66,0	75,4	98,0	125,8	100,5	61,4	55,4	80,2	89,0	105,8	329,8	118,0	122,8
LEA															
A_13_P276139	Em-Protein	29,3	24,8	40,3	23,7	27,2	113,7	1345,4	52,6	27,6	39,4	29,8	25,2	122,7	3853,2
A_13_P558299	Em-Protein	73,8	36,3	112,8	56,9	46,7	349,4	6770,2	202,9	56,8	102,2	58,8	37,7	565,4	22287,3
A_13_P257787	Em-Protein	118,4	82,6	149,8	88,1	94,4	393,1	8103,8	281,3	96,1	150,3	90,8	117,1	755,7	25343,7
A_13_P414640	Em-Protein	41,4	35,3	94,5	34,2	52,8	454,6	1912,4	37,8	36,8	63,5	33,6	79,7	348,2	4098,6
A_13_P118135	Em-Protein	70,0	70,4	129,1	66,5	63,7	309,4	7896,1	230,1	97,4	125,6	68,9	156,0	600,0	21628,5
A_13_P255937	Em-Protein	31,6	40,0	33,2	26,3	43,8	116,5	86,2	30,0	34,0	30,8	26,2	96,8	90,2	140,5
A_13_P545884	Dehydrin	51,9	191,5	360,2	46,1	71,7	794,0	7078,5	57,6	94,5	182,5	46,7	181,7	794,3	10870,5
A_13_P433061	Dehydrin	135,1	173,4	360,0	43,0	51,0	158,7	229,1	162,2	127,4	308,9	40,1	63,7	127,7	600,1
A_13_P267027	Dehydrin	1153,8	500,0	1419,2	321,6	144,8	148,9	170,5	1672,3	1192,5	1693,0	336,7	140,9	189,6	344,4
A_13_P437861	LEA-Protein Klasse 3/4	46,8	57,6	60,4	25,8	29,0	145,3	1098,1	72,2	81,5	72,8	26,0	32,4	146,8	3779,7
A_13_P125070	LEA-Protein Klasse 3/4	42,7	40,7	42,6	24,0	26,5	67,2	468,4	51,9	49,7	49,1	36,6	65,0	70,0	2148,7
Protease-Inhibitoren															
A_13_P137470	Bowman-Birk Trypsininhibitor	42,6	35,8	23,9	47,6	25,8	23,8	85,3	51,6	38,9	22,7	48,7	25,4	23,3	240,2
A_13_P529049	Bowman-Birk Trypsininhibitor	25,8	24,2	29,5	25,0	32,4	168,7	2432,9	25,7	25,2	42,4	24,6	33,4	364,7	4914,9

Sequenz-ID	Annotation	Maternale Fraktion WT			Filiale Fraktion WT				Maternale Fraktion 363			Filiale Fraktion 363			
		7DAF	10DAF	14DAF	7DAF	10DAF	14DAF	20DAF	7DAF	10DAF	14DAF	7DAF	10DAF	14DAF	20DAF
A_13_P389702	Subtilisin-Chymotrypsin-Inhibitor	21,7	32,1	465,8	21,0	38,4	925,3	3025,1	24,3	30,0	260,9	22,6	96,2	664,5	2568,1
A_13_P028976	Subtilisin-Chymotrypsin-Inhibitor	57,0	563,2	35935,0	24,5	1833,4	90201,5	99929,3	67,5	165,4	16990,1	26,8	26441,6	89846,7	104705,7
A_13_P127880	Proteaseinhibitor	1115,8	2928,7	9695,4	31,3	93,8	449,3	6302,9	616,7	4518,1	10575,9	31,3	257,9	491,1	8612,2
A_13_P141890	Proteaseinhibitor	86,5	286,7	8062,7	57,9	1907,3	53553,4	102444,7	96,5	188,3	3846,2	66,3	14529,3	71100,2	98873,6
A_13_P442873	Proteaseinhibitor	41,0	44,4	82,4	91,6	635,0	2690,1	5169,6	33,1	43,1	150,8	155,0	2189,3	3536,1	7501,1
A_13_P276559	Serpin	35,0	55,2	554,1	40,8	99,9	14220,1	28041,5	38,6	52,3	242,8	34,4	1004,3	17924,5	26063,5
A_13_P366922	Serpin	23,9	38,7	2561,8	30,2	172,7	47615,1	70821,2	29,3	41,3	821,1	31,3	3922,1	62142,9	71733,2
A_13_P469953	Serpin	26,1	74,4	6355,0	23,1	276,6	79520,9	101907,2	35,6	57,3	2000,7	23,9	7452,0	74143,5	91912,5
A_13_P075631	Serpin	27,1	88,4	9709,8	24,4	430,5	112210,5	133369,0	40,5	66,8	2877,0	25,1	11496,4	92359,4	118557,7
A_13_P442479	Serpin	153,7	425,8	13081,6	136,7	24635,2	175673,1	154894,7	139,7	245,7	5823,8	152,6	69188,1	162853,8	142105,2
A_13_P211784	Serpin	184,8	1219,0	46016,4	148,4	39046,8	183905,1	246014,7	176,4	661,4	25002,0	266,1	136011,6	227411,1	196547,0
A_13_P116195	α-Amylase/Trypsin-Inhibitor CMa	24,9	25,4	25,0	28,4	42,5	52,5	28,6	25,3	24,5	25,7	27,5	88,0	55,1	42,9
A_13_P342312	α-Amylase/Trypsin-Inhibitor CMd	28,3	33,5	48,4	37,3	274,8	483,6	154,6	26,8	30,6	47,3	42,3	918,3	364,7	455,5
A_13_P275169	α-Amylase/Trypsin-Inhibitor CMd	23,2	23,9	34,9	29,2	129,8	166,3	74,9	23,7	23,8	35,1	29,7	212,3	127,8	163,1
A_13_P281144	α-Amylase/Trypsin-Inhibitor CMd	19,8	21,5	23,0	31,9	41,4	60,7	27,8	21,2	21,5	22,7	26,1	99,8	56,9	44,3
Proteinabbau															
A_13_P339037	Proteasom α-Untereinheit	23,4	34,5	80,8	23,9	217,8	1084,1	823,7	24,7	29,6	70,9	25,3	1670,0	830,3	3371,2
A_13_P398461	E3-Ubiquitinligase	781,7	987,4	985,3	451,3	583,0	2030,2	2281,9	1093,7	861,5	755,6	439,3	1535,5	3496,7	2566,2
A_13_P299302	Ubiquitin-ähnliches Protein	33,1	32,2	32,0	36,6	50,2	43,3	39,8	33,5	36,4	35,3	42,6	101,1	51,2	45,9
A_13_P192514	F-Box-Interaktionsdomäne enthaltendes Protein	39,6	48,6	33,8	33,7	36,7	30,7	34,6	38,3	43,6	37,4	35,7	87,9	35,0	34,0
A_13_P361347	S-RNase bindendes Protein	34,8	66,9	1527,8	28,5	1191,1	8990,0	15579,3	30,4	57,7	914,5	35,4	4667,7	10621,4	14670,5
A_13_P199094	Ubiquitin-ähnliches Protein	178,7	163,8	825,4	54,4	202,4	2951,5	4613,0	338,7	359,8	658,8	61,3	894,9	3990,1	3857,0
A_13_P104375	RING-H2 Finger Protein	523,9	485,6	1190,4	264,4	286,2	427,6	400,2	515,2	430,4	904,7	243,8	285,6	869,5	284,9
A_13_P193644	Protein mit F-Box Domäne	50,0	61,9	187,5	35,6	38,2	54,5	65,3	59,9	79,6	141,8	41,3	36,4	114,1	72,5
A_13_P119325	E2 Ubiquitin-konjugierendes Enzym	212,3	147,6	142,2	148,2	120,4	103,1	90,0	460,8	213,4	178,1	151,4	90,8	112,0	85,4
A_13_P118410	Ubiquitin-ligierendes Protein	1657,0	1836,5	2109,7	476,0	268,0	272,4	459,1	4395,7	3095,6	2727,3	724,0	291,8	363,8	350,2
A_13_P162980	Arm-repeat enthaltendes Protein	1387,5	662,8	1330,9	187,4	131,3	195,0	164,7	2547,5	1521,4	1398,4	229,6	110,3	307,0	215,0
A_13_P057831	Arm-repeat enthaltendes Protein	1130,8	437,5	972,5	413,7	246,8	333,1	490,2	3386,9	1274,7	1006,1	578,2	369,7	541,3	472,6
A_13_P041951	RING-H2-Zinkfinger-Protein ATL2L	6378,8	287,6	2979,1	1236,0	330,3	288,8	74,6	11862,7	3214,5	3207,4	1688,7	233,1	1264,4	185,0
A_13_P027136	RING-H2-Zinkfinger-Protein	5684,3	1728,6	9149,5	547,1	543,0	1036,5	780,9	4863,1	5282,5	7098,1	532,2	646,2	1285,8	867,2
A_13_P170075	F-box Proteinfamilie, AtFBX13-ähnlich	504,8	152,0	261,9	342,7	118,0	229,3	428,6	625,2	341,9	432,7	374,8	137,4	247,1	523,9
A_13_P103750	Subtilisin-ähnliche Protease	26,9	24,6	27,3	24,3	23,1	22,6	24,8	25,8	24,9	62,9	25,2	24,8	23,2	23,7
A_13_P479025	Clp-Protease Untereinheit, ATP-bindend	31007,3	55074,6	24126,3	57623,0	59153,7	38041,2	19355,8	34016,9	53048,3	49737,0	61518,8	57183,1	34727,9	36936,6
Transport															
A_13_P224114	Aminosäure-Transporter, putativ	2120,3	1643,8	1850,5	451,9	944,8	2905,5	2215,7	3345,8	2345,8	1945,0	468,0	1553,3	6088,3	2536,6
A_13_P224099	Aminosäure-Transporter, putativ	2355,5	1655,0	1588,1	407,7	840,2	2721,9	2031,7	3081,2	2182,3	1719,9	414,0	1420,8	5715,3	2227,8

Sequenz-ID	Annotation	Maternale Fraktion WT				Filiale Fraktion WT				Maternale Fraktion 363			Filiale Fraktion 363			
		7DAF	10DAF	14DAF		7DAF	10DAF	14DAF	20DAF	7DAF	10DAF	14DAF	7DAF	10DAF	14DAF	20DAF
A_13_P072101	Aminosäure-Transporter	1794,1	1278,9	1337,0		348,7	650,2	2138,6	1337,5	2531,1	1713,2	1468,6	364,7	975,3	4375,8	1656,6
pH-Homöostase																
A_13_P085246	vacuoläre H ⁺ -Pyrophosphatase	33,7	51,3	40,9		40,8	51,3	43,7	38,3	35,3	44,8	43,4	39,7	110,5	53,3	43,9
A_13_P345727	vacuoläre H ⁺ -ATPase	107,1	114,7	109,1		75,9	99,9	103,1	70,8	101,7	101,5	110,7	79,4	230,8	109,3	100,3
A_13_P165340	Plasmamembran H ⁺ -ATPase	2494,7	2648,4	1098,7		116,5	83,8	27,5	32,9	2395,3	3363,4	2243,2	86,8	52,4	25,3	32,2
Stress - allgemein																
A_13_P557344	Transposon-Protein	50,8	47,4	71,7		88,2	170,1	83,4	67,0	54,4	52,6	77,9	95,8	245,8	77,1	137,1
A_13_P486720	OsTNP2-ähnliches transposables Element	23,2	26,3	22,9		22,0	28,8	45,5	47,7	22,7	24,6	23,9	23,5	85,7	73,3	75,4
A_13_P532424	Retrotransposonprotein, Unterklasse Ty1-Copia	27,3	23,2	46,9		54,7	94,8	253,1	61,9	24,4	23,7	35,4	61,3	61,5	576,8	124,2
A_13_P412450	Germin-ähnliches Protein	2313,8	4914,7	21784,3		53,5	185,7	1845,7	5075,3	1478,4	6644,6	22001,4	49,9	780,8	1742,8	7233,4
A_13_P170420	Anthocyan-5-Acyltransferase	89,2	170,2	1649,6		76,7	1764,4	11504,8	11127,8	49,1	131,5	1473,2	126,1	4933,4	14051,9	13906,5
A_13_P134400	S-RNase-ähnlich	325,8	169,9	319,2		149,8	361,6	290,6	260,9	330,4	154,4	588,9	750,7	410,3	343,6	423,4
A_13_P010366	S-RNase-ähnlich	5298,0	2808,8	6708,2		1827,4	5401,8	4332,8	4541,0	5901,7	2489,7	13161,1	12168,0	6094,8	5551,6	7649,0
A_13_P347992	Universelles Stressprotein	45,2	65,7	53,6		58,4	73,8	62,7	59,2	56,7	68,3	59,2	60,9	241,8	80,4	92,3
Stress biotisch																
A_13_P468433	Thaumatococcus-ähnliches Protein HvTLP4	36,3	37,9	39,1		33,9	30,6	33,2	42,9	36,5	38,8	40,5	36,2	62,6	39,3	43,9
A_13_P113435	Thaumatococcus-ähnliches Protein HvTLP5	853,4	1400,2	15650,1		93,2	594,5	4928,9	15346,5	1890,3	3160,6	7103,2	84,1	1510,4	2911,7	20049,6
A_13_P113820	Thaumatococcus-ähnliches Protein HvTLP5	159,0	407,6	3946,5		40,0	136,6	926,2	4804,8	384,1	783,1	2126,7	37,9	300,5	518,8	5857,9
A_13_P262527	Thaumatococcus-ähnliches Protein	199,2	646,5	245,3		209,2	270,1	334,0	484,7	276,8	388,0	354,1	232,2	750,1	386,9	655,0
A_13_P171025	Thaumatococcus-ähnliches Protein	3393,7	2337,2	2208,0		2476,9	2090,9	2344,7	2516,1	3939,7	2701,4	3496,4	2561,8	1783,7	3188,8	5376,3
A_13_P345907	Chitinase	31,8	35,0	49,7		28,1	95,4	367,4	247,1	30,8	34,4	45,2	28,3	226,6	224,9	542,9
A_13_P300637	Chitinase	2365,5	6035,2	4679,1		135,3	120,2	116,8	144,7	2795,4	4744,5	5119,1	165,0	330,0	133,7	214,2
A_13_P311332	Chitinase	22,8	24,6	25,9		23,2	50,4	81,1	43,8	23,2	23,6	26,6	26,1	123,1	95,6	72,7
A_13_P087806	Nematoden-Resistenzprotein	7782,4	1108,6	10123,3		614,6	619,9	4055,2	3252,6	9194,7	4348,8	7113,0	823,5	1255,8	7870,1	2141,7
A_13_P460328	Nematoden-Resistenzprotein	4214,1	825,2	7404,7		509,6	368,1	2792,9	1958,2	5365,8	2857,4	5585,1	535,2	748,2	4192,0	1490,7
A_13_P022546	Frühes Pilzelicitor-Protein	5665,0	354,3	5355,4		567,8	111,6	175,8	108,5	10199,2	3094,1	4563,6	875,9	60,7	678,7	101,0
A_13_P042686	Schwarzrost-Resistenzprotein HvRpg1	49,3	53,4	49,0		48,6	59,3	84,0	92,5	51,2	59,3	55,0	50,5	186,1	95,0	160,8
A_13_P112905	γ-Hordothionin	56,6	94,2	58,3		67,8	68,6	74,8	467,9	67,7	90,3	67,8	68,5	200,2	89,4	728,7
A_13_P029366	NBS-LRR-Typ Resistenzprotein	25,4	41,3	49,7		25,4	101,6	374,9	365,3	25,6	33,4	49,6	26,8	244,5	354,0	475,5
A_13_P157665	NBS-LRR-Typ Resistenzprotein	31,1	64,6	30,9		31,5	49,7	47,8	54,6	32,8	42,9	32,6	29,0	135,5	63,3	45,0
A_13_P180949	Linalool-Synthase	781,4	1771,5	33336,3		538,1	1799,3	14409,3	20886,8	638,3	1861,2	22572,6	532,8	6229,0	18645,0	23907,0
A_13_P193504	Xylanase-Inhibitor	26,6	24,3	38,3		36,9	80,7	708,6	905,1	26,2	24,0	39,0	59,9	198,3	820,7	1225,5
A_13_P099855	NADPH HC-Toxin Reduktase, putativ	21,7	25,7	70,2		21,5	42,3	271,4	95,4	22,2	25,6	75,2	21,5	100,8	241,2	100,5
A_13_P578224	Homolog zu ZmEBE-1, antimikrobiell	36,2	115,1	46,6		39,6	37,5	31,9	1565,2	66,1	92,2	71,1	40,1	42,9	37,8	3302,7
A_13_P420010	Homolog zu ZmEBE-1, antimikrobiell	35,8	116,9	43,0		42,0	38,2	33,6	1230,6	60,2	85,7	62,4	40,9	41,5	38,4	3206,4
A_13_P524969	Homolog zu ZmEBE-1, antimikrobiell	30,6	77,7	36,6		34,9	30,2	28,1	947,9	50,9	70,4	50,2	34,9	32,3	31,8	2171,2

Sequenz-ID	Annotation	Maternale Fraktion WT				Filiale Fraktion WT				Maternale Fraktion 363			Filiale Fraktion 363			
		7DAF	10DAF	14DAF		7DAF	10DAF	14DAF	20DAF	7DAF	10DAF	14DAF	7DAF	10DAF	14DAF	20DAF
A_13_P552694	Krankheitsassoziiertes Protein	31,5	31,7	28,5		29,2	39,5	28,8	23,6	30,1	29,2	29,5	28,9	34,2	28,6	47,9
A_13_P471778	HR-läsionsinduzierendes Protein	1413,3	1770,1	275,6		121,8	163,1	132,8	69,1	1408,7	1558,9	999,7	106,5	151,7	117,0	76,7
A_13_P080216	HvSNAP-34	3381,83	1539,11	3047,19		1410,48	1006,20	1141,47	1538,47	4561,80	3134,25	3080,39	1833,63	1112,10	1677,02	1329,21
A_13_P545182	HvSNAP-34	2993,78	1492,94	2925,43		1353,00	910,00	970,05	1584,72	4768,26	3525,31	3281,86	2004,96	1077,53	1561,49	1343,85
A_13_P029016	Harpininduziertes Gen	9112,4	6651,9	13269,9		2844,2	2804,5	3525,2	5871,2	13996,4	13645,8	11561,1	4142,8	3663,0	5829,8	4205,3
A_13_P013531	Agmatin-Cumaroyltransferase	193,1	72,3	121,7		26,2	24,2	75,0	575,4	373,9	179,3	301,6	27,1	23,5	90,4	901,2
Stress, abiotisch																
A_13_P576869	Austrocknungsresponsives Protein	476,6	86,9	200,9		221,0	306,2	496,4	660,6	835,7	231,1	202,5	211,1	440,4	720,9	811,7
A_13_P126945	Galactinolsynthase	30,0	39,9	195,1		21,8	25,2	73,0	96,7	33,3	35,4	120,0	21,9	25,1	260,1	107,3
A_13_P499179	Galactinolsynthase	27,4	37,2	153,8		21,5	23,8	58,4	67,4	28,8	31,8	97,4	22,5	24,6	199,1	69,9
A_13_P126930	Galactinolsynthase	31,8	31,1	156,8		30,1	25,1	58,3	79,8	33,8	32,0	110,2	27,3	25,3	192,4	98,8
A_13_P545769	Galactinolsynthase	100,6	86,8	666,7		41,5	40,9	99,9	220,5	112,3	79,5	1022,7	40,8	34,5	341,6	165,3
A_13_P118595	Methioninsulfoxid-Reduktase	35,5	37,9	34,0		35,0	39,6	30,2	31,0	37,6	39,6	35,6	34,6	44,0	33,6	76,7
A_13_P183409	2-Alkenalreduktase	240,5	353,8	497,8		241,3	216,8	246,9	276,9	318,6	388,5	563,0	373,8	195,5	651,7	418,0
A_13_P221299	Hypoxie-induziertes Protein	201,1	33,8	66,2		203,6	178,4	236,4	134,7	300,8	79,9	62,3	272,5	220,5	248,5	119,8
A_13_P347892	Salztoleranz-Protein	51,1	51,7	48,5		41,0	75,2	123,7	67,7	41,6	45,7	47,9	42,0	172,5	116,0	128,4
A_13_P183214	Violaxanthin-Deepoxidase	52,9	70,6	64,6		47,2	54,5	62,3	60,6	57,6	65,4	76,3	52,0	120,5	67,9	85,3
A_13_P166100	SPX-Domäne enthaltendes Protein	272,6	59,3	250,1		315,6	273,1	289,8	322,7	346,3	138,9	242,7	404,4	220,8	412,6	258,1
A_13_P113260	Faserprotein	2428,8	1062,4	2390,1		998,5	761,1	1015,9	1519,8	3719,6	2251,5	1958,3	1353,6	895,1	1894,5	1465,0
A_13_P096910	Faserprotein	2177,5	1002,7	2227,5		926,3	648,6	1004,2	1519,8	4491,6	2343,2	2118,6	1321,6	895,0	1784,8	1499,3
A_13_P004571	Gigantea-ähnliches Protein	1274,6	372,6	1618,9		307,0	647,7	896,7	1088,4	1332,9	949,3	2124,2	539,3	640,4	1091,8	1413,3
A_13_P518524	Kälteinduzierbares Protein, AtLTI6B-Homolog	5715,0	2802,3	7007,4		3199,1	5136,1	5695,1	9154,8	8526,4	6733,4	8498,0	4294,2	5558,5	6333,6	7697,6
A_13_P572584	Kälteschock-Protein	1146,7	371,8	908,7		402,7	432,4	310,7	236,1	1202,7	896,7	985,1	411,6	322,4	451,1	296,6
A_13_P116970	Kälte- und salzresponsives Protein	218,2	111,4	97,6		146,7	115,7	87,5	68,1	486,2	167,5	136,2	172,1	82,3	91,6	72,1
A_13_P312022	Kältereguliertes Protein	39,0	48,4	32,6		49,6	48,9	43,3	30,2	41,3	45,4	35,2	47,3	127,6	52,0	43,3
A_13_P129805	Kältereguliertes Protein	3175,7	1788,4	2290,5		6912,1	4266,9	1483,6	583,2	1804,6	1688,6	2458,5	5195,4	2588,6	793,4	1756,8
A_13_P031231	Kältereguliertes Protein	3665,6	2046,5	2590,3		7739,5	4728,0	1648,6	649,5	2055,4	1892,7	2948,7	5757,5	2947,7	889,3	2073,7
A_13_P418315	Kälte- und salzresponsives Protein	108,8	123,2	87,8		83,5	116,1	265,5	184,7	75,7	87,5	78,4	81,3	213,7	160,7	387,7
A_13_P113775	Hv Ferritin1	2660,4	996,3	1745,2		885,6	370,7	360,5	197,6	4794,0	2483,0	2298,9	1114,0	264,5	420,5	187,7
A_13_P102415	Spl7-Protein, Regulator der Kupfer-Homöostase	45,0	33,5	77,1		49,9	47,2	68,8	149,1	41,9	35,9	61,1	47,7	48,2	80,4	398,3
A_13_P077351	Farnesyliertes Protein 1 - <i>H. vulgare</i>	157,1	329,9	3288,9		372,1	279,6	391,4	299,7	208,6	303,8	2163,2	325,7	251,3	800,5	283,1
A_13_P095475	Kupferchaperon-ähnliches Protein	130,3	310,5	543,9		80,9	113,8	249,8	471,9	147,3	284,0	482,3	94,7	268,9	177,6	644,8
A_13_P234854	Eisendefizienz-Protein	3803,8	3651,1	21179,9		57,9	149,8	1019,3	4919,1	3678,6	4583,1	15590,3	45,9	358,7	1076,4	7147,1
A_13_P124540	Metallothionein-ähnliches Protein	31,1	38,1	41,5		48,7	133,2	235,2	337,0	32,8	38,4	43,5	39,0	88,7	200,5	987,5
A_13_P122520	Metallothionein-ähnliches Protein	4959,8	9330,8	23063,0		4133,1	8174,1	13773,3	19325,1	4272,5	10239,8	37168,8	6265,1	17099,6	10114,6	29080,0
A_13_P136245	HSP101	558,6	748,6	745,9		152,9	332,1	1306,7	687,3	1613,3	1641,6	904,5	154,8	566,6	1070,4	688,6

Sequenz-ID	Annotation	Maternale Fraktion WT				Filiale Fraktion WT				Maternale Fraktion 363				Filiale Fraktion 363			
		7DAF	10DAF	14DAF		7DAF	10DAF	14DAF	20DAF	7DAF	10DAF	14DAF		7DAF	10DAF	14DAF	20DAF
A_13_P143705	HSP101	56316,3	54058,4	24683,6	23323,0	24851,2	43643,5	64146,1	95886,7	116896,7	44225,0	23840,1	39149,1	61060,3	48614,9		
A_13_P117795	HSP70	9025,0	7915,0	4010,6	7676,2	6042,5	3023,5	4817,8	17982,1	17102,0	9354,5	10494,9	6074,2	3705,5	3971,0		
A_13_P212059	HSP70	26062,5	8190,9	3605,0	11724,4	16396,6	13900,0	20085,4	56848,4	94362,4	13535,8	21346,3	19023,2	5760,1	7969,9		
A_13_P083366	HSP70	19956,9	5377,5	2406,3	9523,3	13754,7	11146,2	15187,6	45670,7	64825,9	8669,8	17352,1	14141,2	4313,1	6438,2		
A_13_P198754	HSP70	1974,8	4971,9	2780,7	1767,5	1677,4	1463,1	2882,1	6390,9	13116,3	3644,8	2627,6	3331,8	1991,4	1730,9		
A_13_P243452	HSP70	4075,1	2744,7	2014,3	2873,2	3052,3	2527,5	4887,3	5232,5	6410,9	2861,1	4071,2	3974,2	4027,9	2567,7		
A_13_P019036	HSP70	754,7	616,1	674,0	1036,0	1276,6	1294,9	1705,3	1140,7	1842,2	761,2	1552,9	1607,2	2017,5	1226,2		
A_13_P133625	HSP70	15284,8	11980,8	14255,4	17023,1	14837,4	14065,6	18255,6	18116,1	32055,9	16122,7	21611,1	16370,6	20971,8	15307,5		
A_13_P179129	HSP70	168,4	52,2	56,2	96,7	77,2	276,3	453,2	322,1	186,4	49,0	124,6	99,2	267,2	330,1		
A_13_P069931	HSP70	508,8	162,0	186,3	276,5	192,3	942,6	1907,7	1130,3	1053,5	204,6	411,0	313,3	707,4	1413,1		
A_13_P141825	HSP70	31,7	28,9	34,9	55,3	36,1	39,1	67,6	100,7	47,8	33,7	65,7	39,8	48,0	64,2		
A_13_P426561	HSP70	16193,0	31765,0	6935,8	19307,3	17122,2	12030,2	19585,9	29520,0	68323,0	12798,6	17222,7	15856,8	14672,1	14581,3		
A_13_P116635	HSP70	21410,9	31061,6	9140,8	23348,5	24041,5	14573,3	23390,0	44868,1	82824,9	15460,7	21390,3	19033,6	18103,1	17716,1		
A_13_P171580	HSP70	1300,6	224,3	363,6	389,7	309,9	1942,3	4043,8	2166,8	1777,5	415,9	725,9	624,4	1639,5	3222,3		
A_13_P147720	HSP70	502,4	180,5	744,3	229,9	176,6	273,5	171,3	407,7	463,6	720,6	253,3	137,1	1201,1	188,6		
A_13_P548249	HSP70	1572,8	1088,9	955,6	2127,5	2556,1	2647,2	3006,9	1740,9	2207,1	1060,5	2404,9	2589,5	4277,6	2501,4		
A_13_P357492	HSP70	990,0	451,3	1552,7	618,7	407,2	927,8	550,8	678,1	781,2	1286,2	626,0	407,9	2742,7	627,3		
A_13_P113055	HSP40	14596,6	42840,5	21296,6	19885,2	11584,0	12133,6	23151,0	39963,6	92446,1	36113,1	20721,3	16475,2	14969,1	12697,8		
A_13_P089756	HSP40	8777,0	7351,6	5368,2	7028,8	6234,0	5522,3	10414,7	13533,0	16539,7	8597,8	9588,2	7670,8	8574,4	6153,9		
A_13_P070001	HSP40	1664,7	681,8	3466,4	622,9	1420,7	3205,9	2678,6	2384,4	1894,5	3650,2	816,6	2145,1	4210,0	3090,9		
A_13_P124785	sHSP	10845,2	12539,1	3236,4	4151,3	3008,2	3521,3	9430,1	32425,2	51476,7	6764,0	7251,2	5569,6	5086,0	6507,3		
A_13_P133660	sHSP	6571,8	6128,7	3490,0	10815,4	15980,3	6690,7	7605,6	8150,7	13883,0	4857,2	13061,8	14517,9	7760,2	5260,3		
A_13_P459783	sHSP	3103,9	7024,5	1937,4	8338,7	5957,0	3773,4	10109,7	12979,9	23666,0	5928,4	11790,6	9681,2	8682,0	5535,1		
A_13_P415165	sHSP	6380,3	40250,8	6262,1	17481,4	8200,5	7602,1	17807,5	42255,9	117962,5	17846,1	15724,2	16174,3	11525,6	8916,0		
A_13_P234144	sHSP	15247,6	36539,4	20852,8	11355,5	4409,8	6181,7	11285,2	78528,2	128935,3	46560,1	18072,4	7753,1	10145,7	5753,0		
A_13_P124770	sHSP	4254,5	22252,8	3713,8	11074,7	5826,0	5418,5	11443,6	32114,1	83473,7	11543,0	11042,2	11009,4	7825,8	6384,7		
A_13_P097810	sHSP	6432,5	919,1	302,8	1232,9	163,9	362,6	1413,6	7013,0	9672,5	804,6	1852,0	592,2	333,8	934,5		
A_13_P057471	sHSP	1532,3	112,3	82,5	477,3	86,4	185,4	706,2	2341,3	3592,8	139,0	754,5	173,5	85,1	473,4		
A_13_P573399	sHSP	640,1	510,6	163,1	1426,1	1238,7	297,5	380,4	2274,5	1615,2	330,7	2352,1	933,8	296,2	259,2		
A_13_P171850	sHSP	5979,2	319,0	206,2	1565,7	259,6	605,6	2102,5	8063,9	14038,1	420,1	2434,9	639,7	212,1	1467,2		
A_13_P010721	sHSP	137120,5	99365,8	28359,0	37219,2	24384,2	21683,3	53331,1	187373,1	153557,2	83015,6	53613,0	30928,0	30698,9	48803,6		
A_13_P116480	sHSP	5326,9	3436,4	945,4	8715,8	7325,2	2620,0	2439,7	10783,6	9908,2	1913,4	9402,4	5729,1	2082,0	1748,5		
A_13_P127405	sHSP	50620,3	41488,4	5237,0	13123,4	4731,7	3273,3	12803,4	74270,6	106399,9	19892,0	14848,9	6208,7	4211,1	9221,3		
A_13_P082076	sHSP	1552,5	1239,4	491,5	3634,1	3141,5	999,0	1391,1	5287,3	3671,9	985,6	4984,1	2911,8	1062,2	1005,3		
A_13_P116310	sHSP	2101,3	1667,0	563,4	4819,2	4442,5	1486,9	1439,4	5586,3	4018,7	1091,9	5733,7	3206,1	1093,9	1074,8		
A_13_P402415	sHSP	10564,9	2552,0	960,1	8503,0	53117,4	17159,6	58294,7	16223,4	12046,3	4056,5	22246,0	61302,3	22748,2	44010,5		

Sequenz-ID	Annotation	Maternale Fraktion WT			Filiale Fraktion WT				Maternale Fraktion 363			Filiale Fraktion 363			
		7DAF	10DAF	14DAF	7DAF	10DAF	14DAF	20DAF	7DAF	10DAF	14DAF	7DAF	10DAF	14DAF	20DAF
A_13_P127415	sHSP	38953,2	12780,6	1232,0	8163,0	2275,6	568,1	4724,3	74399,8	105266,0	11074,7	12227,5	3341,2	762,2	3625,6
A_13_P477935	sHSP	1715,1	1313,8	347,6	2911,3	2166,4	596,1	794,7	6120,2	3673,0	703,1	4102,0	1857,4	614,9	625,3
A_13_P077871	sHSP	1458,3	228,2	128,0	1172,8	3546,3	1999,6	10854,9	2600,1	1377,3	423,5	2682,4	5900,5	2867,0	8671,2
A_13_P126775	sHSP	1160,4	220,2	120,9	1037,7	2977,7	1549,2	9362,5	2163,5	1177,4	378,1	2245,6	4757,8	2197,6	7481,0
A_13_P244385	sHSP	7398,6	1498,7	2838,1	3296,3	14905,0	44698,7	100959,9	7605,1	7597,0	6319,1	7527,7	52324,0	46496,7	81570,7
A_13_P116485	sHSP	3550,9	2507,3	816,1	8234,6	7417,6	2178,8	2305,8	8300,9	7062,0	1865,9	9102,9	5047,2	2113,9	1901,7
A_13_P127420	sHSP	63841,9	41838,4	5375,7	11959,2	4914,5	2361,7	13807,8	95232,7	118077,6	31290,8	18502,6	6190,6	3718,0	12119,7
A_13_P097785	sHSP	2290,2	1527,2	591,5	6049,4	5385,7	1632,0	1513,2	4852,2	3952,5	1202,9	6724,4	3645,9	1578,0	1332,2
A_13_P126760	sHSP	1030,2	250,4	464,9	518,9	2948,7	9645,5	21362,4	919,9	1034,7	843,3	1027,8	9585,4	7719,0	19020,2
A_13_P147490	sHSP	53,8	79,5	45,4	110,7	52,6	40,6	42,6	420,4	186,2	61,2	157,1	49,3	39,5	39,1
A_13_P127410	sHSP	147,7	88,3	134,3	161,8	34,8	43,5	35,2	1351,7	194,0	148,0	244,9	32,2	44,5	33,0
A_13_P441141	sHSP	60218,6	21900,2	1951,6	11530,0	4462,1	2582,4	16521,8	112776,8	149653,6	13806,9	19669,6	6922,3	4210,8	16347,8
A_13_P250460	sHSP	91940,2	63456,5	17059,7	24441,5	14822,7	13214,4	36655,0	106644,0	114091,3	49640,7	31509,2	19588,4	19068,1	33283,9
A_13_P056056	HSF	889,3	1465,2	1218,2	1090,3	1062,4	2280,3	1350,3	4209,9	5138,2	1533,0	1570,9	1253,6	1613,7	1418,2
A_13_P546594	Peptidylprolyl-Isomerase	55163,8	31822,8	11537,6	15928,6	7131,3	6185,1	24307,5	79021,4	122927,2	27315,4	17524,2	11316,4	8844,1	15488,1
A_13_P424081	Peptidylprolyl-Isomerase	763,4	841,4	569,2	302,1	397,3	279,6	393,0	1237,3	2056,0	826,1	431,5	501,1	338,8	258,5
A_13_P089741	Peptidylprolyl-Isomerase	7939,8	7762,2	5405,2	3066,8	3552,0	2403,0	3334,6	9825,2	15711,8	8343,9	4357,9	3830,0	2802,1	2396,2
A_13_P208939	Peptidylprolyl-Isomerase	139,1	159,8	93,7	107,8	169,3	149,5	274,0	248,9	326,1	108,3	136,9	180,0	224,9	144,9
Peroxidasen															
A_13_P001276	Peroxidase HvBP1	245,2	2561,1	74632,9	36,6	14995,7	108319,1	192756,8	144,9	1277,4	42931,6	45,9	68554,8	146346,2	152471,4
A_13_P235804	Peroxidase HvBP1	230,9	2290,7	66337,0	33,7	15628,3	105191,3	169852,8	132,6	963,1	37583,3	41,6	55262,9	119509,4	144660,5
A_13_P091620	Peroxidase, Klasse III	110,2	296,2	2363,7	80,8	1288,3	16343,6	14382,9	100,4	166,4	1581,6	79,8	3255,9	10948,0	19232,1
A_13_P460553	Peroxidase, Klasse III	126,8	109,4	174,6	172,0	376,2	1599,7	2799,7	130,1	103,6	208,9	139,5	1221,7	1821,0	1659,7
A_13_P526669	Peroxidase, Klasse III	1142,8	238,6	1560,9	296,8	112,6	1161,3	4694,4	2003,6	1053,7	1339,3	354,6	312,9	1610,6	3087,2
A_13_P416320	Putative Peroxidase	28756,4	35982,8	37746,5	259,9	442,1	2675,2	1559,6	24190,2	41599,5	34007,1	248,7	976,2	1790,8	1661,3
A_13_P180079	bifunktionelle Katalase-Peroxidase	35,9	33,2	29,7	41,5	39,0	68,5	78,8	37,6	35,4	29,8	41,8	87,5	81,1	127,0
A_13_P146820	Putative Peroxidase	1249,2	1158,0	556,6	3525,8	1891,5	782,0	2174,0	1877,9	1223,6	509,7	3101,1	1364,1	2156,4	2775,9
A_13_P478145	Peroxidase	113,8	116,9	78,5	587,6	648,6	3552,8	3587,5	91,2	67,1	344,7	531,6	1052,1	3428,4	4648,9
A_13_P224489	Peroxidase	483,6	721,5	241,4	4989,5	1714,3	534,3	338,3	649,5	831,2	567,4	4678,3	1247,4	350,7	491,1
A_13_P482900	Ascorbatperoxidase	321,1	349,5	230,3	271,8	75,9	124,2	489,6	792,5	697,1	268,6	454,5	132,0	158,3	291,8
A_13_P459303	Peroxidase, Klasse III	85,1	31,0	22,6	135,4	55,2	28,1	29,5	187,3	43,0	23,9	145,3	38,4	26,5	28,3
Glutathion-System															
A_13_P276484	Glutathion-S-transferase	37,6	34,9	33,7	35,6	49,8	62,2	40,1	33,2	35,2	33,6	36,9	116,7	60,1	45,8
A_13_P373842	Glutathion-S-transferase	81,4	95,9	109,7	82,9	91,0	75,7	97,3	102,9	109,7	112,2	102,1	194,9	102,5	122,4
A_13_P133910	Glutathion-S-transferase	919,2	2478,9	3541,4	793,3	3594,7	6402,9	3479,6	663,2	2161,3	3450,4	868,3	4560,9	4475,5	7240,2
A_13_P086866	Glutathion-S-transferase	1041,2	2857,8	4954,6	995,4	4175,8	6591,0	4641,0	1018,2	3118,6	5164,2	1355,8	6151,6	6915,8	9955,1

Sequenz-ID	Annotation	Maternale Fraktion WT				Filiale Fraktion WT				Maternale Fraktion 363			Filiale Fraktion 363			
		7DAF	10DAF	14DAF		7DAF	10DAF	14DAF	20DAF	7DAF	10DAF	14DAF	7DAF	10DAF	14DAF	20DAF
A_13_P011476	Glutathion-S-transferase	26,0	24,1	34,7	40,2	36,4	25,3	21,9	55,4	84,0	128,5	68,6	39,5	27,6	21,9	
A_13_P137505	Glutathion-S-transferase	34,1	31,2	64,8	81,7	69,9	47,1	24,3	145,7	221,7	409,7	166,5	103,8	51,4	26,4	
A_13_P137500	Glutathion-S-transferase	31,6	31,6	43,8	59,7	59,5	33,1	23,2	85,6	130,3	217,3	97,4	62,2	35,7	24,2	
A_13_P000471	Glutathion-S-transferase	20195,0	6717,6	671,4	1712,6	1112,4	1631,9	2348,3	25504,8	10749,7	1391,6	1643,6	1079,6	1651,9	3247,3	
A_13_P117670	Glutathion-S-transferase	102304,3	38382,5	2988,2	7064,7	4475,5	5879,3	9794,8	102432,5	54010,7	6925,0	6619,9	3617,4	5947,8	13732,5	
A_13_P410287	Glutathion-S-transferase	30160,0	12814,9	1027,0	2677,2	1693,3	2447,9	3983,0	49027,3	20262,7	2447,9	2813,6	1540,6	2562,2	5473,8	
Sekundärmetabolismus																
A_13_P075091	Chalconsynthase	5887,8	3995,1	3811,9	22329,6	13399,9	8875,4	8446,1	4623,0	6074,0	8910,3	26963,7	13384,8	6942,7	7486,7	
A_13_P395895	Isoflavonreductase	2489,4	1997,4	560,1	50,0	29,6	32,1	115,9	3902,4	1355,0	1370,8	44,4	29,3	28,5	93,6	
A_13_P025856	Isoflavonreductase	4191,8	3567,4	935,7	65,5	31,4	40,7	180,6	6669,6	2254,7	2441,3	56,9	33,2	32,1	129,0	
A_13_P563194	Flavonolsynthase	910,8	1026,8	1421,4	2231,6	8994,7	11193,4	8395,4	1575,1	3902,9	6060,1	2566,9	8815,1	8496,8	13038,6	
A_13_P246932	Ferulat-5-Hydroxylase	1268,4	901,6	165,4	486,8	409,3	171,8	61,4	2894,5	2243,6	289,9	540,7	282,1	161,8	57,5	
A_13_P230504	4-Cumarat-CoA-Ligase	1135,3	343,2	412,3	1047,0	2438,9	2455,1	1783,0	1343,0	704,3	628,8	1528,4	2566,8	2478,0	1970,9	
A_13_P079916	Phenylalanin-Ammonium-Lyase	1552,7	797,0	2551,7	555,1	470,6	327,9	430,0	1339,3	1802,5	2316,1	761,5	492,4	506,4	352,7	
A_13_P092220	Cinnamoyl-CoA Reduktase	71,8	145,4	266,2	167,8	222,4	236,2	508,4	77,5	208,9	489,6	196,8	367,2	209,3	1127,9	
Mitose																
A_13_P014441	Cyclin A1	1975,8	2059,6	509,2	11534,5	11145,0	4735,7	2016,7	1142,9	1402,2	1832,9	11739,6	9874,1	3851,2	2384,0	
A_13_P575509	Cyclin A1	1136,7	1239,3	278,6	7658,0	6206,1	2783,4	889,1	569,8	788,2	871,3	5670,2	5294,7	1795,0	1171,5	
A_13_P158220	Cyclin A2	795,8	1062,2	258,6	4055,2	2761,2	1447,7	1204,3	1050,9	1291,5	654,4	4841,7	2647,5	1489,6	1483,9	
A_13_P190154	CyclinB (G2/Mitose-spezifisch)	641,6	441,4	176,5	1675,5	1343,0	764,8	639,5	571,8	416,9	389,4	1709,9	999,0	733,9	727,4	
A_13_P103535	CyclinB (G2/Mitose-spezifisch)	464,8	330,0	155,2	1234,6	1067,0	626,4	545,6	479,1	387,2	320,7	1588,2	1014,3	688,1	614,3	
A_13_P442798	CyclinB (G2/Mitose-spezifisch)	149,4	78,9	36,6	1693,7	978,4	428,0	233,7	78,9	78,2	96,0	1899,9	1051,9	577,2	323,9	
A_13_P179399	CyclinB (G2/Mitose-spezifisch)	155,2	110,9	36,8	1223,6	669,4	224,2	117,9	78,3	93,0	78,0	1220,9	446,9	267,3	143,5	
A_13_P037721	Mitotic checkpoint-Protein	1524,0	1717,6	929,5	5411,5	11236,4	7889,1	6741,9	1075,1	1455,7	1891,2	5509,3	12109,8	9067,8	9999,8	
A_13_P081141	AtMCM3 Homolog, DNA-Replikationsfaktor	1656,7	1813,4	575,6	7402,2	9957,1	4747,0	2158,7	983,6	1358,4	1294,8	6173,0	7933,0	3425,3	2081,4	
A_13_P233144	AtMCM3 Homolog, DNA-Replikationsfaktor	3559,8	3925,3	1246,1	14425,3	17816,6	9105,5	4441,3	2035,8	3122,7	2993,4	12196,6	14407,8	6894,5	4096,8	
A_13_P141665	AtMCM4 Homolog, DNA-Replikationsfaktor	731,2	972,8	344,2	3957,1	3944,6	1926,8	1171,9	762,6	998,3	691,8	4441,3	3733,1	1734,3	1018,7	
A_13_P097365	DNA-Topoisomerase II	2313,4	1576,7	413,3	9370,4	7544,3	3184,4	2341,5	1201,5	1325,5	1853,0	8842,5	5845,9	3607,0	2608,3	
A_13_P185289	Poly-ADP-Ribose-Polymerase, AtPARP1-Homolog	270,3	338,6	108,7	912,6	914,3	518,0	520,2	443,5	489,2	239,3	1076,4	1126,5	583,0	406,0	
A_13_P180479	Faciata-ähnliches Protein	566,3	576,7	169,5	2487,9	2416,3	1288,9	763,7	465,0	607,9	479,7	2789,0	2703,3	1303,5	704,6	
A_13_P149755	Chromatin-Assemblierungsfaktor	2151,7	2612,3	673,2	15435,6	9018,4	4903,2	2007,9	1718,6	2101,6	1734,7	14293,8	8926,4	4321,0	2968,1	
A_13_P014546	SMC2 Protein, Kondensin	447,2	423,1	148,9	2256,0	2340,5	1094,4	512,7	395,3	379,3	371,7	2398,1	1903,8	884,7	490,0	
A_13_P104890	Kondensin Untereinheit	586,2	609,5	219,2	3998,6	3822,1	1582,2	630,2	317,2	454,9	740,0	3751,0	3370,8	1661,5	747,4	
A_13_P106570	Phragmoplast-orientierendes Kinesin	92,5	73,5	44,4	479,6	396,2	197,4	185,0	57,6	79,6	115,9	555,6	443,9	278,0	150,3	
A_13_P170815	Phragmoplast-assoziiertes kinesinähnliches Protein	361,0	283,6	106,5	2909,8	1799,1	897,5	452,5	192,7	205,2	293,8	2376,2	1505,1	785,1	472,4	
A_13_P551234	Phragmoplast-assoziiertes kinesinähnliches Protein	673,7	508,7	280,0	2864,7	2739,9	1153,5	745,9	405,2	521,6	573,1	2937,1	2056,3	1271,7	796,9	

Sequenz-ID	Annotation	Maternale Fraktion WT				Filiale Fraktion WT				Maternale Fraktion 363			Filiale Fraktion 363			
		7DAF	10DAF	14DAF	7DAF	10DAF	14DAF	20DAF	7DAF	10DAF	14DAF	7DAF	10DAF	14DAF	20DAF	
A_13_P564254	Kinesin, schwere Kette	215,0	162,9	52,9	1610,4	699,1	382,5	399,0	113,2	151,7	176,9	1955,7	772,0	489,9	385,8	
A_13_P203734	Protein aus der Dynaminfamilie	116,0	87,0	51,7	894,8	619,4	290,7	290,0	78,6	82,7	127,4	1020,6	598,7	366,0	336,7	
A_13_P164410	Homolog zu AtNPK1 MAPKKK	1074,6	145,6	1203,0	240,0	77,0	324,5	123,4	1176,0	1203,0	2473,7	393,9	80,0	1035,6	292,3	
A_13_P089961	Tubulin	2979,5	2204,6	1110,8	3277,5	2375,2	1584,3	1875,5	3164,3	2430,1	2312,3	3661,7	2749,4	1717,2	2030,8	
A_13_P212609	Kernteilungsprotein	228,4	245,5	65,4	1743,5	1015,3	334,3	153,1	174,8	236,6	135,8	1616,8	611,1	309,5	200,1	
A_13_P069671	Wachstumsregulierender Faktor	4973,5	1032,1	6036,9	953,7	503,6	1352,5	1180,1	6345,7	2851,2	4901,0	1230,4	521,8	2091,5	1507,1	
A_13_P317087	LOB-Domäne enthaltendes Protein	20550,7	6709,1	17065,5	5364,9	2630,2	2425,7	1485,6	24013,4	16691,1	16865,1	6032,5	2264,7	3537,1	1975,6	
A_13_P449628	LOB-Domäne enthaltendes Protein	5231,4	2009,0	4369,4	1533,5	764,0	779,6	412,9	6637,0	4415,7	4476,6	1734,8	684,3	1001,3	543,4	
Zellstreckung																
A_13_P177944	Glucan-endo-1,3-beta-D-glucosidase	128,9	87,2	50,1	960,8	293,0	266,4	388,1	75,1	73,2	105,4	890,2	312,5	316,6	523,1	
A_13_P566324	Glucan-endo-1,3-beta-D-glucosidase	435,0	131,7	39,2	1000,6	315,1	223,8	311,2	317,6	134,7	80,5	911,9	204,6	237,5	348,9	
A_13_P396415	β -D-Xylosidase	1835,8	1013,9	312,3	13080,2	5011,0	2585,2	4601,5	2555,5	1793,5	855,8	11589,2	3414,2	2904,3	6084,0	
A_13_P009126	β -D-Xylosidase	4063,6	3448,3	728,8	34312,5	14887,5	6472,6	12943,1	5839,1	3899,3	2750,3	26731,6	6978,9	5987,1	14949,9	
A_13_P131725	Xyloglucan-Endotransglycosylase	860,4	622,6	1011,5	351,6	274,8	351,4	305,7	1018,2	1327,8	1488,3	488,0	305,7	647,3	376,6	
A_13_P141520	Xyloglucan-Endotransglycosylase	842,2	107,7	43,2	2782,1	292,8	1393,5	1383,2	313,5	88,0	144,2	2463,4	420,1	1568,4	1520,7	
A_13_P181784	Glycosylhydrolase-Familie 10 Protein	612,5	154,3	60,2	1295,7	419,4	261,6	622,0	613,3	413,3	130,7	1493,6	289,9	275,5	821,0	
A_13_P069171	Glycosylhydrolase-Familie 10 Protein	420,9	119,4	50,6	928,8	303,4	246,4	410,5	432,2	294,5	103,7	1066,9	208,6	210,4	548,0	
A_13_P565369	Polygalacturonase	7779,0	5627,7	137,9	506,3	328,0	1033,2	1042,9	9660,3	6714,3	910,5	352,8	504,9	1030,3	1625,6	
A_13_P151535	Polygalacturonase	2215,0	1764,4	59,1	164,2	132,9	363,3	355,4	3094,9	1950,4	239,2	133,9	169,2	323,2	486,0	
A_13_P483880	Purple acid-Phosphatase	448,9	348,1	231,8	2918,0	2255,8	766,3	82,5	342,4	566,7	664,1	3478,9	2404,3	387,2	81,1	
A_13_P246905	Purple acid-Phosphatase	10597,4	5523,8	2744,4	117,7	250,6	1177,8	2779,6	6005,2	7265,6	9855,0	120,4	318,5	932,8	2488,2	
A_13_P085076	Purple acid-Phosphatase	11189,2	7932,6	3344,5	80,9	108,0	126,3	338,7	7023,7	10381,6	13696,9	55,9	62,7	81,7	307,5	
A_13_P174460	β -Expansin	675,7	1683,5	91,1	74,9	97,8	43,1	106,7	525,7	1660,9	204,5	62,5	52,5	43,7	136,2	
A_13_P479245	Strukturprotein	23441,1	5662,4	103,0	54668,6	16920,3	6959,0	10094,3	26227,1	6119,5	1995,2	52673,6	9309,0	7670,2	13675,2	
A_13_P266402	Strukturprotein	2644,1	925,4	32,5	9606,5	2493,0	886,7	1400,9	2199,4	780,0	208,8	6823,1	1019,9	741,1	1978,5	
A_13_P118580	Strukturprotein	6588,0	2024,5	60,2	18141,2	5483,0	2640,1	4526,5	7763,5	2386,3	687,0	19965,0	3848,5	2792,8	5110,2	
A_13_P075876	Homolog zu ZmRth3	4948,1	864,5	2727,2	1044,3	820,9	879,7	965,9	5166,7	952,6	10107,8	1417,9	743,9	2145,4	798,7	
A_13_P125085	Kaffeesäure O-Methyltransferase	12067,1	10633,2	1585,0	92,6	73,6	66,0	39,0	20201,9	19193,0	4018,7	86,6	99,8	66,3	97,2	
A_13_P243492	Kaffeesäure O-Methyltransferase	20703,4	10957,0	1400,7	89,2	86,7	59,0	38,1	19929,7	19864,0	2872,9	76,2	89,9	70,3	85,0	
A_13_P481015	Caffeoyl-CoA O-Methyltransferase	268,6	227,7	102,1	1265,4	1400,8	1003,2	1084,6	148,1	221,5	239,3	1424,3	1274,2	1100,2	1510,4	
A_13_P483435	Plasmamembran-Aquaporin	8770,3	10063,7	979,9	979,0	499,2	524,9	242,8	8298,5	7950,1	1977,4	891,8	604,0	382,4	238,7	
Polyaminmetabolismus																
A_13_P086086	Arginindecaboxylase	575,6	1030,4	98,7	35,8	96,0	93,0	95,9	297,1	1013,6	630,2	38,5	125,7	78,6	146,2	
A_13_P135680	Arginindecaboxylase	1320,8	1889,6	167,3	33,4	201,0	54,1	61,6	893,9	2463,6	1703,5	35,8	217,6	61,9	110,8	
A_13_P000386	Polyaminoxidase HvPAO1	3929,1	2575,6	833,3	4879,6	2962,5	365,6	37,4	5448,8	1925,8	2435,6	5021,1	2478,3	305,9	61,8	

Tab. 11: Normalisierte Absolutwerte der Signalintensitäten im Microarray von jeweils einem repräsentativen Histongen jeder Klasse, die zwischen den Karyopsen der ABA-immunmodulierten Linie 363 und dem Wildtyp differentiell exprimiert ist. Die zugehörige Sequenz-ID ist unterstrichen. Das das log₂-transformierte Expressionsverhältnis zwischen Wildtyp und Linie 363 für die hier aufgeführten Gene ist in Tab. 9 angegeben. Für weitere Erklärungen siehe Überschrift der Tab. 10.

Sequenz-ID	Annotation	Maternale Fraktion WT				Filiale Fraktion WT				Maternale Fraktion 363			Filiale Fraktion 363			
		7DAF	10DAF	14DAF		7DAF	10DAF	14DAF	20DAF	7DAF	10DAF	14DAF	7DAF	10DAF	14DAF	20DAF
A_13_P113360, A_13_P117445, A_13_P117485, A_13_P117495, A_13_P117530, A_13_P117550, <u>A_13_P231654</u> , A_13_P233574, A_13_P234354, A_13_P255127, A_13_P462613, A_13_P475333, A_13_P487870	Histon H1	7870,3	8496,1	1899,6		42155,7	27272,3	16853,2	9972,2	6843,6	7509,6	6337,5	44421,2	29337,0	16882,7	10738,9
A_13_P072576, A_13_P085636, A_13_P097010, A_13_P117910, A_13_P117935, A_13_P117940, A_13_P117955, A_13_P117970, A_13_P117975, A_13_P117980, A_13_P118020, A_13_P118030, A_13_P118035, A_13_P118055, A_13_P118060, A_13_P119730, A_13_P119745, A_13_P133220, A_13_P133225, A_13_P231454, A_13_P244140, A_13_P322147, A_13_P350197, A_13_P428396, A_13_P429071, A_13_P430306, A_13_P430341, A_13_P434166, A_13_P434396, A_13_P437261, A_13_P439391, A_13_P441376, A_13_P443123, A_13_P479500, A_13_P479675, A_13_P485420, A_13_P505654, A_13_P529039, <u>A_13_P550079</u> , A_13_P563264, A_13_P582169	Histon H2A	732,4	981,6	314,2		5552,7	3676,5	2855,3	1660,6	641,8	702,8	917,1	5759,4	4533,9	2821,9	1765,1
A_13_P116245, <u>A_13_P116250</u> , A_13_P116260, A_13_P116300, A_13_P116315, A_13_P116330, A_13_P116340, A_13_P116360, A_13_P116365, A_13_P116385, A_13_P116390, A_13_P116395, A_13_P116400, A_13_P116410, A_13_P116445, A_13_P116465, A_13_P116490, A_13_P116525, A_13_P117985, A_13_P212519, A_13_P214079, A_13_P235479, A_13_P243897, A_13_P244735, A_13_P245295, A_13_P251392, A_13_P291737, A_13_P332022, A_13_P347287, A_13_P412845, A_13_P459393, A_13_P475513, A_13_P478670, A_13_P483835, A_13_P487805, A_13_P496280, A_13_P505019, A_13_P517249, A_13_P529429, A_13_P547584, A_13_P548534, A_13_P549734, A_13_P550579, A_13_P550654, A_13_P554294	Histon H2B	559,1	585,6	126,4		4025,4	1948,6	1316,5	622,0	471,0	456,4	381,2	4501,3	2190,0	1260,7	704,1
A_13_P117380, A_13_P117405, A_13_P117415, A_13_P117430, A_13_P117435, A_13_P117440, A_13_P117470, A_13_P117490, A_13_P117525, A_13_P117535, <u>A_13_P117540</u> , A_13_P117555, A_13_P117560, A_13_P117570, A_13_P117580, A_13_P117590, A_13_P233944, A_13_P258872, A_13_P269042, A_13_P276109, A_13_P335297, A_13_P350032, A_13_P428331, A_13_P434456, A_13_P475923, A_13_P484080, A_13_P485355, A_13_P550084, A_13_P551549	Histon H3	1568,0	2259,6	475,6		12608,9	10417,2	5515,4	2959,5	1079,0	1635,3	1667,8	11952,9	11343,5	4969,7	4122,0
A_13_P095035, A_13_P117450, <u>A_13_P234314</u>	Histon H4	1383,1	2474,7	566,3		9565,4	10703,7	4410,9	2203,0	986,5	1485,8	1995,1	7033,9	8420,7	3280,3	2982,9

PUBLIKATIONSLISTE

VERÖFFENTLICHUNGEN IN FACHZEITSCHRIFTEN

Götz KP, Staroske N, Radchuk R, Emery RJ, Wutzke KD, Herzog H, Weber H (2007) Uptake and allocation of carbon and nitrogen in *Vicia narbonensis* plants with increased seed sink strength achieved by seed-specific expression of an amino acid permease. *J Exp Bot.* **58(12)**: 3183-95

Sreenivasulu N, Radchuk V, Alawady A, Borisjuk L, Weier D, Staroske N, Fuchs J, Miersch O, Strickert M, Usadel B, Wobus U, Grimm B, Weber H, Weschke W (2010) Deregulation of abscisic acid contents causes abnormal endosperm development in the barley mutant seg8. *Plant J.* **64(4)**: 589-603

Eine Publikation zur ABA-Immunmodulierung transgener Gerstenkaryopsen befindet sich in Arbeit.

TAGUNGSBEITRÄGE - VORTRÄGE

Staroske N.: The role of AtMPK3 and AtMPK6 in the female gametophyte development. 3rd Plant Science Student Conference, 05. bis 08.06.2007, Halle, Deutschland.

Staroske N.: Immunomodulation of abscisic acid in barley. 5th Plant Science Student Conference, 05. bis 08.06.2009, Halle, Deutschland.

Staroske N.: Transgenic strategy for ABA immunomodulation. 3rd GABI-GRAIN Progress Meeting, 08. bis 09.07.2009, Einbeck, Deutschland

TAGUNGSBEITRÄGE – POSTER

Weichert, N., C. Seiler, P. Hein, L. Borisjuk, N. Staroske, D. Dietrich, F. Blattner, H. Zhang, U. Wobus, H. Weber & W. Weschke: The role of amino acid and peptide transporters during barley seed development. 9th International Symposium on Plant Seeds 'Seeds in the -omics Era' [The 7th Gatersleben Research Conference], 15. bis 19.05.2004, Meisdorf/Gatersleben

Lee J, G. Bethke, T. Feilner, B. Kersten, K. Naumann, S. Ranf, R. Schlichting, C. Spielau, N. Staroske, J. Uhrig, T. Unthan, I. Widjaja, D. Scheel: The complexity of MAP kinase protein complexes. 18th International Conference on Arabidopsis Research, 20-23 Juni 2007, Peking, China.

Radchuk V.V., N. Staroske, K. Merx, B. Hause, H.-P. Mock, H. Weber & W. Weschke: Disturbances of the primary metabolism, ABA biosynthesis and enzyme activities in grains of the barley AGPase mutant Riso16. 9th GABI Status Seminar, 03.-05.03.2009, Potsdam, Deutschland

Staroske N., V.V. Radchuk, G. Hensel, J. Kumlehn, W. Weschke & U. Conrad: Immunomodulation of abscisic acid in barley. 9th GABI Status Seminar, 03.-05.03.2009, Potsdam, Deutschland

Sreenivasusu, N., V.V. Radchuk, L. Borisjuk, D. Weier, N. Staroske, J. Fuchs, O. Miersch, M. Strickert, B. Usadel, U. Wobus, B. Grimm, H. Weber & W. Weschke: Deregulation of abscisic acid contents causes abnormal endosperm development in the barley mutant seg8. Institutstag IPK Gatersleben, 12.-13.10.2009, Gatersleben, Deutschland.

Staroske N., V.V. Radchuk, G. Hensel, J. Kumlehn, R. Kramell, W. Weschke & U. Conrad: Immunomodulation of Abscisic Acid in Developing Barley Grains. International Conference on Molecular Aspects of Plant Development, 23. bis 26.02.2010, Wien, Österreich

Staroske N., V.V. Radchuk, G. Hensel, J. Kumlehn, R. Kramell, W. Weschke & U. Conrad:
Immunomodulation of Abscisic Acid in Developing Barley Grains. 10th GABI status seminar, 09. bis
11.03.2010, Potsdam, Deutschland

DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die mich in den vergangenen Jahren unterstützt haben und somit zum Gelingen der Arbeit beitrugen. Da es unmöglich ist, an dieser Stelle alle Namen aufzuführen, bitte ich die nicht namentlich erwähnten Personen vielmals um Verzeihung.

Ich habe Euch nicht vergessen.

An erster Stelle möchte ich meinen Betreuern Frau Dr. Winfriede Weschke und Herrn PD Dr. Udo Conrad danken. Ihr unermüdliches Interesse an meiner Arbeit, ihre stete Diskussionsbereitschaft und die sehr gute fachliche Betreuung waren ausschlaggebend für die Entstehung dieser Dissertation.

Die vorliegende Arbeit war Bestandteil des GABI Grain Projektes. Ich möchte mich bei allen GABI Kollegen für die Anregungen und Diskussionen sowie unsere jährlichen Meetings bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Wobus, dem ehemaligen Direktor des IPK, bedanke ich mich für die Möglichkeit, die Arbeit am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben anfertigen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Klaus Humbeck vom Institut für Pflanzenphysiologie danke ich für die Betreuung der Arbeit von Seiten der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Dr. Joachim Kopka danke ich für die Möglichkeit, Metabolitgehalte in seinem Labor zu analysieren. Alexander Erban und Ines Fehrle machten mich während meines Aufenthalts am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm mit der Technik der Gaschromatographie/Massenspektrometrie vertraut. Danke dafür.

Mein Dank gilt der Arbeitsgruppe „Pflanzliche Reproduktionsbiologie“ am IPK für die Gerstentransformation und die Regeneration von DH-Pflanzen. Besonders erwähnen möchte ich Dr. Jochen Kumlehn, Dr. Conny Marthe, Dr. Götz Hensel und Ingrid Otto. Danke für euer stetes Interesse am Fortschritt meiner Arbeit und anregende Diskussionen.

Bei Herrn Dr. Twan Rutten (AG „Strukturelle Zellbiologie“) bedanke ich mich herzlich für die Unterstützung am konfokalen Laserscanning Mikroskop und die kurzweilige Zusammenarbeit.

Dr. Swetlana Friedel danke ich für die Unterstützung bei allen bioinformatischen Fragestellungen und die Hilfe bei der Normalisierung und Auswahl der Microarray-Daten

Ich bedanke mich bei den Gärtnern in den Gewächshäusern „Genetik“ und „Chemie“ sowie bei den Grafikern des IPKs.

Ich danke allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen „Samenentwicklung“ und „Phytoantikörper“, in denen ich die vorliegende Arbeit angefertigt habe, für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung in den vergangenen Jahren. Die herzliche Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein herzlicher Dank geht auch an Gabriele Einert, Elsa Fessel, Uta Siebert, Katrin Blaschek und Angela Stegmann für die Hilfe beim Ernten von Pflanzenmaterial. Angela Stegmann danke ich außerdem für die Hilfe beim Aufbereiten des Pflanzenmaterials. Bei Uta Siebert bedanke ich mich für die Anfertigung der Cryoschnitte. Für die Hilfe bei der Bestimmung von Sameninhaltsstoffen gilt mein Dank Katrin Blaschek. Bei Isolde Tillack bedanke ich mich für die Einarbeitung in die Proteinreinigung und die Western-Analysen sowie viele hilfreiche Tipps und Tricks, die das Arbeiten im Labor sehr erleichterten. Schließlich danke ich Heiko Weichert herzlich für die Unterstützung bei den Aminosäurebestimmungen.

Dr. Volodymyr Radchuk danke ich für die Unterstützung bei der Herstellung der Transformationsvektoren.

Bei Dr. Nicola Weichert möchte ich mich für die Einführung in die Realtime PCR-Technik bedanken.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder, die mich in allen Lebenslagen unterstützt und immer viel Vertrauen in mich gesetzt haben. Robert möchte ich für seine stets liebevollen Aufmunterungen und vor allem für seine grenzenlose Geduld in den letzten Jahren danken.
Danke, dass ihr immer für mich da seid!

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freunden und all denen bedanken, die mich besonders in der letzten Phase meiner Doktorarbeit durch unentwegtes Korrekturlesen, intensive Diskussionen, den ein oder anderen Tee oder einfach nur durch schöne Gespräche unterstützt haben.

- D A N K E -

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich erkläre weiterhin, dass andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht wurden.

Die Dissertation wurde ausschließlich der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt. Ich habe mich zu keinem früheren Zeitpunkt um den Doktorgrad beworben.

Halle, November 2011

Nicole S. Staroske