

Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften
Naturwissenschaftliche Fakultät III
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Differentielle Genexpression in Roggen, Weizen und Gerste während der Kälteakklimatisierung und ihr Bezug zur Frosttoleranz

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor agriculturarum (Dr. agr.)**

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Benedikt Athmer
geb. 08.09.1978 in Hannover

1. Gutacher: Prof. Dr. Andreas Graner
2. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Pillen
3. Gutachter: Dr. Patrick Schweizer

Tag der Verteidigung: 21.05.2012

Halle (Saale) 2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1. Evolution der <i>Triticeae</i>	2
1.2. Frostschäden bei Pflanzen	3
1.3. Kälteakklimatisierung	4
1.3.1. Signaltransduktion	4
1.3.2. Transkriptionelle Regulation der Genexpression während der Kälteakklimatisierung	5
1.3.3. Genetische Aspekte	7
1.3.4. Funktionelle Proteine	9
1.4. Fragestellung und experimenteller Aufbau	11
2. Material und Methoden	13
2.1. Pflanzenmaterial	13
2.2. Genotypen der verwendeten <i>E. coli</i> Bakterienstämme	13
2.3. Plasmide	14
2.4. Kulturmedien	14
2.5. Chemikalien und Lösungen	14
2.6. Oligonukleotide	14
2.7. DNA-Größenstandard	14
2.8. Quantifizierung von Nukleinsäuren	14
2.9. Analytische Agarosegelelektrophorese	15
2.10. Kultivieren von <i>Escherichia coli</i>	15
2.10.1. Dauerkulturen	15
2.10.2. Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> TOP10	15
2.10.3. Transformation und Blau-Weiß-Selektion	15
2.11. Genomische DNA Extraktion	16
2.12. Genotypisierung	16
2.13. Mikrosatelliten Analyse	16
2.14. RNA Extraktion	17
2.15. Analytische, denaturierende RNA-Gelelektrophorese	17
2.16. Herstellung von cDNA Sonden für Hybridisierungen	18
2.16.1. Äquillibrierung der Dynabeads	18
2.16.2. mRNA-Isolation	18
2.16.3. Erststrangsynthese von cDNA	18
2.16.4. Radioaktive Markierung von cDNA	18
2.16.5. cDNA Sondenpräparation	19
2.17. Makroarray Hybridisierung	19
2.17.1. cDNA-Makroarrays	19
2.17.2. Vorhybridisierung der Membran	19

2.17.3. Hybridisierung der markierten cDNA Sonden	20
2.17.4. Waschen und Exposition	20
2.17.5. Entfernen von cDNA-Sonden	20
2.17.6. Signaldetektion	21
2.18. Quantitative Real-Time PCR	21
2.18.1. DNase Verdau von RNA	21
2.18.2. Reverse-Transkription PCR	21
2.18.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	21
2.18.4. Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten	22
2.18.5. qRT-PCR	22
2.19. Kältesimulation im Phytotron	23
2.19.1. Frostsimulation für die Phänotypisierung	23
2.19.2. Kälteakklimatisierung für RNA-Gewinnung	23
2.20. Bioinformatische Methoden	24
2.20.1. Sequenzanalysen	24
2.20.2. Mikrosatelliten Analyse	24
2.20.3. Verarbeitung und Normalisierung der Makroarray-Signale	24
2.20.4. MapMan Annotation	24
2.20.5. Identifizierung von Hydrophilinen <i>in silico</i>	25
2.21. Statistische Methoden	25
2.21.1. Differentielle Genexpression	25
2.21.2. Verifikation mittels qRT-PCR	25
2.21.3. Anreicherungsanalysen	25
2.21.4. Korrelations- und Hauptkomponentenanalyse	26
3. Ergebnisse	29
3.1. Phänotypische Erfassung der Frosttoleranz	29
3.2. Genotypisierung	31
3.2.1. Bestimmung des Wintertyps	31
3.2.2. Bestimmung der genetischen Diversität der verwendeten Gerstegenotypen	32
3.3. Transkriptomanalyse	33
3.3.1. Normalisierung	33
3.3.2. Anmerkungen zur Datenqualität der homologen und heterologen Makroarray-Hybridisierungen	35
3.3.3. Korrelation zwischen Makroarray und qRT-PCR von ausgewählten Genen in Gerste und Roggen	41
3.3.4. Einteilung des Makroarrays in funktionelle Kategorien	46
3.3.5. Anzahl differentiell exprimierter Gene in Roggen, Weizen und Gerste während der Kälteakklimatisierung	48
3.3.6. Anreicherungsanalyse für differentiell exprimierte Gene funktioneller Kategorien zu verschiedenen Zeitpunkten der Kälteakklimatisierung	52
3.4. Identifizierung von Hydrophilinen <i>in-silico</i>	89
3.5. Korrelationsanalyse	90
3.5.1. Hauptkomponentenanalyse	90
3.5.2. Anreicherungsanalyse funktioneller Gruppen	90

4. Diskussion	99
4.1. Genregulation während der Kälteakklimatisierung	100
4.1.1. Photoakklimatisierung: Interaktion von Photosynthese (PS) und Kohlenhydrat-Metabolismus (CHO)	101
4.1.2. Die Aktivierung des CHO-Metabolismus ist entscheidend für die Ausprägung der Frosttoleranz	102
4.1.3. Zellwandmodifikationen sind charakteristisch für die Kälteakklimatisierung	104
4.1.4. Die abiotische Stressantwort beinhaltet eine biotische Komponente	105
4.1.5. Hydrophiline werden verstärkt in Roggen und Weizen induziert	106
4.1.6. Histone zeigen eine spezieabhängige Genregulation in der Spätphase	107
4.2. Korrelationsanalyse	108
4.2.1. Roggen	108
4.2.2. Weizen	109
4.2.3. Gerste	110
4.3. Variabilität der kälteinduzierten Genexpression	111
4.4. Phytotronexperimente (Phänotypisierung)	113
4.5. Evaluierung der Datenqualität mittels qRT-PCR	114
4.6. Bemerkungen zur Datenanalyse	115
4.6.1. Detektion differentieller Genexpression	116
4.6.2. Normalisierung und funktionelle Annotation	116
4.7. Ausblick	117
Literaturverzeichnis	119
A. Tabellen	139
B. Abbildungen	183

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht die differentielle Genexpression während der Kälteakklimatisierung von Gerste (*Hordeum vulgare* L.), Weizen (*Triticum aestivum* L.) und Roggen (*Secale cereale* L.). Umfassende Genregulationen während der Kälteakklimatisierung sind notwendig, damit temperente Pflanzen ihre maximal erreichbare Frosttoleranz ausbilden können. Dabei stellt Roggen u.a. aufgrund seiner Widerstandsfähigkeit gegen widrige Umwelteinflüsse eine Modellspezies für abiotischen Stress dar. Auf Basis eines Gersten cDNA-Makroarrays wurde eine vergleichende Transkriptomanalyse von sechs Wintergenotypen – mit unterschiedlicher Frosttoleranz pro Spezies – an vier Zeitpunkten durchgeführt. Dabei wurden Faktoren gefunden, die möglicherweise die Ausprägung des Merkmals Frosttoleranz beeinflussen können. Der erste Teil der Dissertation untersucht die Datenqualität mit dem Schwerpunkt auf Verifizierung der Makroarray-Resultate durch quantitative „Real-Time“ Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR). Basierend auf der Auswahl der Ergebnisse aus den homologen und heterologen Hybridisierungsresultaten, zeigte sich in beiden Fällen eine robuste Verifizierung der differentiellen Genexpression. Die phänotypische Korrelation bei *Hordeum vulgare*, die auf den Expressionswerten der Arrayresultate basieren, konnte mit den Expressionsdaten mehrerer Gene mittels qRT-PCR bestätigt werden. Unter den Kandidatengenen sind bereits eingängig charakterisierte Gene wie Dehydrine, Saccharose-Synthasen, Superoxid-Dismutasen oder Transportermoleküle. Eine Transkriptomanalyse während der Kälteakklimatisierung zeigt eine konservierte Induktion der Transkription von Genen im Kohlenhydrat-, Stress- oder Redox-Metabolismus. Eine Repression wird hingegen bei der Photosynthese und beim Zellwand-, Lipid- oder DNA-Metabolismus erfasst. Dabei zeigen sich speziesspezifische Genregulationen, die im Zusammenhang mit der differentiellen Frosttoleranz der *Triticeae* diskutiert werden. Am deutlichsten drückt sich dieses in der Expression von LEA-Proteinen (*late embryogenesis abundant*) aus. Ein Unterschied zwischen den Arten besteht in der Regulation verschiedener Mitglieder von Genfamilien z.B. bei Saccharose-Synthasen, Ca-bindenden oder WCOR410-Proteinen. Mindestens 12 unbekannte Transkripte konnten identifiziert werden, die in allen untersuchten Genotypen induziert wurden und interessante Kandidaten für weitere Untersuchungen darstellen. Die Transkriptomanalyse ist auch als eine Ressource für das kälteregulierte Genom der *Triticeae* gedacht.

Stichwörter: abiotischer Stress, Kälteakklimatisierung, *Triticeae*, Transkriptomanalyse

Abstract

Massive transcriptional changes occur during cold-acclimation – a period of non-freezing temperatures – leading to improved frost tolerance in temperate plants. The present study compares the gene expression during cold-acclimation in barley (*Hordeum vulgare* L.), wheat (*Triticum aestivum* L.) and rye (*Secale cereale* L.). Because of its outstanding robustness against adverse environmental conditions rye is considered to be a model species for abiotic stress tolerance. Cross-species transcript profiling was applied by using a barley cDNA-microarray in order to determine factors influencing frost tolerance. Therefore, winter-genotypes of each species with variable frost tolerance were selected based on phytotron freezing tests. Transcript profiling data obtained by homologous and heterologous microarray hybridisations at four time-points were verified by quantitative real-time polymerase chain-reaction (qRT-PCR). The qRT-PCR results demonstrated a clear confirmation of differential gene expression in homologous as well as in heterologous hybridisations. Transcript profiling during cold-acclimation indicated evolutionary conserved cold-responses between the species. Cold-induced gene expression was found in carbohydrate, stress and redox metabolism. Cold-repressed responses included genes involved in photosynthesis, cell-wall-, lipid- and DNA-metabolism. As expected, species-dependent gene regulation was frequently observed and is discussed in regard to the variable frost tolerances in *Triticeae*. In particular, late embryogenesis abundant proteins (LEA) were induced more strongly in rye and wheat. Numerous members of gene families e.g. sucrose-synthases, Ca-binding or WCOR410 proteins showed distinct cold-specific regulations. 12 unknown proteins were induced across all studied genotypes, presenting interesting targets for further investigations. Correlation analysis between phenotype and transcript abundance and subsequent confirmation by qRT-PCR verified several correlated genes in *Hordeum vulgare*. Among the candidate genes were well characterised stress markers like dehydrins, sucrose-synthases, superoxid-dismutases and transporters. This study also provides a comprehensive overview of the cold-acclimated *Triticeae* transcriptome.

Keywords: abiotic stress, cold acclimation, *Triticeae*, transcript profiling

Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
ADP	Adenosindiphosphat
AFP	<i>anti-freeze proteins</i>
AMP	Ampicillin
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CBF	C-Repeat Binding Factors
cDNA	<i>copy DNA</i>
CSH	<i>cross-species hybridisation</i>
CTP	Cytidintriphosphat
DECP	Diethylpyrocarbonat
DHN	Dehydrin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FC	<i>fold-change</i>
FDR	<i>false discovery rate</i>
FT	Frosttoleranz
g	Erdbeschleunigung
gDNA	genomische DNA
HSP	Hitzeschockprotein
Hz	Hertz
KA	Kälteakklimatisierung
kB	Kilo Basen
kDA	Kilo Dalton
LEA	<i>late-embryogenesis abundant</i>
LHC	Lichtsammelkomplex
LTP	<i>lipid transfer protein</i>
MDS	Multidimensionale Skalierung
mRNA	<i>messenger RNA</i>

OD	Optische Dichte
PCR	<i>polymerase chain-reaction</i>
PIC	<i>polymorphic information content</i>
PIP	<i>plasma membrane intrinsic protein</i>
PPFD	<i>photosynthetically active photon flux density</i>
PR	<i>pathogen-related</i>
PS	Photosynthese
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
QTL	<i>quantitative trait locus</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RuBisCO	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase
SAMDC	S-Adenosylmethionin-Decarboxylase
SDS	Natriumlaurylsulfat
Sm	Streptomycin
SSR	<i>short sequence repeat</i>
STS	<i>sequence-tagged site</i>
TCA	Tricarbonsäurezyklus
TF	Transkriptionsfaktor
TIP	<i>tonoplast intrinsic protein</i>
UDP	Uridindiphosphat
ÜN	über Nacht
*	Signifikanz bei $P = 0.05$
**	Signifikanz bei $P = 0.01$
***	Signifikanz bei $P = 0.001$

1 Einleitung

Der Stamm der *Triticeae* umfasst eine Reihe von weltweit wirtschaftlich bedeutsamen Kulturpflanzen. Die ökonomisch wichtigste ist Weizen mit einer globalen Produktion von 685 Mio. t. in 2009 (<http://faostat.fao.org>), gefolgt von Gerste (152 Mio. t.) und Roggen (18 Mio. t.). Für die Pflanzenproduktion sind abiotische Stressoren (Kälte, Trockenheit, Hitze usw.) limitierend, die zu Ernteaussfällen führen können. Die vorliegende Studie hat die Genexpression während der physiologischen Anpassungsphase bei Kälte (Kälteakklimatisierung) zum Gegenstand. Dabei wird Roggen (*Secale cereale*), Weizen (*Triticum aestivum*) und Gerste (*Hordeum vulgare*) miteinander verglichen. Obwohl die *Triticeae*-Genome eine hohe Synteny aufweisen, besitzen die Pflanzen große Unterschiede in ihren Frosttoleranzen (Fowler *et al.*, 1977; Fowler und Carles, 1979; Fowler, 2008). Akklimatisierter Roggen kann bspw. Temperaturen von unter -30°C widerstehen. Weizen und Gerste vertragen dagegen Temperaturen bis -21°C bzw. -14°C (Gusta und Fowler, 1979). Drei physiologische Grundkomponenten determinieren den Grad der Toleranz, den eine *Triticeae* erreichen kann:

1. Toleranz gegenüber tiefen Temperaturen
2. Vernalisierung und
3. Photoperiode-Sensitivität (Limin und Fowler, 2002, 2006).

Anhand dieser drei Komponenten werden die *Triticeae* in Winter- und Sommertypen unterteilt. Varietäten, die dem Wintertyp angehören, benötigen eine Vernalisierungsphase bis zu 8 Wochen (Flodd und Halloran, 1984), in der sie Temperaturen zwischen 0 und 10°C (Trevaskis *et al.*, 2007) ausgesetzt sind. Danach wechseln sie in die regenerative Phase und verlieren damit ihre zuvor erworbene Frosttoleranz. Unter natürlichen Bedingungen vollzieht sich die Vernalisierung im Herbst und Winter. Wintertypen haben daher auch die höchste Frosttoleranz und reagieren auch auf Veränderungen in der Photoperiode. Sommerkultivare benötigen keine Vernalisierung und sind zusätzlich nicht sensitiv *in puncto* Photoperiode. Der fakultative Typ reagiert auf Änderungen der Photoperiode, kann tolerant wie Winterkultivare sein und benötigt jedoch keine Vernalisierung (Karsai *et al.*, 2001). Die maximale Frosttoleranz wird bei Wintergetreidearten, wie bei vielen anderen temperenten Pflanzen auch, nach einer längeren Kältephase (bei < 10°C für mind. 6 Wochen) erreicht. Diese Phase wird Kälteakklimatisierung genannt, bei der die Pflanze – im Gegensatz zur Vernalisierung – im vegetativen Status verbleibt. Unter natürlichen Bedingungen bereitet sich die Pflanze im Herbst auf extreme Niedrigtemperaturen im Winter vor.

1.1. Evolution der Triticeae

Als autochthones Gebiet der *Triticeae* wird der „Fruchtbare Halbmond“ (Abb. 1.1) in Vorderasien angesehen, wo erstmals vor 10.000 Jahren Gerste und Weizen und später Roggen domestiziert worden sind (Diamond, 2010). Die Genome der *Triticeae* umfassen sieben Basischromosomensätze bei diploiden und polyploiden Spezies: Gerste ($2n=2x=14$) besitzt das kleinste Genom mit 5,1 Gbp, das Roggen-Genom ($2n=2x=14$) umfasst 7,9 Gbp und das allohexaploide Weizen-Genom ($2n = 6x = 42$) 16,9 Gbp (Lelley *et al.*, 2008). Roggen ist im Gegensatz zu den meisten anderen *Triticeae* ein obligater Fremdbefruchter, der Heterosiseffekte entwickelt. Die etwa 360 Arten der *Triticeae* besitzen Mitglieder mit diploiden, tetraploiden, hexaploiden oder selbst octoploiden Genomen (*Triticale*). Die wohl erste Weizenart, Einkorn (*Triticum monococcum*), wurde wahrscheinlich im Südwesten der Türkei domestiziert (Heun *et al.*, 1997). Der heutige Brotweizen (AABBDD) ist ein Produkt interspezifischer Hybridisierungen von Emmer (*T. turgidum* ssp. *dicoccum*, AABB) und dem diploiden Gänsefußgras (*Aegilops tauschii* DD). Er wurde vor etwa 7000 Jahren domestiziert (Zohary und Hopf, 2000). Aus der ersten Polyploidisierung von Einkorn (*T. monococcum*, AA) mit einem vermutlich nahen Verwandten von *Aegilops speltoides* (B-Genom) ging Emmer als eigene Spezies hervor (Becker, 2011). Die heutige Gerste entwickelte sich monophyletisch aus dem ursprünglichen Vorläufer *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*, der noch heute im Gebiet des Fruchtbaren Halbmondes und in weiteren Gebieten Zentralasiens, Südosteuropas und Südwestasien und Afrika anzutreffen ist (Badr *et al.*, 2000). Roggen ist aufgrund der Chasmogamie vermutlich erst 7000 v.Chr. kultiviert worden. Der Selektionsprozess dauerte für Roggen länger, da es aufgrund der Befruchtungsgenetik umständlicher war, homozygote Domestikationsloci zu erhalten. Das Ursprungsgebiet wird in dem heutigen Gebiet der Türkei, Armenien und Iran vermutet. Wichtige Selektionsziele während der Domestizierung der *Triticeae*



Abbildung 1.1 – Domestikationsgebiet (grün) der *Triticeae* im „Fruchtbaren Halbmond“ (aus (Feuillet *et al.*, 2008)).

waren Mutanten, die Ähren ohne Spindelbrüchigkeit hervorbrachten sowie Samen, die keine Dormanz aufwiesen. Interspezifische Kreuzungen von Weizen und Roggen können vitale Hybride (*Triticale*) bilden.

1.2. Frostschäden bei Pflanzen

Ausgehend von historischen Aufzeichnungen aus der Zeit zwischen 1956-1988 wird geschätzt, dass rund 7% der Ernte von Winterweizen jedes Jahr aufgrund von Winterschäden verloren geht (Patterson *et al.*, 1990). Zudem können in bestimmten Fällen dramatische Winterschäden auftreten, bei denen ein Großteil der möglichen Ernte vernichtet wird (Abb. 1.2). Jährliche Ausgaben für Frostschutz betragen etwa 100 Mio. \$ und die Schäden bei Ernteaussfällen belaufen sich auf 10-100 Mio. \$ (Pearce, 1999). Kälte ist also wohl der wichtigste limitierende Faktor für die geographische Verteilung von Pflanzenarten.



Abbildung 1.2 – Frostschäden bei einem Feldversuch mit sensitiven und toleranten Weizenkultivaren. Photo: Dr. Gábor Kocsy (Agricultural Research Institute, Martonvásár).

Die verschiedenartigen Pflanzengewebe besitzen unterschiedlich ausgeprägte Frosttoleranzen. Allgemein gilt, dass reproduktive Organe am anfälligsten gegenüber Frost sind. Bei akklimatisierten Pflanzen ist das Wurzelgewebe aufgrund des hohen Wassergehaltes besonders anfällig, gefolgt von Blättern und Spross (Olien, 1967). Plötzlich auftretende Kahlfröste, bei denen die Pflanze nicht unter einer schützenden Schneedecke verborgen ist, können zu massiven (apoplastischen) Schäden führen. Gräser wie Gerste frieren bei Temperaturen zwischen $-1,5^{\circ}\text{C}$ und $-2,5^{\circ}\text{C}$ ein und können den Gefrierpunkt nur leicht durch gelöste Substanzen oder Unterkühlung (exothermer Vorgang) erniedrigen (Pearce und Fuller, 2001). Das Einfrieren von Blättern bei Gerste umfasst zwei Stufen: die Erste ist schnell und beinhaltet nur rund 0,4% des gesamten Wassers des Blattes. Die Zweite umfasst extrazelluläres Wasser, das aus den Zellen aufgrund des geringeren

Wasserpotentials des Eises herausgezogen wurde. In Getreide sind die Internodien anatomische und physiologische Barrieren, die die Ausbreitung des Eises zur sensitiven Wurzelbasis verzögern können (Tanino und McKersie, 1985; Zámečník *et al.*, 1994; Pearce und Fuller, 2001). Als weitere physiologische Adaptionen bei Getreide ist die Bildung von Tracheiden zwischen Xylemelementen in den Gefäßen von Wurzel und Spross zu nennen (Aloni und Griffith, 1991). Ein Schutz vor Eisbildung an der Pflanzenoberfläche beim Winterroggen wird durch Modifikationen wie etwa durch die Verdickung der Zellwand, der Kutikula und der epikutikularen Wachsschicht erreicht (Griffith *et al.*, 1985). Extrazelluläre Rekristallisation von kleinen zu größeren Eiskristallen kann durch die Aktivität von Inhibierungsproteinen (*anti-freeze proteins*, AFP) unterbunden werden, um die Bildung großer Eismassen zu verhindern (Griffith *et al.*, 2005). Diese können die Struktur von Gewebe oder Organen beeinträchtigen, indem sie Zellschichten voneinander separieren und Kavitäten bilden. Embolien können im Xylem entstehen, wenn Gas durch Eisbildung aus der Lösung geht und beim Tauen expandiert (Pearce, 2001).

Weitreichende Folgen hat die frostinduzierte Dehydrierung, die durch die Bildung der Eiskristalle einhergeht. Da der Zelle Wasser entzogen wird, bis sich das Wasserpotential von extrazellulärem Wasser und Cytoplasma angeglichen hat, kommt es zur Dehydrierung der Zelle und zu Schäden an Membranen (Plasmamembran) (Steponkus, 1984). Das Ergebnis sind der Verlust der Kompartimentierung und Austritt von Elektrolyten und anderen löslichen Substanzen aus der Zelle (Stout *et al.*, 1980). Der hier wirkende Mechanismus ist ein Phasenwechsel der Membran zu einer Monolayer-Struktur, die durch bestimmte Lipide hervorgerufen wird.

1.3. Molekulare und Genetische Aspekte der Kälteakklimatisierung

Frosttoleranz ist eine quantitative Eigenschaft und umfasst nicht nur Resistenz gegenüber Unternulltemperaturen, sondern auch gegen Dehydrierung, Eiseinschluss, Sauerstoffmangel und (psychrophile) Pathogene. Sie wird erst nach einer mehrwöchigen Kälteakklimatisierung voll ausgeprägt (Galiba *et al.*, 2009). Pflanzen sind größtenteils poikilothermische Organismen, d.h. sie nehmen die Temperatur ihrer Umgebung an und müssen ihren Stoffwechsel entsprechend anpassen. Daher besitzen Pflanzen aufgrund ihrer sessilen Lebensweise Adaptionen für ihren Lebensraum. Das ökophysiologische Konzept der Physiotypen beschreibt physiologische Attribute, mit denen man Pflanzen in funktionelle Gruppen unterteilen kann. Gewissermaßen könnte man die Sommer- und Wintergenotypen der *Triticeae* als Physiotypen bezeichnen, da sie sich grundlegend in Bezug auf Photoperiodesensitivität und Frosttoleranz unterscheiden. Dass es tatsächlich zu deutlichen Unterschieden in der Genexpression regulatorischer Gene zwischen Sommer- und Winterkultivaren während der Kälteakklimatisierung kommt, konnten Gulick *et al.* (2005) und Monroy *et al.* (2007) durch Transkriptomanalysen beobachten.

1.3.1. Signaltransduktion

Fortschritte in der Untersuchung der Signaltransduktion wurden zumeist bei *Arabidopsis* erzielt. Aus ihnen wurde ein allgemein gültiges Modell für andere Spezies entwickelt. Bisher ist der Sensor für die Perzeption von Temperaturänderungen unbekannt. Experimentelle Studien belegen eine wichtige Partizipation der Plasmamembran an der

Signaltransduktion von Kältestress (Chinnusamy *et al.*, 2007). Die Membran vollzieht einen Phasenübergang von einer flüssigen, kristallinen Struktur zu einer starren Gelphase (Murata und Los, 1997) mit einer Konformationsänderung bestimmter Bestandteile des Cytoskeletts und Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol innerhalb von 15 Sekunden (Knight *et al.*, 1991; Orvar *et al.*, 2000; Knight, 2002; Abdrakhamanova *et al.*, 2003). Vermutlich wird die Ca^{2+} -Konzentration durch eine erhöhte Rigidität und einer darauf folgenden Aktivierung von mechanosensitiven oder ligandgesteuerten Influx- Ca^{2+} -Kanäle erhöht. Aufgrund der raschen Rigidifizierung nach einer Temperatursenkung und als Barriere zwischen innerer und äußerer Umwelt wird die Plasmamembran weithin als der Ort der Signalperzeption beschrieben (Uemura *et al.*, 2006). Des Weiteren haben Vaultier *et al.* (2006) bei der *Arabidopsis* Mutante *fad2*, die defizitär für eine Oleat-Desaturase ist, eine Rigidifizierung der Plasmamembran und Aktivierung einer kälteregulierten Diacylglycerin Kinase bei einer höheren Temperatur (18°C) als beim Wildtyp (14°C) nachgewiesen. Zudem können Konzentrationsänderungen von Metaboliten, bedingt durch die veränderte Reaktionskinetik, weitere Sensoren für Temperatursenkungen sein. Nicht zuletzt können Konformationsänderungen von Nukleinsäuren ein weiterer denkbarer Mechanismus für die Signalperzeption von Kälte sein (Chinnusamy *et al.*, 2010). Eine Histidin-Kinase im Cyanobakterium *Synechocystis* (HIK33) konnte als maßgebliche Komponente in der Signaltransduktion von Temperatursenkungen identifiziert werden (Murata und Los, 2006). Neben dieser Zwei-Komponenten Histidin-Kinase sind auch G-Protein assoziierte Rezeptoren potentielle Sensoren für Kälte (Xiong *et al.*, 2002). Einen weiteren, fundamental neuen Mechanismus zur Temperaturüberwachung entdeckten Kumar und Wigge (2010) bei bestimmten Histonvarianten (H2A.Z) in *Arabidopsis*. Die Histonvarianten binden bei niedrigen Temperaturen stärker an die DNA und blockieren somit die Expression von Genen. Bei höheren Temperaturen kommt es zu lokaler Entfaltung der DNA und Transkription von Genen durch die RNA-Polymerase. Die sekundären Signale ABA und ROS können ihrerseits auch Ca^{2+} -Signaturen initiieren. Ihre Funktion konnte mit Hilfe der Mutanten *frs1* (*los5*) bzw. *fro1* aufgeklärt werden. Die *frs1*-Mutante ist defizitär für eine Abscisinaldehyde-Oxidase und ist hypersensitiv gegenüber Kälte (Llorente *et al.*, 2000). Die *fro1*-Mutante zeigt eine konstitutiv hohe Akkumulation von ROS und eine geminderte Expression von COR-Genen. Sie ist zusätzlich hypersensitiv gegen Kälte und Frost (Lee *et al.*, 2002). Die Detektion von ROS wird auch von redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren wie NPR1 oder HSFs vermittelt (Mittler *et al.*, 2004). Die Ca^{2+} -Signatur dient als Sekundärer Messenger und aktiviert Phospholipase C/D, die ihrerseits Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP3) bildet und dadurch die Ca^{2+} -Signale amplifizieren kann (Vergnolle *et al.*, 2005). Weitere Sekundäre Messengers sind CDPKs (*calcium-dependent protein kinases*), Calmoduline (CaMs), SOS3, Protein-Phosphatase 2C oder Calcineurin B-ähnliche (CBL) Proteine. Sie verfügen über einen Calciumsensor und können positive oder negative Regulatoren der kälteregulierten Genexpression sein (Sheen, 1996). Desweiteren sind MAPK-Kaskaden (*mitogen-activated protein kinases*) weitere Faktoren, deren Aktivitäten durch ROS gesteuert werden, und die Genexpression während der Kälteakklimatisierung positiv beeinflussen (Teige *et al.*, 2004).

1.3.2. Transkriptionelle Regulation der Genexpression während der Kälteakklimatisierung

Die Signaltransduktion (Abb. 1.3) aktiviert eine Reihe von diversen Regulatoren u.a. auch die *CRT-binding factors* (CBF). Sie gehören zur APETALA/EREBP-Transkriptionsfaktor-

familie und sind wichtige Regulatoren für die Expression sogenannter COR-Gene (*cold-regulated*) (Thomashow *et al.*, 2001). Erste Indizien für die Präsenz eines regulatorischen Elementes im Promotor des kältereulierten Gens *LTI78* zeigten Nordin *et al.* (1993). Stockinger *et al.* (1997) konnten nachweisen, dass *CBF1* aus *Arabidopsis* sogenannte „C-repeat/DRE/LTRE“ (CCGAC) Sequenzmotive (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, 1994) in den Promotoren von COR-Genen binden kann. In *Arabidopsis* wurden mehrere Homologe zu *CBF1* identifiziert, die je nach ihrem Expressionsverhalten gegenüber Kälte oder Trockenheit in *DREB1* bzw. *DREB2* eingeteilt werden können. Orthologe Gene wurden außer in *Arabidopsis thaliana* und den *Triticeae* in einer Vielzahl verschiedener Arten identifiziert (Jaglo *et al.*, 2001).

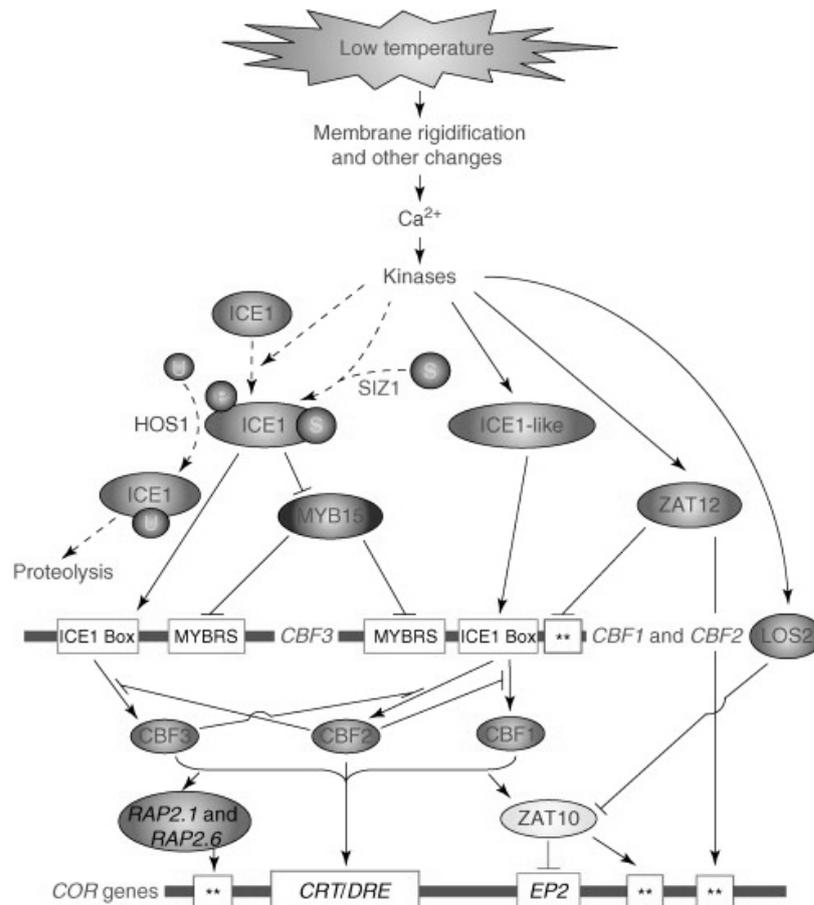


Abbildung 1.3 – Schematische Darstellung der Signaltransduktion von Kältestress in Pflanzen (aus Chinnusamy *et al.*, 2007). Infolge der Kälteeinwirkung kommt es zur Rigidifizierung von Membranen und Influx von Calcium-Ionen in die Zelle. Dadurch wird u.a. ICE1 aktiviert und die Expression von CBF's stimuliert. CBF's induzieren die Expression von COR-Genen (*cold-regulated*), die für Akklimatisierung der Pflanze essentiell sind. Abkürzungen siehe Text.

Überexpression der *CBF1/3/4* führte zu einer konstitutiven Induktion von Genen mit dem Promotorelement DRE/CRT/LTRE und einer erhöhten Frosttoleranz und Trockentoleranz bei nicht-gehärteten Pflanzen (Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998; Kasuga *et al.*, 1999; Haake *et al.*, 2002). Transkriptomanalysen bei *Arabidopsis* zeigten jedoch, dass rund 12% der regulierten Gene dem CBF-Regulon angehören und dass mehrere regulatorische Signaltransduktionswege aktiviert werden (Fowler und Thomashow, 2002). Mittels Tran-

skriptomanalyse wurde ein weiteres wichtiges Regulon der Kälteantwort gefunden, das von *ZAT12* (*zinc-finger* Protein) kontrolliert wird. Insgesamt konnten Vogel *et al.* (2005) in der selben Studie 514 Gene identifizieren, die essentielle Funktionen in der Kälteakklimatisierung in *Arabidopsis* übernehmen. Neuere Untersuchungen zeigten, dass die Expressionsmuster von *CBF1/3* und *CBF2* unterschiedlich sind und vermutlich verschiedene Funktionen während der Kälteakklimatisierung wahrnehmen können (Novillo *et al.*, 2007). Expressionsanalysen in *Arabidopsis* zeigten eine transiente, kälteregulierte Expression innerhalb von 30 Minuten, die etwa nach einer Stunde ihren Höhepunkt erreicht (Medina *et al.*, 1999). Bei Analysen von *hos1*-Mutanten wurde der gleichnamige Faktor kloniert, der die kältebeeinflusste Expression von CBFs durch Ubiquitinylierung von *ICE1* (*inducer of CBF expression*) durch *HOS1* (*high expression of osmotically responsive gene 1*) negativ reguliert (Lee *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2006a; Miura *et al.*, 2007). Chinnusamy *et al.* (2003) konnten *ICE1* als konstitutiv exprimierter bHLH (*basic helix-loop-helix*) Transkriptionsfaktor identifizieren, der im Promotor befindliche MYC-Motive von *CBF3* und anderen TF erkennen kann. *ICE1*-Mutanten zeigten sowohl eine negative Beeinflussung in der Expression des CBF-Regulons (Lee *et al.*, 2005) als auch eine Reduzierung der Frosttoleranz (Chinnusamy *et al.*, 2003). Ein negativer Regulator von *ICE1* ist *MYB15*. „Knock-Out“ Mutanten für *MYB15* wiesen eine verstärkte, konstitutive CBF-Expression und höhere Kältetoleranz bei *Arabidopsis* auf. (Agarwal *et al.*, 2006). Ein weiterer Faktor (*SIZ1*) kann die Stabilität von *ICE1* durch Sumoylierung erhöhen und somit positiv auf die CBF-Transkription einwirken.

Epigenetische Prozesse wie Histonmodifikation (Stockinger *et al.*, 2001) oder DNA-(De)Methylierung (Choi und Sano, 2007) spielen bei der Genregulation bei Kältestress bzw. Vernalisierung (Dennis und Peacock, 2007) eine weitere Rolle. Neben den CBFs sind weitere Transkriptionsfaktoren verschiedener Klassen bekannt, die kälteregulierte Regulons kontrollieren. *ESK1* (Xin *et al.*, 2007) wurde durch die Mutante *eskimo1* entdeckt, die eine konstitutive Frosttoleranz aufweist und die Expression weiterer regulatorischer Gene manipulieren kann. Weitere wichtige regulatorische Faktoren sind *HOS10/9*, *SCOF1*, *ERF*, *WLIP19* sowie *NAC*, die weitere Regulons kontrollieren (Chinnusamy *et al.*, 2010). RNA-Prozessierung und RNA-Export werden unter Kältestress ebenfalls beeinflusst wie bspw. das temperaturabhängige alternative Spleißen von *COR*-Genen zeigt (Mastrangelo *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2006b).

1.3.3. Genetische Aspekte

Mitte des letzten Jahrhunderts begannen Genetiker die Vererbung von Frosttoleranz vor allem beim Weizen zu untersuchen. Einen Überblick über die ersten genetischen Untersuchungen finden sich bei Sutka (1981). Die Studien brachten wichtige Erkenntnisse über das polygene Vererbungsmuster hervor, u.a. dass bei den *Triticeae* wichtige genetische Loci zur abiotischen Stressresistenz auf der homologen Chromosomengruppe 5 lokalisiert sind. Diese Chromosomengruppe ist von herausragender Bedeutung für die Vererbung der Frosttoleranz, aber auch andere Chromosomen leisten einen wichtigen Beitrag dazu.

Im Vergleich zum *Arabidopsis*-Genom mit sechs *CBF*-Faktoren besitzt das Gerstegenom eine Genfamilie mit mindestens 20 Mitgliedern, die sich in drei phylogenetisch Gruppen einteilen lassen (Skinner *et al.*, 2005a). In einer Studie von Badawi *et al.* (2007) wurde gezeigt, dass die *CBF*-Genfamilie in Gerste und Weizen im Vergleich mit anderen Arten der *Pooideae* eine höhere Anzahl umfasst. Ob die *CBF*-Faktoren in den *Triticeae* eine

redundante Funktion, Subfunktion oder eine Neofunktionalisierung übernehmen, ist zur Zeit ungeklärt. Als gesichert gilt jedoch die Annahme, dass bestimmte CBF-Faktoren eine autoregulatorische Funktion aufweisen (Novillo *et al.*, 2004). Snape *et al.* (1997) identifizierten neben *FR-1* als wichtigen Locus für die Frosttoleranz ebenfalls *FR-2*, der sowohl in Gerste als auch in Weizen auf dem langen Arm von Chromosom 5 kartiert wurde. Der Locus umfasst bei Gerste und Weizen (*T. aestivum* und *T. monococcum*) ein Cluster von mehreren CBF-Genen (Choi *et al.*, 2002; Francia *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2006). QTL-Analysen bei Weizen und Gerste verifizierten, dass *FR-2* der zugrunde liegende Locus für die phänotypische Varianz in der untersuchten Population ist (Vágúfalvi *et al.*, 2003; Baga *et al.*, 2007; Francia *et al.*, 2007). In einer kürzlich veröffentlichten Assoziationsstudie von Fricano *et al.* (2009) stellte sich heraus, dass *HvCBF14* einen hohen Grad an Polymorphismus aufweist und für die phänotypische Varianz in der untersuchten Population verantwortlich ist. Expressionsstudien in der Kartierungspopulation „Nure x Tremois“ mit segregierenden *VRN-H1/FR-H1* und *FR-H2* Loci zeigten, dass Rekombinanten, die das Winterallel *vrn-H1* tragen, ein höheres Expressionsniveau von Genen des *FR-2* Locus aufwiesen als solche, mit dem *Vrn-H1* Allel. Weitere Hinweise, dass der *VRN-H1* Locus die Expression von CBF-Faktoren maßgeblich beeinflusst, ist die Tatsache, dass bei der Vernalisierung mehrere CBF-Faktoren negativ reguliert werden. Die Tendenz, dass Winter- gegenüber Sommertypen eine erhöhte CBF-Expression aufweisen, wurde auch bei Weizen und Roggen bestätigt (Stockinger *et al.*, 2007). In einer umfangreichen und vergleichenden Expressionsstudie von Campoli *et al.* (2009) wurden die Expressionsprofile der CBFs von Roggen, Weizen und Gerste bei verschiedenen Induktionstemperaturen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Expression von einer komplexen Interaktion zwischen Spezies, Genotyp, Temperatur, Licht und Zeit abhängig ist.

Vernalisierung stellt eine ökophysiologische Anpassung von temperenten Pflanzen dar, um das sensitive regenerative Gewebe vor Frost zu schützen. Takahashi und Yasuda (1971) schlugen ein epistatisches Modell für Gerste vor, bei dem drei Loci für die Vernalisierungseigenschaften verantwortlich sind. Für Gerste beschreibt die folgende Allelkombination den Wintertypus: *VRN-H1* (Chromosom 5H), *VRN-H2* (Chromosom 4H) und *VRN-H3* (Chromosom 1H). Allelische Varianten sind bei *VRN-H3* nur selten zu finden. Sutka und Snape (1989) konnten, basierend auf Chromosomen-Substitutionslinien in *Triticum aestivum*, die besondere Rolle von Chromosom 5 in einer genetischen Analyse nachweisen. Dabei wurden die Chromosomen 5A und 5D einer frostempfindlichen Linie (Chinese Spring) mit der einer frosttoleranten (Cheyenne) substituiert. Dies resultierte in signifikant erhöhter Frosttoleranz des Rezeptors. Weitere genetische Analysen zeigten, dass *VRN-1* ein wichtiger Regulator für Frosttoleranz und Vernalisierung darstellt (Galiba *et al.*, 1995; Sutka *et al.*, 1999). Es konnte bisher nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden, daß es sich hierbei um einen pleiotropen Effekt eines Gens handelt, da *FR-1* und *VRN-1* engst gekoppelt vererbt werden (Stockinger *et al.*, 2006). Mutationen in der Promotorregion oder im ersten Intron von *VRN1* (kodiert für ein MADS-Box/AP2 Protein) sind verantwortlich für den dominanten Sommertypus in Gerste und Weizen (Yan *et al.*, 2003b, 2004; Fu *et al.*, 2005; von Zitzewitz *et al.*, 2005; Cockram *et al.*, 2007). *VRN1* wird durch Vernalisierung im Winter leicht induziert und reprimiert *VRN2* (*ZCCT1*) (Trevaskis *et al.*, 2006, 2007). Unter Langtagbedingungen und höheren *CONSTANS*-Proteinlevels wird *VRN3* induziert, was zum irreversiblen Übergang vom vegetativen zur reproduktiven Phase führt und ein positiver Regulator für die *VRN1*-Expression ist. Unter Nicht-Vernalisierungsbedingungen wird *VRN2* konstitutiv exprimiert und

reprimiert damit *VRN1* und *VRN3* (Distelfeld *et al.*, 2009). Bei einer Expressionsstudie konnte gezeigt werden, dass *VRN1* essentiell für die Initiierung der regulatorischen Mechanismen zur Repression der Kälteakklimatisierung ist (Dhillon *et al.*, 2010).

1.3.4. Funktionelle Proteine

Temperaturveränderungen wirken sich direkt auf alle kinetischen und thermodynamische Prozesse aus und beeinflussen maßgeblich die pflanzliche Biochemie und Physiologie. Weitere Stressoren begleiten die Kälteakklimatisierung, die je nach Klima und Umweltbedingungen variieren können. Prinzipiell wird der primäre Metabolismus hochreguliert, um ein moderates Wachstum und eine Akklimatisierung zu gewährleisten. Kälteakklimatisierungsreaktionen können

- homöostatisch (um „steady-state“-Gleichgewichte aufrechtzuerhalten),
- kompensatorisch (um niedrigere Reaktionsgeschwindigkeiten auszugleichen),
- entwicklungsbedingt (Vernalisation),
- nicht-funktionell (unwichtige Nebenreaktionen der Temperaturabsenkung)
- oder kälteakklimatisierend (erhöht Frost- oder Kühltoleranz) sein (Pearce, 1999).

Unter natürlichen Bedingungen akklimatisieren überwinterte Pflanzen im Herbst und akkumulieren cryoprotektive Substanzen wie lösliche Zucker (Saccharose, Raffinose, Stachyose, Trehalose), Zuckeralkohole (Sorbitol, Inositol) und niedermolekulare Stickstoffverbindungen (Proline, Glycin, Betain) (Levitt, 1980). Zusammen mit Dehydrinen, Hitzeschock-Proteinen (HSP) und anderen kältereulierten Proteinen stabilisieren sie Membranphospholipide, cytoplasmatische und membrangebundene Proteine als auch hydrophobe Wechselwirkungen (Livingston *et al.*, 2006; Janská *et al.*, 2010). Wie bei vielen abiotischen Stressbedingungen entstehen reaktive Sauerstoffverbindungen: vornehmlich Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxyl-Radikale ($\text{HO}\cdot$) oder Hyperoxid-Anion ($\text{O}_2\cdot^-$). Antioxidative Enzyme wie Superoxid-Dismutasen, Ascorbat-Peroxidasen, Catalasen, Gluthation-Reduktasen/Peroxidasen und protektive Verbindungen wie Ascorbat, reduziertes Gluthation und α -Tocopherol detoxifizieren die reaktive Verbindungen, um Schäden vorwiegend am Photosyntheseapparat zu verhindern (Bridger *et al.*, 1994; Prasad *et al.*, 1994; Chen und Li, 2002). Modifiziert wird die Zusammensetzung von Lipiden um die Membranfunktion aufrechtzuerhalten. Der Anteil von bestimmten ungesättigten Fettsäuren (bspw. Phosphatidylglycerin) der Phospholipiden wird dabei erhöht. Er wirkt sich dabei positiv auf die Frosttoleranz aus (Steponkus *et al.*, 1988; De Palma *et al.*, 2008). Dehydrine (DHN) werden bei Trockenheit und Kälte in vielen Pflanzenspezies exprimiert und zeigen ein typisches Expressionsverhalten unter Stressbedingungen (Tommasini *et al.*, 2008). Sie sind eine heterogene Gruppe von Proteinen und lassen sich in drei Gruppen einteilen. Im Falle von *Arabidopsis* ERD10 und ERD14 konnte festgestellt werden, dass sie zum einen Phospholipide durch elektrostatische Wechselwirkungen stabilisieren zum anderen Proteine als molekulare Chaperone vor Aggregation schützen können (Kovacs *et al.*, 2008). Neben dem gemeinsamen Merkmal glycinreich zu sein, gehören DHN zu den Proteinen mit keiner klar definierten Tertiärstruktur. Diese Eigenschaft macht sie deshalb funktionell vielseitig (Mouillon *et al.*, 2006). Funktionell verwandt sind Hitzeschockproteine mit ihren cryoprotektiven Eigenschaften bei der Stabilisierung von Membranen und Proteinen (Renaut *et al.*, 2006). Dabei unterstützen kleinere HSPs die größeren bei der Renaturierung und Faltung von Proteinen (Mogk

et al., 2003). *Antifreeze-proteins* (Eisrekristallisierung-Inhibierungssproteine, AFPs) kommen im extrazellulären Raum vor und interagieren mit Eiskristallen, um ihr Wachstum zu inhibieren. Sie kommen in der Pflanzen- und Tierwelt vor (Griffith und Yaish, 2004). Pflanzliche AFPs sind PR-ähnliche Proteine und umfassen β -Glucanasen, Chitinasen, Thaumatin-ähnliche Proteine oder Polygalacturonase Inhibitor-Proteine (Hon *et al.*, 1995; Worrall *et al.*, 1998). Kälteakklimatisierter Winterroggen zeigt daher verstärkte Resistenz gegenüber Pathogenen und gleichzeitig verbesserte Frosttoleranz (Hiilovaara-Teijo *et al.*, 1999). Neben PR-Proteinen werden nichtspezifische Lipidtransferproteine (nsLTP) während der Kälteakklimatisierung für eine mögliche Pathogenabwehr akkumuliert (Dunn *et al.*, 1994; Pearce *et al.*, 1998). Neben diesen typischen Kälteakklimatisierungsreaktionen kommt es zu diversen metabolischen Adaptionen im Organismus (Fowler und Thomashow, 2002; Hannah *et al.*, 2005). Wie aus den Transkriptomanalysen bei *Arabidopsis* hervorgeht, werden neben den o.g. Kategorien der Kohlenhydrat-, Polyamin-, Aminosäure- (Prolin), Sekundär-Metabolismus (Flavonoide, Phenylpropanoide) generell induziert. Zu einer Absenkung der Transkriptabundanz kommt es bei der Photosynthese und beim Lipid-, Zellwand-, Nukleotid- und beim Tetrapyrrol-Metabolismus.

1.4. Fragestellung und experimenteller Aufbau

Aufgrund der polygenen Vererbung handelt es sich bei Frosttoleranz um ein komplexes Merkmal, dessen Mechanismen und zugrundeliegenden genetischen Faktoren bis heute nur unvollständig verstanden werden. Obwohl evolutionär sehr eng verwandt, unterscheiden sich Roggen, Weizen und Gerste in ihrer maximal erreichbaren Frosttoleranz. Dabei gilt Roggen als robuste Modellspezies für abiotischem Stress. Gerste wurde als sensitivste, Weizen als moderat tolerante Spezies ausgewählt, um folgende Genexpressionsmerkmale durch eine Transkriptomanalyse untersuchen zu können:

1. Aufdeckung konservierter Mechanismen bei der Kälteakklimatisierung
2. Untersuchung der speziesspezifischen Genregulation
3. Beschreibung der genotypabhängigen Genexpression
4. Korrelation der phänotypischen Merkmale mit der Genexpression zur Auffindung von Kandidatengen für Frosttoleranz

Die zentrale Frage besteht darin, ob aus den Erkenntnissen der toleranten Spezies bzw. Genotypen Rückschlüsse für die Verbesserung der Toleranz der sensitiven Spezies bzw. der Genotypen gezogen werden können. Der Versuchsaufbau (Abb. 1.4) umfasst die phänotypische Erfassung der Frosttoleranz und Kälteakklimatisierungsexperimente unter kontrollierten Phytotronbedingungen. Während der Kälteakklimatisierung wurde Material für eine anschließende Transkriptomanalyse gewonnen.



Abbildung 1.4 – Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Die phänotypische Erfassung der Frosttoleranz (I) umfasste Frostexperimente durch Absenkung der Temperatur auf speziesspezifischen Werten. Nach einer 14-tägigen Regenerationsphase wurden die Frostschäden bewertet. Für die Transkriptomanalyse wurden je drei tolerante und sensitive Genotypen ausgewählt (II) und bei 2°C kälteakklimatisiert. Während der Kälteakklimatisierung wurde Sprossgewebe an vier verschiedenen Zeitpunkten entnommen (III) und RNA für die Transkriptomanalyse (IV) extrahiert. FT, Frosttoleranz; KA, Kälteakklimatisierung.

2 Material und Methoden

Falls nicht anders erwähnt, orientieren sich die beschreibenden molekularbiologischen Methoden nach Protokollen von Sambrook und Russel (2001).

2.1. Pflanzenmaterial

Gerste- (*Hordeum vulgare*) und Weizenlinien (*Triticum aestivum*) wurden vom Landwirtschaftlichen Forschungsinstitut in Martonvasar (Ungarn) zur Verfügung gestellt. CMS-Roggen-Inzuchtlinien (*Secale cereale*) wurden von der Firma KWS Lochow (Bergen) zur Verfügung gestellt. Die Tabelle 2.1 gibt eine Übersicht über die verwendeten Linien, bei denen es sich ausschließlich um Wintertypen handelt.

Tabelle 2.1 – Übersicht des verwendeten Pflanzenmaterials. Die laufenden Nummern sind Abkürzungen der Genotypen, die im Dokument verwendet werden.

	Roggen	Weizen	Gerste
1	LP1	7 Miranovszkaja (Russland)	13 Hundred (6-zeilig, USA)
2	LP2	8 Cheyenne izo (USA)	14 Barbinak (6-zeilig, Ukraine)
3	LP3	9 Uljanovka (Russland)	15 Kold (6-zeilig, USA)
4	LP4	10 G.K. Tiszatáj (Ungarn)	16 Baishishek (2-zeilig, Kasachstan)
5	LP5	11 Capelle Desprez (UK)	17 Rex (2-zeilig, Kroatien)
6	LP6	12 Martonvásári 8 (Ungarn)	18 Rodnik (2-zeilig, Kroatien)

2.2. Genotypen der verwendeten E. coli Bakterienstämme

One Shot® (TOP10) F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*

2.3. Plasmide

pGEM®-T (Easy) diente zur Klonierung von PCR-Produkten und wurde von der Firma PROMEGA (Madison, USA) bezogen. Das Plasmid kodiert eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion.

2.4. Kulturmedien

LB (Luria-Bertani) wurde von der Firma Carl Roth (Karlsruhe) bezogen. Für die Herstellung von Flüssigmedium wurden 20g Trockenmedium in 1L entionisiertes H₂O gelöst und autoklaviert (15min bei 121°C). Für Festmedium wurden zusätzlich 15g Bacto-Agar (BD, Hamburg) zugefügt. Nach dem Autoklavieren wurde das entsprechende Antibiotikum in das auf 50°C abgekühlte Medium zugegeben (*Amp* 50 µg/ml, *Sm* 50 µg/ml).

2.5. Chemikalien und Lösungen

Die verwendeten Chemikalien entsprachen dem analytischen Reinheitsgrad und wurden von folgenden Firmen erworben: Applichem (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Steinheim), Roth (Karlsruhe).

2.6. Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Ebersberg) bezogen und auf 100 pmol/µl eingestellt. Die Sequenzen befinden sich im Anhang A.7.

2.7. DNA-Größenstandard

DNA-Größenstandard der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) wurden für Agarosegelelektrophorese verwendet:

- pUC19/*MspI* (*HpaII*)
- FastRuler DNA Ladder, Low Range
- GeneRuler 1kb DNA Ladder

2.8. Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von DNA- und RNA-Proben wurden mit dem UV-VIS Spektralphotometer (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm gemäß Sambrook und Russel (2001) ermittelt. Ein Quotient von $\frac{ABS_{260}}{ABS_{280}} = 1,8$ indiziert eine reine dsDNA-Lösung.

2.9. Analytische Agarosegelelektrophorese

PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Je nach Länge der Amplicons wurden die verwendeten Agarosekonzentrationen für eine optimale Auftrennung variiert. Die Agarose wurde in 1x TBE durch Sieden gelöst und 5 µl 1% Ethidiumbromid (Fluka) pro 100 ml Agarosegel zugefügt. Die Elektrophorese wurde bei 100 V in 1x TBE durchgeführt.

10xTBE 0,89 M Tris, 0,89 M Borsäure und 0,02 M Na_2EDTA . Protokoll nach Sambrook und Russel (2001).

2.10. Kultivieren von *Escherichia coli*

Übernachtskulturen wurden in 5 mL LB-Medium inklusive Ampicillin (*Amp*, [50 µg/ml] oder Streptomycin (*Sm*, [50 µg/ml]) bei 37°C für 16 h im Schüttler (220 rpm) inkubiert.

2.10.1. Dauerkulturen

850 µl einer Übernachtskultur wurden mit 150 µl sterilem Glycerin (85%) vermischt und in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -80°C gelagert.

2.10.2. Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* TOP10

Je 1 ml einer Übernachtskultur (ÜN) von TOP10 mit *Sm* (50 µg/ml) wurde für die Inokulation von 2x100 mL LB-Medium (*Sm* 50 mg/ml) verwendet. Die Vorkulturen wurden bei 37°C für 3-4 h im Schüttler (220 rpm) inkubiert bis $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.4$ gemessen wurde. Die Kultur wurde bei 5400 xg und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 50 ml 100 mM CaCl_2 (eiskalten, steril) aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden für 10 min bei 5400 xg bei 4°C geerntet und das Pellet in 5 ml eiskaltem CaCl_2 resuspendiert und für 1 h auf Eis gestellt. Danach erfolgte die Zugabe von 872 µl sterilem Glycerin (86%) bis zu einer Endkonzentration von 15 %. Die Zellen wurden in Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -80°C gelagert.

2.10.3. Transformation und Blau-Weiß-Selektion

Hitzeschock-Transformation wurde mit chemisch-kompetenten Zellen TOP10 durchgeführt. Ein 50 µl-Aliquot kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und 50 ng Plasmid-DNA zugegeben. Der Ansatz wurde für 20 min auf Eis gestellt und danach einem Hitzeschock für 45-50 sec bei 42°C unterzogen. Die Zellen wurden für 2 min auf Eis gestellt und 950 µl LB-Medium zugegeben. Danach erfolgte die Ausbildung der *Amp* Resistenz für 90 min bei 37°C im Schüttler. Die Zellen wurden für 2 min bei 10000 xg zentrifugiert, resuspendiert und auf LB-Festmedium + *Amp* (50 µg/ml) ausgestrichen. Sollte eine Blau-Weiß Selektion durchgeführt werden, so wurden das LB Medium auf RT aufgewärmt und 50 µl X-GAL (c = 50 mg/ml) darauf gleichmäßig verteilt.

2.11. Genomische DNA Extraktion

Gefriergetrocknetes Blattmaterial (20-30 mg) wurde mit Hilfe einer Kugelmühle (Retsch MM300) für 30 sec bei 30 Hz homogenisiert und mit 700 µl 65°C heißem Extraktionspuffer (Doyle und Doyle, 1987) vermischt und für 30-45 min bei 65°C inkubiert. Danach wurden 700 µl Chloroform:Isoamylalkohol (CIA 24:1) zugegeben. Das Homogenisat wurde bei 8000 rpm in einer Tischzentrifuge für 15 min zentrifugiert und der Überstand (ca. 700 µl) in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 700 µl CIA versetzt und bei 13000 rpm für 15 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 85 µl einer Lösung aus Natriumacetat (3 M) und Ammoniumacetat (10 M) im Verhältnis 6:5 und 500 µl Isopropanol (-20°C) zugesetzt und gemischt. Das Präzipitat wurde bei 13000 rpm für 30 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol (-20°C) gewaschen und für 20 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und mit 200 µl TE-Puffer (Tris-HCl pH 8 10 mM, EDTA pH 8 1 mM) und 4 µl RNase (10 mg/ml) und für 30 min bei 37°C inkubiert und das Pellet ÜN bei 4°C gelöst. Die genomische DNA wurde bei 4°C gelagert.

Extraktionspuffer 1,4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 1% Na₂S₂O₅, ad 500 ml ddH₂O, autoklavieren. Vor Gebrauch folgende Lösungen dazugegeben: 2% CTAB, 0,2% β-Mercaptoethanol.

2.12. Genotypisierung

Um den Habitus (Sommer/Winter) der Weizen- und Gerstenlinien zu bestätigen, wurde eine Genotypisierung des Pflanzenmaterials durchgeführt. Die Weizenlinien wurden mit den Primer-Kombinationen VA1-R und 361W-F bzw. 361S-F (Sherman *et al.*, 2004) durchgeführt. Die PCR-Konditionen sind in Abschnitt 2.18.3 beschrieben. Die Genotypisierung wurde nach folgendem Programm durchgeführt (N. Pecchioni, pers. Mitteilung). Als Primer diente HvZCCT-S und HvZCCT-AS.

1.5 µl	10x Puffer (Qiagen)			
0.6 µl	sense Primer (10 pmol)			
0.6 µl	antisense Primer (10 pmol)			
0.4 µl	dNTP's 10 mM (Fermentas)			
0.2 µl	HotStarTaq DNA Polymerase 5 u/µl			
3 µl	Q-Solution 5x (Qiagen)			
0.9 µl	MgCl ₂ (25 mM)			
7.3 µl	ddH ₂ O			
0.5 µl	gDNA (100 ng)			
		15 min	95°C	Zyklen
		30 sec	94°C	
		30 sec	55°C	40x
		1 min	72°C	
		7 min	72°C	
		∞	4°C	

2.13. Mikrosatelliten Analyse

Die Konzentration der gDNA wurde auf 150 ng/µl eingestellt. Die PCR-Reaktionen wurden in 15 Multiplex-Mix-Reaktion á 3 Primerpaaren durchgeführt. Die Primer (Qiagen) waren fluoreszenzmarkiert mit FAM, TAMRA oder HEX.

		15 min	96°C	Zyklen
2.5 µl	Multiplex-Mix (Qiagen)	1 min	94°C	
0.5 µl	Primer Mix (konz. X)	30 sec	60°C	40x
1 µl	ddH ₂ O	15 sec	72°C	
1 µl	gDNA (150 ng)	10 min	72°C	
		∞	12°C	

Vom Reaktionsansatz wurden 5 µl mit 150 µl ddH₂O verdünnt und davon 3 µl in PCR-Platten (ABgene PCR-Plates, Thermo) überführt. Die DNA wurden mit 7 µl eines Mix aus MegaBACE Loading Solution (GE Healthcare) und MegaBACE ET400R Standard (GE Healthcare) (für eine 96er Platte 700 µl Loading Solution + 20 µl Standard) versetzt. Die Mikrosatelliten wurden mit dem MegaBACE (GE Healthcare) Kapillarsequenzierer aufgetrennt.

2.14. RNA Extraktion

Um Kontaminationen durch RNasen vorzubeugen wurden alle Arbeiten, Lösungen etc. mit DEPC (Fluka) behandelten H₂O (0.2%) durchgeführt. Falls möglich wurden Laborutensilien durch Hitze bei 200°C für 4 h sterilisiert. Plastikware wurde in einer Lösung von 0,1 M NaOH und 0,1% SDS für mindestens 30 min inkubiert und mit destillierten ddH₂O abgespült.

Für die RNA-Extraktion aus 200-300 mg Sproßgewebe wurde das Reagenz TRIzol® (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Das Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff homogenisiert und nach Herstellerangaben verarbeitet. Abweichend vom Protokoll, wurde die Phasentrennung mit Chloroform zweimal durchgeführt, um die Reinheit der RNA-Präparation zu erhöhen. Die RNA-Pellets wurden in 100 µl 0.2% DEPC-H₂O für 5-10 min bei 65°C gelöst.

2.15. Analytische, denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Für die Überprüfung der Qualität der RNA Präparation wurde eine denaturierende Elektrophorese durchgeführt. Für die Herstellung eines 5 ml Agarosegels (1%) wurden 0.5 g Agarose (Invitrogen) in 36 ml 0.2% DEPC-H₂O durch Erhitzen gelöst und 5 ml 10xMOPS und 9 ml Formaldehyd zugegeben. Zu den RNA-Proben (2 µg) wurden 15 µl Ladepuffer zugegeben und für 15 min bei 65°C denaturiert. Die Elektrophorese wurde bei 50 V in 1xMOPS Puffer durchgeführt. Nach 10 min wurde der obere Ethidiumbromid-haltige Probenauftragsbereich entfernt und das Gel für weitere 2 h bei 50 V aufgetrennt und dokumentiert (Herolab, Wiesloch).

Auftragspuffer 750 µl deionisiertes Formamid, 150 µl 10x MOPS, 250 µl Formaldehyd, 6 µl 10 mg/ml Ethidiumbromid in DEPC-H₂O, 160 µl 86% Glycerin, 122 µl Bromophenol Blau (0,25%) in DEPC-H₂O

10xMOPS 41,85 g MOPS (MW = 209,27) und 6,80 g Natriumacetat (MW = 136,08) in 800 ml DEPC-H₂O wurden vollständig gelöst. Dazu wurden dann 20 ml 0,5 M Na₂EDTA (pH 8.0) zugefügt und mit 10 M NaOH auf pH 7.0 eingestellt und das Volumen auf 1 L mit DEPC-H₂O aufgefüllt. Die Stammlösung wurde bei 4°C in Dunkelheit gelagert.

2.16. Herstellung von cDNA Sonden für Hybridisierungen

2.16.1. Äquillibrierung der Dynabeads

mRNA wurde mittels magnetischer Dynabeads (DynaL Biotech, Oslo) mit kovalent gebundenen Oligo(dT)₂₅ isoliert. Dazu wurden 100 µl Dynabeads in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf DNA/RNA Low Binding Tubes) überführt und nach magnetischer Separation (Invitrogen) für 30 sec der Überstand entfernt. Die Dynabeads wurden mit 50 µl Bindepuffer gewaschen und aufgenommen.

2.16.2. mRNA-Isolation

Die mRNA-Isolation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (DynaL Biotech, Oslo). Ein Gemisch von RNA dreier biologischer Replikate (3x12 µg in 50 µl) wurde für 2 min bei 65°C denaturiert und zu den äquillibrierten Dynabeads zugefügt, kurz auf Eis gestellt und für 5 min bei RT rotiert (DynaL Sample Mixer). Der Überstand wurde entfernt und zweimal mit 100 µl Waschpuffer B gewaschen. Danach folgten zwei weitere Waschschrirte mit 1xRT-Puffer.

5xRT Puffer (100 mL) Eine Lösung aus 250 mM Tris-HCl, 250 mM KCl, 50 mM MgCl₃ x 6H₂O wurde auf pH 8,3 mit HCl eingestellt und autoklaviert. Für die Herstellung von 1x RT-Puffer wurden RNasecure Reagent (Ambion, St. Woodward, USA) der Lösung zugesetzt und für 10 min bei 60°C erhitzt.

2.16.3. Erststrangsynthese von cDNA

Die Erststrangsynthese wurde laut Herstellerangaben bewerkstelligt (SuperScript II, Invitrogen) Die an den Oligo(dT)₂₅ hybridisierte mRNA wurde mit der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und somit kovalent an die Dynabeads synthetisiert. Die Dynabeads wurden mit folgendem Reaktionsgemisch resuspendiert:

35,2 µl	DEPC-H ₂ O
10 µl	5x First Strand Puffer (Invitrogen)
1,0 µl	100 mM DTT (Invitrogen)
2,5 µl	10 mM dNTP's (Fermentas)
1,3 µl	RNaseOUT 40 U/µl (Invitrogen)

Das Reaktionsgemisch wurde für 2 min bei 42°C inkubiert, 1 µl SuperScript II RTase zugefügt und für 1 h bei 42°C inkubiert. Die Dynabeads wurden mit 0.05% SDS zweimal gewaschen. Um die mRNA vom Erstrang zu entfernen, wurden die Beads zweimal mit 50 µl 2 mM EDTA (pH 8,0) resuspendiert, bei 95°C denaturiert und der Überstand entfernt. Danach erfolgte zweimaliges Waschen mit 250 µl DEPC-H₂O.

2.16.4. Radioaktive Markierung von cDNA

Zur radioaktiven Markierung der cDNA-Sonden wurde das MegaPrime (Amersham GE Healthcare) System laut Herstellerangaben genutzt. Folgender Ansatz wurde zu den Dynabeads zugefügt. Die Markierungsreaktion wurde für 30 min bei 37°C durchgeführt:

28,0 µl	dd H ₂ O (7x 196 µl)
5,0 µl	Random-Nonamer Primer Mix (Amersham) (7x 35 µl)
10,0 µl	Labelling Puffer (dATP, dGTP, dTTP)
5,0 µl	³³ P-α-dCTP (10 mCi/ml) (Hartmann Analytik)
2,0 µl	Klenow Fragment 1 U/µl

2.16.5. cDNA Sondenpräparation

Der Reaktionsüberstand mit nicht eingebauten Nukleotiden wurde entfernt und die Sonden wurden zweimal in 50 µl 2 mM EDTA (pH 8,0) bei 95°C von der Erststrang-cDNA eluiert und in einem neuen Reaktionsgefäß vereinigt. Für die vollständige Entfernung der Dynabeads aus dem Überstand wurden Anapore-Filter mit 0,2 µm Ausschlussvolumen (Whatman) verwendet. Die Filter wurden mit 2 mM EDTA (pH 8,0) äquillibriert und für 2 min bei 10000 xg zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Überstand auf die Filter transferiert und bei 10000 xg für 4 min zentrifugiert. Zu vollständigen Eluierung der Sonden wurden 50 µl 2 mM EDTA (pH 8,0) dem Filter zugefügt und wie zuvor beschrieben zentrifugiert. Der Einbau der Nukleotide wurde mittels des Verhältnisses von nicht eingebauten Nukleotiden im Überstand zu den eingebauten Nukleotiden in der cDNA durch einen Geigerzähler abgeschätzt.

2.17. cDNA-Makroarray Hybridisierung

2.17.1. cDNA-Makroarrays

Die für die cDNA-Array benutzten Gerste-cDNA-Banken sind unter <http://pgrc.ipk-gatersleben.de/cr-est/index.php> ersichtlich. Makroarrays wurden von der Firma Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD, Berlin) bezogen. Weitere Informationen sind bei Sreenivasulu *et al.* (2006) dokumentiert. Spotting-Listen und Klon-IDs des Arrays sind unter http://pgrc-35.ipk-gatersleben.de/pls/htmlldb_pgrc/f?p=138:1:3487298726502413 einzusehen.

2.17.2. Vorhybridisierung der Membran

Der modifizierte Hybridisierungspuffer nach Church und Gilbert (1984) wurde im Wasserbad bei 65°C erhitzt und 10 ml davon in die Hybridisierungsröhre transferiert. Um unspezifische Hybridisierungen zu unterbinden wurden nach 30 min 100 µl Heringsperma 10 mg/ml (Stratagene) zugefügt, das zuvor bei 95°C für 2 min denaturiert wurde und für 5 min auf Eis inkubiert wurde. Die Membranen wurden für 4 h unter Rotation (7 rpm) bei 65°C vorhybridisiert.

Hybridisierungspuffer bestehend aus 0,5 M Na-Phosphatpuffer (pH 7,0), 2 mM EDTA (pH 8,0), 1% BSA und 7% SDS wurde über Nacht vermischt und dann auf 37°C erwärmt. Der Puffer wurde mit einem Faltenfilter (Schleicher&Schuell, Dassel) gefiltert und bei -20°C gelagert.

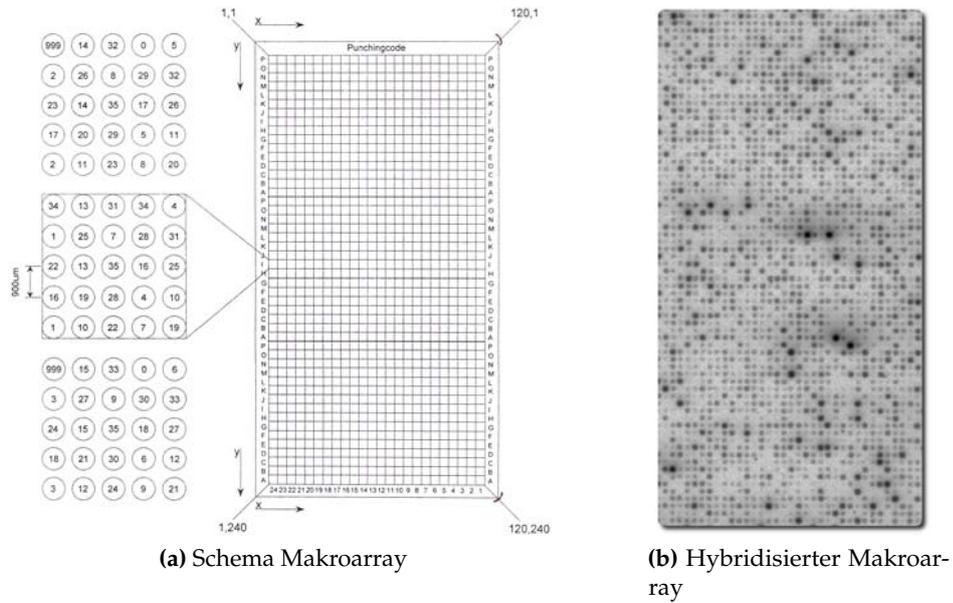


Abbildung 2.1 – (a) Spotting-Muster der verwendeten Nylon-Makroarrays (11 x 22 cm). Der Array ist in drei Subarrays untergliedert und die Duplikate befinden sich in einem 5x5 Grid. **(b)** Ausschnitt eines exponierten Arrays nach Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden.

2.17.3. Hybridisierung der markierten cDNA Sonden

Der Vorhybridisierungspuffer wurde durch 7 ml frischen Hybridisierungspuffer (65°C) ersetzt und für 10 min im Hybridisierungssofen rotiert. Es folgte die Zugabe von zuvor denaturiertem Heringssperma (s. vorheriger Abschnitt). Die cDNA-Sonden wurden bei 95°C für 3 min und für 5 min auf Eis denaturiert und in die Hybridisierungsröhren transferiert. Die Hybridisierung erfolgte für 20 h bei 65°C und 7 rpm.

2.17.4. Waschen und Exposition

Sonden, die aus Gerste-cDNA hergestellt wurden, wurden zweimal mit 0,1% SDS und 0,1x SCC für 20 min darin gewaschen. Heterologe Weizen- und Roggensonden wurden einmal mit 0,1% SDS und 1xSSC für 20 min und ein weiteres Mal mit 0,1% SDS und 0,5x SCC für 20 min gewaschen. Alle Waschstschritte wurden bei 65°C durchgeführt. Die Membranen wurden auf Filterpapier (Whatman, Maidstone, UK), das zuvor mit der Waschlösung angefeuchtet wurde, gelegt und mit Frischhaltefolie eingeschlagen und auf Phosphor-Imager-Screens (23x40 cm, Fuji Film, Düsseldorf) für 48 h in einer Kassette (Fuji Film, Düsseldorf) exponiert.

2.17.5. Entfernen von cDNA-Sonden

Um cDNA-Sonden von gebrauchten Makroarrays zu entfernen, wurde eine Lösung aus 0,1x SSC und 0,1% SDS zum Sieden gebracht und darin die Membranen 45 min gewaschen. Die Lösung wurde durch eine 0,4M NaOH ersetzt und für 30 min bei 45°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Membranen mit einer Neutralisierungslösung

(0,1x SSC; 0,1% SDS; 0,2M Tris pH 7,5) für 45 min bei RT behandelt. Die Membranen wurde ständig feucht gehalten und bei -20°C gelagert.

2.17.6. Signaldetektion

Die Signale wurden mit dem Phosphor-Imager-System FLA-3000 (Fuji Film) detektiert mit folgenden Parametern: IP reading, 16 Bits/Pixel, 50 µm Pixelgröße. Die Bildpunkte wurden mit dem Programm Array Vision 8.0 (GE Healthcare) in quantitative densitometrische Werte mit folgenden Parametern transformiert: Signal: Radio-Isotopic; Type: Expression; Measure Type: Density 1 x 3; Background: Selected Spot (3-3).

2.18. Quantitative Real-Time PCR

Zur Evaluierung der Makroarray-Daten wurde die sensitivere Methode der qRT-PCR angewendet. Sequenzanalyse und Design von genspezifischen Primern wurden mit dem Programm VectorNTI (Invitrogen) durchgeführt. Das Amplifikat der Primer sollte einen Größenunterschied bei cDNA und gDNA aufweisen um die Präsenz eines Introns zu detektieren. Damit konnten eventuelle Kontaminationen der RNA mit genomischer DNA nachgewiesen werden. Die Primer wurden i.d.R. basierend auf der Sequenz eines EST-Contigs aus HarvEST-Barley (Assembly 35) abgeleitet. Exon-Intron Grenzen wurden mittels des Homologen Gens der genomischen Sequenz aus *Oryza sativa* und dem Programm „Spidey“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Ostell/Spidey/>) bestimmt.

2.18.1. DNase Verdau von RNA

Um kontaminierende gDNA aus RNA Präparationen zu entfernen, wurde ein DNase Verdau mit dem DNA-freeTM Kit (Ambion) mit 10 µg RNA nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.18.2. Reverse-Transkription PCR

cDNA wurde aus der zuvor DNaseI behandelten RNA (2 µg) synthetisiert. Dazu wurde das iScriptTM Kit (BioRad) nach Herstellerangaben benutzt. Für die qRT-PCR wurden die cDNA 1:5 mit ddH₂O verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.18.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Volumen der PCR-Ansätze betrug im Allgemeinen 15 µl und das Template hatte eine Stoffmenge von 100 ng. Die Länge der Oligonucleotide betrug etwa 18-28 Nukleotide mit ähnlichen Schmelztemperaturen (T_m). Die Anlagerungstemperatur betrug zwischen 55°C und 65°C. Die Reaktion wurden in Thermocyclern der Firma SensoQuest (Labcyler, Göttingen) durchgeführt:

2. MATERIAL UND METHODEN

1.5 µl	10x Puffer (Qiagen)			
0.3 µl	sense Primer (10 pmol)	15 min	95°C	Zyklen
0.3 µl	antisense Primer (10 pmol)	30 sec	94°C	
0.3 µl	dNTP's 10 mM (Fermentas)	30 sec	55-65°C	35x
0.15 µl	HotStarTaq DNA Polymerase	1 min	72°C	
	5 u/µl (Qiagen)	10 min	72°C	
11.45	ddH ₂ O	∞	4°C	
1 µl	cDNA/gDNA (100 ng)			

2.18.4. Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten

Um die Sequenz zu ermitteln, wurden die PCR-Fragmente in das Plasmid pGEM®-T-Easy kloniert und in *E. coli* TOP10 transformiert. Nach Blau-Weiß-Selektion (Abschnitt 2.10.3) wurden 5 Kolonien in je 50 µl TE gelöst. Davon wurden 1 µl abgenommen und TempliPhi-DNA (Amersham Biosciences, Little Chalfont UK) nach Standard-Protokoll synthetisiert und mit den Primer M13rev/uni sequenziert (ABI DNA-Analyzer 3730XL). Folgender Ansatz wurde für 4 h bei 25°C und ÜN 4°C im Thermoblock inkubiert:

5 µl	2x Puffer (PROMEGA)
0,5 µl	pGEM-T-Easy (50 ng/µl)
3,5 µl	Amplicon
1 µl	T4 DNA Ligase (3 Weiss units/µl)

2.18.5. qRT-PCR

Reaktionsansätze wurden in „Optical ABI-PRISM“ 384-Reaktionsplatten (Applied Biosystems) übertragen und mit „MicroAmp Optical Adhesive Film“ (Applied Biosystems) versiegelt. Zur absoluten Quantifizierung benötigte Standardkurve, bestehend aus sechs Ansätzen mit 1:5-fachen Verdünnungsschritten (1:1 - 1:3, $2 \cdot 10^{-4}$), wurden cDNAs aus allen vier Zeitpunkten eines Genotyps vereinigt. Die qRT-PCR wurde mit dem Applied Biosystems 7900HT System (Absolute Quantifizierung mit Standardkurve) und dem QuantiTect-Kit (Qiagen) mit folgendem Ansatz durchgeführt:

5 µl	2x SYBR Green PCR Master Mix	10 min	95°C	Zyklen
1 µl	sense Primer (1 pmol)	15 sec	94°C	
1 µl	antisense Primer (1 pmol)	30 sec	55-59°C	40x
2 µl	ddH ₂ O	30 sec	72°C	
1 µl	cDNA	∞	RT	

Die Datenaufzeichnung erfolgte bei zwei Temperaturen: bei der Anlagerungstemperatur der Primer und bei 72°C. Nachdem letzten Zyklus wurden die Daten zwischen 60-95°C und bei 95°C gesammelt. Die Daten wurde mit der Methode von Vandesompele *et al.* (2002) normalisiert. Die robuste und genaue Methode verwendet das geometrische Mittel von mehreren Haushaltsgenen als Normalisierungsfaktor.

2.19. Kältesimulation im Phytotron

Die hier beschriebenen Experimente wurden in Klimakammern des Phytotron ARI Martonvásár (Controlled Environments Ltd., Kanada) durchgeführt. Die Phänotypisierung und die Gewinnung von RNA für die Makroarray-Hybridisierung wurden in zwei verschiedenen Experimenten durchgeführt. Für beiden Arten von Experimenten wurde das Saatgut auf feuchtem Filterpapier in Petrischalen gekeimt. Die Samen wurden für 12 h in Wasser gequollen und für 1 Tag bei RT, 1 Tag bei 4°C und Dunkelheit und schließlich 2 Tage bei RT gekeimt.

2.19.1. Frostsimulation für die Phänotypisierung

Zur Untersuchung der Frosttoleranz (Abb. 1.4) wurden 5 Keimlinge in einem randomisierten Aussaatmuster in 5 Holzboxen und Pflanzenerde angezogen. Es erfolgte danach eine Wachstumsperiode von 14 d. Zur Kälteakklimatisierung wurde das Programm „FDA“ (Tischner *et al.*, 1997) verwendet. Der Temperaturverlauf der Frostsimulation sieht eine stufenweise Absenkung der Temperatur um 1°C pro Stunde auf Unternulltemperaturen vor:

- Roggen -19°C und -21°C für 12 h
- Weizen -12°C und -15°C für 12 h
- Gerste - 10°C und -13°C für 12 h

Die Temperatur wurde stündlich von den spezifischen Unternulltemperatur um 1°C bis zur einer finalen Temperatur von +1°C erhöht (Sutka, 1981; Kocsy *et al.*, 2010). Der Spross wurde bis auf 1 cm zurück geschnitten und für 14 d bei 17/16°C, 16 h Photoperiode, 70 bzw. 75% (Tag/Nacht) relativer Luftfeuchtigkeit und einer PPFd von 270 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ kultiviert. Die Regenerationsfähigkeit wurde in einem 5-gliedrigen Bewertungsschema gemessen (0 = tot, 5 = unbeschädigt) und statistisch mittels ANOVA ausgewertet. Die Pflanzen wurden zu zwei Zeitpunkten bewertet: das 1. Mal 14 Tage nach der Frostbehandlung, das 2. Mal nach weiteren 1-2 Wochen, um stark frostgeschädigte Pflanzen nochmals zu bewerten.

2.19.2. Kälteakklimatisierung für RNA-Gewinnung

Die Keimlinge wurden in hydroponischer Kultur auf modifiziertem 0,5x Hoagland-Medium (Galiba *et al.*, 2001) in Klimakammern für 10 Tage angezogen. Die Photoperiode betrug 16 h pro Tag mit Tag/Nacht-Temperaturen von 18°C/15°C und 75% relativer Luftfeuchtigkeit und einer PPFd von 270 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{min}^{-1}$. Danach folgte die Kälteakklimatisierung bei 2°C für 3 biologische Replikate. Die Probenentnahme (300 mg Blatt und Spross) wurde in der Mitte der Photoperiode durchgeführt.

0.5x Hoagland-Medium: 500 mL Makronährsalze (1 L: 5.055 g KNO₃, 11.81 g Ca(NO₃)₂ × 4H₂O, 4.932 g MgSO₄ × 7H₂O, 1.361 g KH₂PO₄), 1.25 mL Mikronährsalze (100 mL: 286 mg H₃BO₃, 362 mg MnCl₂ × 4H₂O, 22 mg ZnSO₄ × 7H₂O, 12 mg Na₂MoO₄ × 2H₂O, 8 mg CuSO₄ × 5H₂O), 100 mL Fe-EDTA (1 L: 4g C₁₀H₁₂N₂NaFeO₈)

2.20. Bioinformatische Methoden

2.20.1. Sequenzanalysen

Für allgemeine Arbeiten mit Sequenzen wie z.B. Primerdesign oder Sequenzalignments wurde die Software Vector NTI Version 11 benutzt (Invitrogen). Der BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990) wurde für den Abgleich von Sequenzen genutzt. Die cDNA-Bezeichnungen (cDNA ID) und -Sequenzen wurden aus der CROP-EST Datenbank (CR-EST, <http://pgrc.ipk-gatersleben.de/cr-est/>) exportiert.

2.20.2. Mikrosatelliten Analyse

Die Mikrosatellitendatensätze wurden mit dem Programm „Genetic Profiler Software Suite v2.2“ (GE Healthcare) verarbeitet. Die Analyse wurde mit dem Programm „PowerMarker v3.25“ durchgeführt.

2.20.3. Verarbeitung und Normalisierung der Makroarray-Signale

Falls nicht anders erwähnt wurde die Datenverarbeitung mit der Statistikumgebung „R“ Version 2.11.1 (R Development Core Team, 2011) durchgeführt (<http://www.r-project.org/>). Danach wurden die Hintergrundintensitäten von den Signalintensitäten subtrahiert und ggf. negative Werte durch das Minimum der Hybridisierung ersetzt. Die Daten wurden mit dem Bioconductor-Paket „Limma“ (<http://www.bioconductor.org/>) nach der Quantilmethode (Bolstad *et al.*, 2003) normalisiert. Quantilnormalisierung gilt als eine sehr robuste Methode, bei der die Quantile gleiche Werte besitzen und die Daten eine identische Verteilung aufweisen ohne dabei die Daten stark zu verzerren. Bei der Quantilnormalisierung geht man wie folgt vor:

1. Die Werte jeder Spalte der Expressionsmatrix („Arrays“) werden sortiert
2. Aus den sortierten Werten wird der Mittelwert jeder Matrixreihe („Gene“) gebildet
3. Der ursprüngliche Wert wird durch den zuvor berechneten Mittelwert ersetzt.

Um die Effekte der Normalisierung zu untersuchen wurden Konkordanzkoeffizienten nach folgender Formel berechnet:

$$\rho_{12} = \frac{2S_{12}}{S_1^2 + S_2^2 + (\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2)^2} \quad (2.1)$$

Wobei Y_{j1} und Y_{j2} die Spalten von m Expressionswerte von zwei Arrays sind. Das Symbol S bezeichnet hier die Kovarianz der Expressionswerte eines Arrays. Konkordanzkoeffizienten können die Übereinstimmung von zwei Arrays quantifizieren (Lin, 1989). Als Qualitätskriterium mussten die Signalintensitäten 2-fach über den Hintergrundsignalintensitäten liegen und ein Doppelspot-Ratio von kleiner 2 aufweisen.

2.20.4. MapMan Annotation

Um Expressionsdaten anhand biochemischer Stoffwechselwege zu visualisieren, wurde die Annotationsanwendung „Mercator“ (<http://mapman.gabipd.org/web/guest/>)

mercator) genutzt. Dabei handelt es sich um ein Analysewerkzeug mit dem Sequenzdaten in funktionelle Kategorien klassifiziert und Expressionsdaten der zugrunde liegenden Gene mit der MapMan-Anwendung (Version 2.5, <http://mapman.gabipd.org/web/guest/mapman>) visualisiert werden können (Thimm *et al.*, 2004). Um möglichst genaue Sequenzinformationen zu erhalten, wurden die entsprechenden Gersensequenzen aus der EST-Datenbank „HarvEST:Barley“ (Version 1.68, Assembly 35, <http://harvest.ucr.edu/>) genutzt. Folgende Parameter wurden für die Annotation genutzt: TAIR BLAST („release 8“), PPAP („swiss-prot“), KOG („clusters of orthologous eucaryotic genes database“), IPR („interpro scan“), MULTIPLE („allow multiple bin assignments“), ANNOTATE („append database annotation to mapping“), IS_DNA („sequence file contains DNA sequence“), BLAST-SCORE > 80.

2.20.5. Identifizierung von Hydrophilinen in silico

Die Contig-Sequenzen der cDNA-Proben wurden aus HarvEST:Barley (s.o.) exportiert und mit dem Programm ESTScan (Version 2.1) die kodierenden Sequenzen (CDS) identifiziert und in Proteinsequenzen translatiert (Iseli *et al.*, 1999). Als Vorgabe für die CDS-Identifikation wurden die Matrix von *Orzya sativa* genutzt. Mit Hilfe des R-Paket `seqinr` wurden potentielle Hydrophiline identifiziert.

2.21. Statistische Methoden

2.21.1. Differentielle Genexpression

Die differentielle Expression von Genen wurde mit dem „Induktions-Repressions-Faktor“ (*expression fold-change* nachfolgend als FC abgekürzt) nach der Formel $\log_2 \frac{I_{t1-21}}{I_{t0}}$ berechnet. I_t steht in für die Expressionswerte der verschiedenen Zeitpunkte. Der FC wurde relativ zum Zeitpunkt Tag 0 für Tag 1, Tag 7 und Tag 21 berechnet. Dabei musste das Signal an mindestens einem Zeitpunkt über das 2-fache des Hintergrundes liegen und ein Doppelspot-Ratio kleiner 2 aufweisen.

2.21.2. Verifikation mittels qRT-PCR

Bei der Korrelation der qRT-PCR wurde der arithmetische Mittelwert der drei biologischen Replikate ermittelt und gegen die phänotypischen Daten korreliert. Für die Berechnung der Korrelationskoeffizienten nach Spearman wurde die R-Funktion `cor.test()` mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0.05$ berechnet. Die Daten wurden ggf. nach der Formel $x = \frac{x - \bar{x}}{sd(x)}$ standardisiert.

2.21.3. Anreicherungsanalysen

Anreicherungsanalysen wurden mit dem Exakten Test nach Fisher, implementiert in der Statistikumgebung „R“ (R Development Core Team, 2011) durch die Funktion `fisher.test()`, mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0.05$ berechnet. Als Ausgangspunkt wird eine Vierfeldertafel (Kontingenztafel) mit den beobachteten Häufigkeiten aufgestellt. Die Analyse wird in Anlehnung an Hannah *et al.* (2005, 2006) durchgeführt.

Die Vierfeldertafel (Tab. 2.2) wird wie in Poree *et al.* (2006) beschrieben aufgestellt und enthält die Anzahl von Einträgen, die den FC-Schwellenwert von $2x$ in einer bestimmten funktionellen Kategorie übertreten, und die Anzahl der gesamten Einträge in dieser Kategorie. Der zweite Teil der Vierfeldertafel besteht aus den Objekten der absoluten Anzahl an Einträgen, die den Schwellenwert übertreten und der absoluten Anzahl von Einträgen auf dem Array. Der große Umfang der Analyse macht die Korrektur der p -Werte wegen der Problematik des multiplen Testen nach der FDR-Methode nötig (R-Funktion `p.adjust()`) (Benjamini und Hochberg, 1995).

Tabelle 2.2 – Vierfeldertafel zur Anordnung der Häufigkeitsdaten

	differentiell ($2x$)	nicht-differentiell	total
in MapMan-BIN	n_{11}	$n_{12} = n_{1Z} - n_{11}$	n_{1Z}
nicht in MapMan-BIN	$n_{21} = n_{S1} - n_{11}$	$n_{22} = n_{S2} - n_{1Z} + n_{11}$	n_{2Z}
total	$n_{S1} = n_1$	$n_{S2} = n_2$	$n_1 + n_2 = n$

2.21.3.1. Genotypspezifische Anreicherungsanalyse

Die Stringenz der Filterkriterien sind identisch zu den vorherigen Analysen. Insgesamt umfasst die Analyse 12 Zeitpunkte und -kombinationen für induzierte und reprimierte Gene, 18 Genotypen und 34 funktionellen Kategorien. Die FDR-korrigierten p -Werte sind in tabellarischer Form im Anhang enthalten (Tabellen A.9-A.42).

2.21.3.2. Speziesspezifische Anreicherungsanalyse

Hinsichtlich der funktionellen Kategorien unterscheidet sich jedoch diese Analyse im Umfang von der o.g., da zusätzlich alle subBINs auf Anreicherung getestet werden. Die „Heatmaps“ wurden mittels dem HOPACH-Algorithmus (van der Laan und Pollard, 2003) generiert und zeigen die normalisierten Expressionswerte als Farbintensitäten. Aufgrund der Übersichtlichkeit wurden nur Gene mit einem Gen-Score ≥ 4 in das Clustering mit aufgenommen. Für die Berechnung der Gen-Scores erhält ein Gen pro Genotyp in einer bestimmten Zeitklasse die Punktzahl +1 oder -1 für Induktion bzw. Repression. Aufgrund der fehlenden statistischen Sicherheit wird ein Gen als kälterereguliert bezeichnet, wenn es eine Punktzahl von mindestens ± 3 aufweist. Dieser Schwellenwert ist aus dem Grund gewählt, da Expressionsmuster zwischen toleranten und sensitiven Genotypen (je 3) abweichen können.

2.21.4. Korrelations- und Hauptkomponentenanalyse

Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman wurden mit der R-Funktion `cor.test()` und mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0.05$ berechnet. Signifikante Korrelationen wurden dazu genutzt, um eine Hauptkomponentenanalyse mit der R-Funktion `prcomp()` durchzuführen. Zur Beurteilung der Gruppen-Separabilität wurde ein in R geschriebenes „Permutationskript“ programmiert, das alle möglichen Separabilitäts-Scores nach der Formel

$$Score = \left| \sum_{j=1}^3 \log a_j - \sum_{j=1}^3 \log b_j \right|$$

berechnet, wobei a_i bzw b_i für die permutierten Expressionswerte stehen. Falls der höchstmögliche Score bei der ursprünglichen experimentell bestimmten Frosttoleranzgruppe auftritt, indiziert er die bestmögliche Separabilität zwischen toleranten und sensitiven Gruppen. Für die Hauptkomponentenanalyse wurde der R-Befehl `prcomp()` benutzt. Der Datensatz basiert auf den signifikanten Korrelationen der differentiell exprimierten Genen an den Tagen 1, 7 und 21. Die Expressionsdaten wurden genbasierend standardisiert (Mittelwert = 0, Varianz = 1) um auch schwächer exprimierte Gene im Biplot identifizieren zu können. Die Standardisierung hat jedoch den Effekt, dass die Varianz der Daten beachtlich reduziert wird.

3 Ergebnisse

Die für Regulation der Kälteakklimatisierung zugrunde liegenden polygenen Vererbungs-faktoren – mit Ausnahme weniger Komponenten – sind weitgehend unbekannt. Der hier gewählte Ansatz einer vergleichenden Transkriptomanalyse während der Kälteakklimatisierung von Roggen, Weizen und Gerste mit toleranten und anfälligen Genotypen stellt ein „Screening“ für die Identifizierung von Genen dar, die für eine unterschiedliche Ausprägung der Frosttoleranz verantwortlich sind.

3.1. Phänotypische Erfassung der Frosttoleranz

Die Überprüfung der Frosttoleranz wurde im Phytotron des „Agricultural Research Institute“ (ARI) Martonvásár (Ungarn) unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt. Die Frosttoleranz wurde unter möglichst kontrollierten Bedingungen bestimmt, indem die Regenerationsfähigkeit des meristematischen Gewebes der Pflanzen in Betracht gezogen wurde. Um die Regenerationsfähigkeit zu quantifizieren, wurde eine Punktzahlskala von 0 bis 5 (tot - unbeschädigt) verwendet (Abb. 3.1 und Tab. 3.1). Die Experimente wurden bei zwei artspezifischen Unternulltemperaturen durchgeführt. Für die Weizen- und Gerstekultivare waren bereits Langzeiterfahrungen (Karsai *et al.*, 2001; Mészáros *et al.*, 2007) vorhanden, so dass die ausgewählten Genotypen sich eindeutig in sensitive und tolerante Gruppen unterteilen lassen. Die Vorauswahl der Roggeninzuchtlinien basierte auf ungenaueren Feldversuchsdaten. Zudem sind Inzuchtlinien weniger robust als Hybride, so dass die gewählten Temperaturen für eine genauere Differenzierung nicht optimal waren.



(a) Vor der Stressbehandlung



(b) Roggen mit Frostscha

Abbildung 3.1 – Experimente zur Evaluierung der Frosttoleranz unter kontrollierten Phytotronbedingungen. **(a)** Pflanzen wurden in hölzernen Boxen und Pflanzenerde kultiviert und mit spezifischen Unternulltemperaturen behandelt. **(b)** Roggen mit Frostscha

Tabelle 3.1 – Auswertung der Phänotypisierung der Frosttoleranz in jeweils sechs ausgewählten Roggen-, Weizen- und Gerstelinien (arithmetische Mittelwerte der Frosttoleranz-Punktzahlen). Die Experimente wurden bei zwei verschiedenen Unternulltemperaturen durchgeführt. Die Regenerationsfähigkeit wurde auf einer Skala von 0 (tot) bis 5 (unbeschädigt) bewertet.

Roggen		-19°C	-21°C
1	LP1	1,22	0,98
2	LP2	0,93	0,54
3	LP3	0,78	0,17
4	LP4	0,75	0,51
5	LP5	0,58	0,46
6	LP6	1,24	0,24
Weizen		-12°C	-15°C
7	Miranovszkaja 808	2,90	2,86
8	Cheyenne izo	3,44	3,44
9	Uljanovka izo	3,84	3,84
10	G.K. Tiszatáj	0,96	0,20
11	Capelle Desprez	0,00	0,00
12	Martonvásári 8	1,55	0,67
Gerste		-10°C	-13°C
13	Hundred	3,3	1,8
14	Barbinak	3,3	2,5
15	Kold	3,5	2,1
16	Baishishek	4,0	0,2
17	REX	3,6	0,6
18	Rodnik	3,4	0,4

3.2. Genotypisierung des verwendeten Pflanzenmaterials

3.2.1. Bestimmung des Wintertyps

Die Genotypisierung sollte sicherstellen, dass es sich bei dem Pflanzenmaterial um Wintertypen handelt. Die Genotypisierung der Weizenlinien wurde nach Sherman *et al.* (2004) durchgeführt. Die allelspezifischen Primer können Sequenzunterschiede im Gen *VRN-1* zwischen Winter- (*vrn-A1*) und Sommerkultivaren (*VRN-A1*) detektieren (Abb. 3.2). Die Primer hybridisieren mit ihrem 3'-Terminus an den polymorphen Sequenzen. Die Gerstenlinien wurden mit dominanten STS-Markern im Gen *VRN-H2* genotypisiert (N. Pecchioni, pers. Mitteilung). Da bei *vrn-H2* Genotypen (Sommer) der gesamte Locus deletiert ist (Dubcovsky *et al.*, 2005), wird nur bei Wintergenotypen ein Amplicon synthetisiert. Detaillierte Informationen über die molekulare Struktur von Vernalisierungsgenen in Gerste sind bei Tondelli *et al.* (2006) und Skinner *et al.* (2005b) zu finden. Bei allen getesteten Linien handelt es sich eindeutig um Wintergenotypen. Bei der allelspezifischen Primer-Kombination VA1-R/361W-F wird ein Amplicon von etwa 500 bp synthetisiert, beim Primerpaar VA1-R/361S-F wird hingegen nur bei der Positivkontrolle (Sommergenotyp) ein Produkt gebildet. Die PCR-Reaktion mit den Primer HvZCCT-S und HvZCCT-AS lässt ein Produkt von 237 bp entstehen. Für die Roggeninzuchtlinien liegen Informationen von der Phänotypisierung des Züchters vor, bei denen es sich um

Linien aus einem Winterroggen-Zuchtprogramm handelt (pers. Mitteilung, V. Korzun; Fa. KWS Lochow).

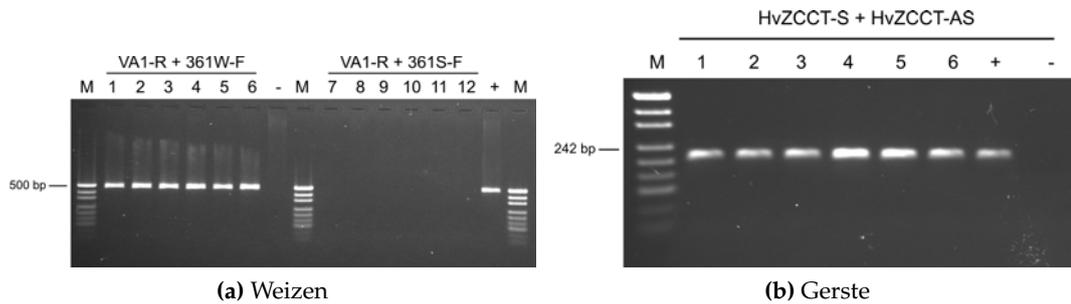


Abbildung 3.2 – (a) Agarosegelelektrophorese (1,2%) der Weizenlinien mit allelspezifischen Primern VA1-R/361W-F und VA1-R/361S-F. Als Negativ- bzw. Positivkontrolle (-/+) wurde der Sommergenotyp „Chinese Spring“ gewählt. M, pUC19/*MspI*; Spuren 1-6 + 7-12: Miranovszkaja Cheyenne izo, Capelle Desprez, G.K. Tiszatáj, Capelle Desprez, Martonvásári 8. (b) Agarosegelelektrophorese (1,5%) der Genotypisierung der Gerstenlinien mit Primern HvZCCT-S/HvZCCT-AS. M, pUC19/*MspI*; Spuren 1-6: Hundred, Barbinak, Kold, Baishishek, REX, Rodnik; +, Igri (Wintergenotyp); -, Morex (Sommergenotyp).

3.2.2. Bestimmung der genetischen Diversität der verwendeten Gerstegenotypen

Die Überprüfung der Verwandtschaft sollte klären, ob die Bestimmung der Frosttoleranz auch auf genetischer Ebene mittels Mikrosatelliten-Analyse (SSRs) sichtbar ist. Zudem können ähnliche Transkriptionsmuster bedeuten, daß es sich z.B. um tolerante oder verwandte Kultivare handelt. Aus zeitlichen Gründen wurde die Analyse exemplarisch nur für Gerste durchgeführt. Insgesamt wurden 38 Marker mit einem durchschnittlichen PIC von 0,32 analysiert. Tabelle A.1 gibt einen Überblick über die Polymorphismen der verwendeten SSRs. Mittels der Allelfrequenzen wurde eine euklidische Distanzmatrix berechnet und durch hierarchisches Clustern (UPGMA-Methode) ein phylogenetischer Baum erstellt, der die Verwandtschaftsverhältnisse darstellt (Abbildung 3.3).

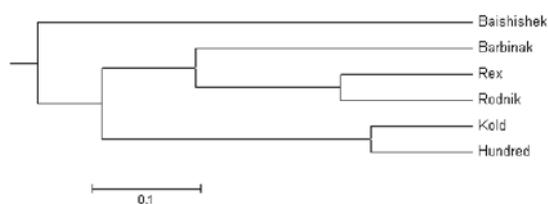


Abbildung 3.3 – Phylogenetischer Baum der Gerstegenotypen basierend auf einer Analyse von 38 Mikrosatelliten.

Die Genotypen gruppieren sich anhand ihrer geographischen Herkunft eindeutig. Rex und Rodnik (anfällig) stammen beide aus Kroatien, Barbinak (tolerant) aus der Ukraine. Aus den Vereinigten Staaten stammen Kold und Hundred (beide tolerant), die phylogenetisch am engsten verwandt sind. Der anfälligste Genotyp Baishishek stammt aus Kasachstan und stellt phylogenetisch eine separate Gruppe dar. Eine klare Gruppierung basierend auf der Ährenmorphologie (2 oder 6-zeilig) oder Frosttoleranz ist nicht ableitbar.

3.3. Transkriptomanalyse während der Kälteakklimatisierung in Roggen, Weizen und Gerste

Die ursprüngliche Strategie, mit einem eigenen produzierten Makroarray die Experimente durchzuführen, musste aufgrund von technischen Problemen aufgegeben werden. Der Array umfasste mehr als 13.000 cDNA-Proben und wurde mit rund 2000 kälteinduzierten Genen, deren Auswahl auf Ergebnissen eines Experimentes mit einem Affymetrix Gerste-Oligoarrays basierte (pers. Mitteilung, T. Close), angereichert. Nach Amplifikation der cDNA und Herstellung der Makroarrays zeigten sich nicht reproduzierbare Hybridisierungen mit sehr niedrigen Signalintensitäten. Aus Zeitgründen wurde auf eine systematische Fehlererueierung verzichtet. Da der hier verwendete Array in einer begrenzten Stückzahl verfügbar war, wirkte sich dies auf die weitere Planung der Studie aus. Die Sonden der drei biologischen Replikate konnten nicht mit einzelnen Makroarrays hybridisiert werden. Um trotzdem die biologische Varianz, die um ein Vielfaches höher sein kann als die technische Varianz, mit berücksichtigen zu können, wurden die Replikate in einer Hybridisierungsprobe vereinigt. Daraus folgt, dass aufgrund der fehlenden Freiheitsgrade kein statistisches Verfahren zum Testen der differentiellen Expression verwendet werden konnte. Stattdessen wurde die differentielle Expression von Genen mit dem „Induktions-Repressions-Faktor“ (*expression fold-change* nachfolgend als FC abgekürzt) nach der Formel $\log_2 \frac{I_t - 21}{I_{t0}}$ berechnet. I_t steht in für die Expressionswerte der verschiedenen Zeitpunkte. Der FC wurde relativ zum Zeitpunkt Tag 0 für Tag 1, Tag 7 und Tag 21 berechnet. Dabei musste das Signal an mindestens einem Zeitpunkt über das 2-fache des Hintergrundes liegen und ein Doppelspot-Ratio kleiner 2 aufweisen.

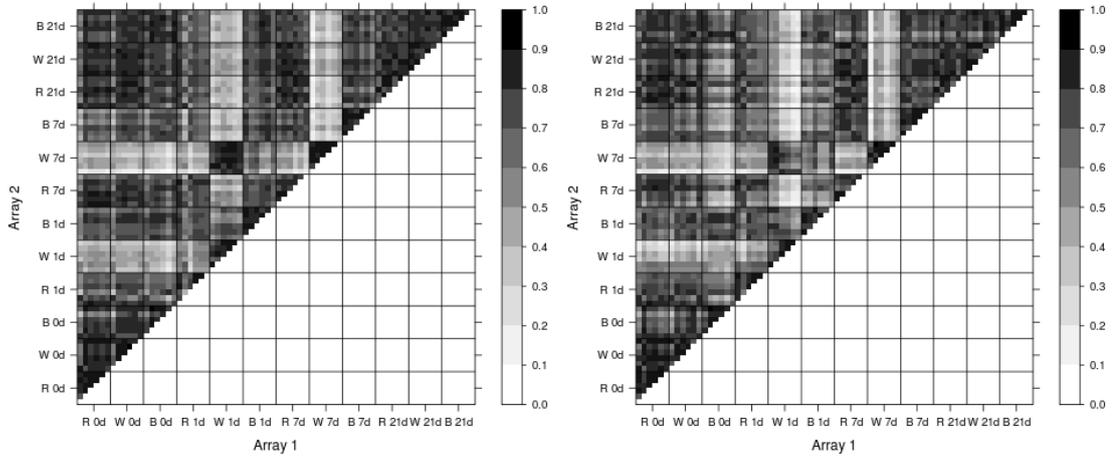
3.3.1. Normalisierung

Die Untersuchung der Genexpression von jeweils 6 Genotypen dreier Spezies zu vier Zeitpunkten während der Kälteakklimatisierung machten 72 Hybridisierungen notwendig. Insgesamt umfasst der Rohdatensatz damit rund 1.7 Mio. bzw. 870 000 gemittelte Datenpunkte. Als Qualitätskontrolle wurden die Doppelspot-Ratios ermittelt und nur jene in die Analyse aufgenommen, die ein Ratio < 2 aufwiesen und 2-fach über dem Hintergrundsignal lagen. Die Normalisierung dient dazu, die Vergleichbarkeit der Array-ermittelten Daten untereinander zu überprüfen, herzustellen und systematische Fehler zu minimieren. Da in dieser Studie sowohl homologe als auch heterologe Hybridisierungen durchgeführt wurden, wurden drei verschiedene Verfahren der hintergrundnormalisierten Werten miteinander verglichen. Hierzu wurden Konkordanzkoeffizienten berechnet und graphisch dargestellt (Abb. 3.4).

Die Quantilnormalisierung wird der Medianzentrierung gegenüber bevorzugt, die nur eine schwache Normalisierung darstellt und daher weniger Rauschanteil bereinigt. Da nach der Quantilnormalisierung zumeist hohe Korrelationen zu beobachten sind, können die Daten als qualitativ gesichert angesehen werden. Für die späteren Analysen wird die mehrstufige Quantilnormalisierung angewendet, bei der die Daten separat nach Spezies normalisiert werden. Dabei werden mögliche Artefakte, die durch die heterologen Hybridisierungen entstehen können, nicht auf die anderen Datensätze übertragen. Die Genexpressionsmuster zum Zeitpunkt Tag 0 sind sowohl zwischen den Genotypen einer Spezies als auch zwischen den verschiedenen Spezies sehr hoch

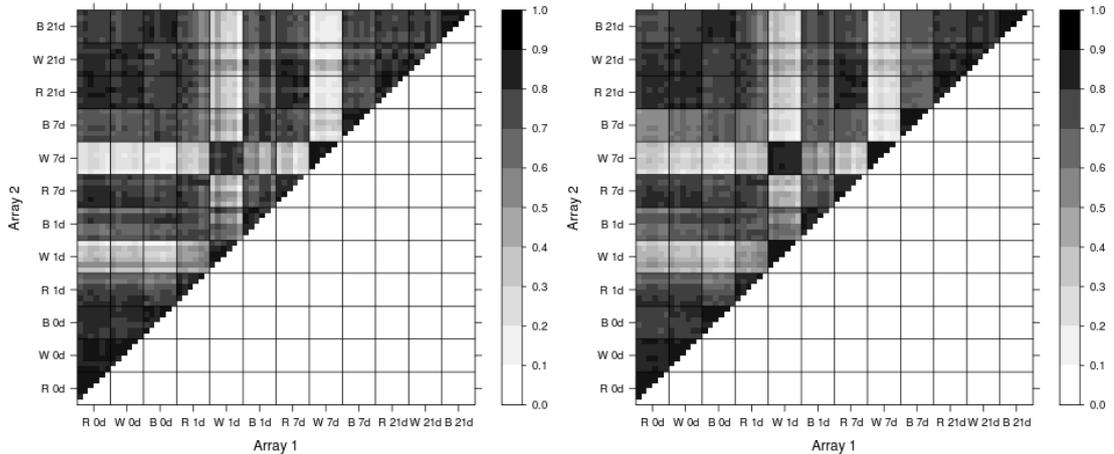
3. ERGEBNISSE

korreliert. Schwache Korrelationen sind nur bei Weizen an bestimmten Zeitpunkten zu beobachten.



(a) Hintergrund-korrigierte Intensitäten

(b) Mediannormalisierung



(c) Quantilnormalisierung

(d) Mehrstufige Quantilnormalisierung

Abbildung 3.4 – Graphische Darstellung von Konkordanzkoeffizienten zwischen Makroarrays. Dunkle Grautöne indizieren hohe Übereinstimmungen zwischen Expressionswerten. Deutliche Gruppierungen von schwachen Korrelationen sind an bestimmten Zeitpunkten gehäuft und deuten auf eine biologische Ursache hin. Hohe Korrelationen sind bei den Kontrollen (0 Tage) zu finden. R, Roggen; W, Weizen; B, Gerste.

3.3.2. Anmerkungen zur Datenqualität der homologen und heterologen Makroarray-Hybridisierungen

Die heterologen Roggen- und Weizensonden benötigten eine geringere Stringenz bei der Durchführung der Hybridisierungen aufgrund der bekannten Sequenzdivergenz zwischen den Arten. Die geringere Stringenz beim Waschen der Filter hat den Vorteil, dass die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, auch reprimierte Genregulation detektieren zu können. Da zwischen den *Triticeae* eine hohe Sequenzkonservierung besteht, bei der die Sequenzidentität nur selten $< 85\%$ (Mayer *et al.*, 2009) ist, werden die meisten Transkripte ohne Probleme zu detektieren sein. Ob und inwieweit die heterologen Hybridisierungen auf die Qualität der Hybridisierungssignale einen Einfluss haben, soll in diesem Abschnitt geklärt werden.

3.3.2.1. Signalintensität zu Hintergrund Verhältnis

Die Abbildung 3.5 zeigt eine homogene Verteilung der Signalintensitäten zwischen den Spezies. Auch bei den heterologen Hybridisierungen ist das Verhältnis $Signal/Hintergrund$ stabil. So kann mit dem Gersten-Makroarray trotz Sequenzunterschieden eine ähnliche Anzahl von Transkripten in Roggen und Weizen detektiert werden.

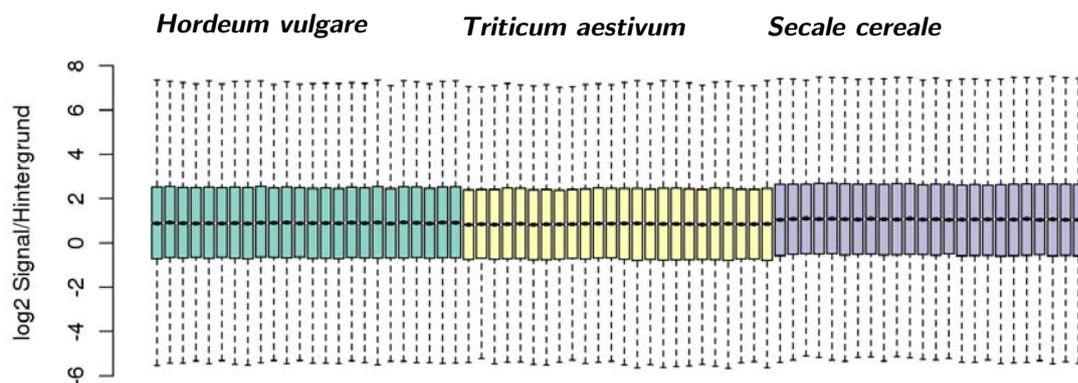


Abbildung 3.5 – Logarithmierte $Signal/Hintergrund$ Verhältnisse der quantilnormalisierten Intensitäten bei Roggen (Sc, türkis), Weizen (Ta, gelb) und Gerste (Hv, violett). Jeder „Boxplot“ repräsentiert dabei ein Array. Aufgrund der hohen Anzahl der Signale und deren Signalverteilung stellen die „Whiskers“ nicht das Maximum und Minimum der Signale dar sondern das 1,5-fache des Interquartilabstandes.

Mit den Mittelwerten der $Signal/Hintergrund$ -Verhältnisse von homologen und heterologen Hybridisierungen wurde ein Lowess-Fit durchgeführt. Dessen Funktion wurde abgebildet (Abb. 3.6), um Aufschluss zugeben, bei welcher Signalintensität die Hybridisierungsspezifität der heterologen Sonden Probleme bereiten könnte. Die Korrelationskoeffizienten für die Vergleiche Sc/Hv und Ta/Hv betragen in beiden Fällen 0,90. Im unteren Signalbereich werden Intensitätsverhältnisse zugunsten der heterologen Hybridisierungen verstärkt. Der Grund hierfür liegt vermutlich in der höheren unspezifischen Wechselwirkung, bedingt durch die weniger stringenten Hybridisierungsbedingungen bei Genen mit geringer Transkriptabundanz. Die Interpretation differentieller Genexpression bei niedriger Signalstärke muss deshalb vorsichtig vorgenommen werden. Durch

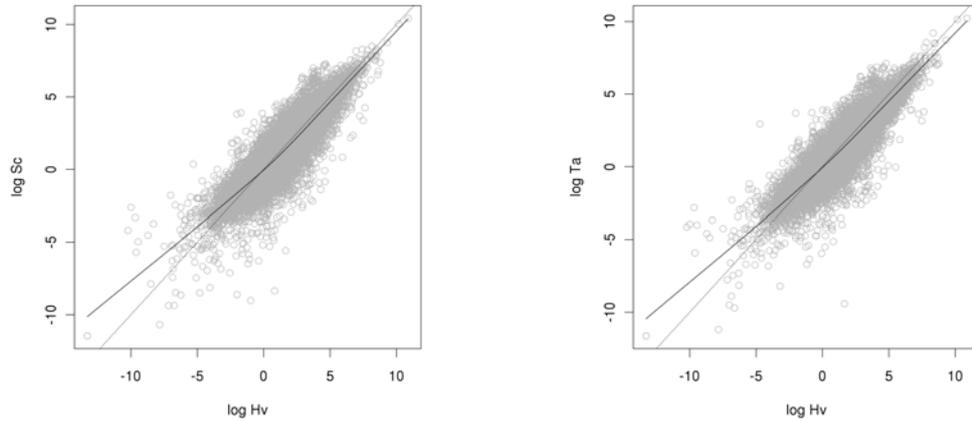


Abbildung 3.6 – Log2-Mittelwerte der *Signal/Hintergrund* Verhältnisse von Roggen (links) und Weizen (rechts) aufgetragen gegen Gerste (x-Achse). Durchgängige Linie: Lowess-Funktion. Differentielle oder unterschiedliche konstitutive Genexpressionen sind biologisch bedingte Variabilität in den *Signal/Hintergrund* Verhältnissen. Deutlich erkennbar sind hohe Korrelationen im oberen Intensitätsbereich.

die Benutzung von Zufallsnonameren während der Sondenherstellung (*random priming*) werden solche Effekte, die durch Sequenzdivergenz bedingt sind, jedoch minimiert. Um die Hybridisierungsspezifität von Roggen- und Weizensonden zum Gerste-Makroarray zu analysieren, wurden die beiden Datensätze miteinander quantilnormalisiert und das *Signal/Hintergrund*-Verhältnis berechnet (Abb. 3.7). Die Hybridisierungen beider Arten zeigen vergleichbare Signalintensitäten.

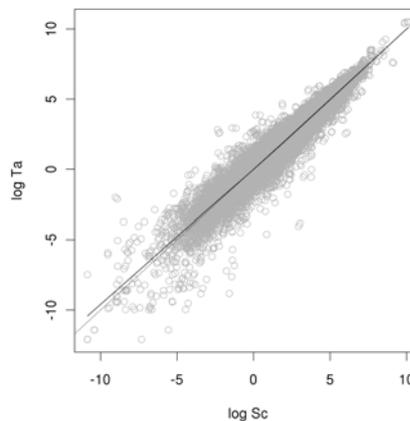


Abbildung 3.7 – Log2-Mittelwerte der *Signal/Hintergrund* Verhältnisse von Roggen (x-Achse) und Weizen (y-Achse). Durchgängige Linie: Lowess-Funktion. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0.95 und weist eine fast perfekte Korrelation im Bereich der höheren Sequenzintensitäten auf.

3.3.2.2. Signalintensität und Doppelpotverhältnis

Als interne technische Kontrolle wurde bei der Arrayherstellung jede cDNA-Probe doppelt aufgebracht („Doppelpot“). Dies ermöglicht die Evaluierung der Qualität des Signals aufgrund des Intensitätsverhältnisses („Doppelpot-Ratio“). Vergleicht man die

logarithmierten Mittelwerte der Signalintensität mit den Doppelpot-Verhältnissen anhand von Dichtekarten, so ist erkennbar, dass im oberen Signalbereich nur wenige Gene ein stark abweichendes Verhältnis aufweisen. Im unteren Signalbereich erhöht sich die Varianz der Signalstärke zwischen den Doppelpots eines Gens und damit das Auftreten von Hybridisierungsartefakten (Abb. 3.8). Stark negative *Signal/Hintergrund* Verhältnisse sind durch Überstrahleffekte der radioaktiv markierten Sonden mit benachbarten Hintergrundsignalen erklärbar. Signale, die von dieser Art Artefakte beeinträchtigt waren, wurden nicht in die Analysen einbezogen.

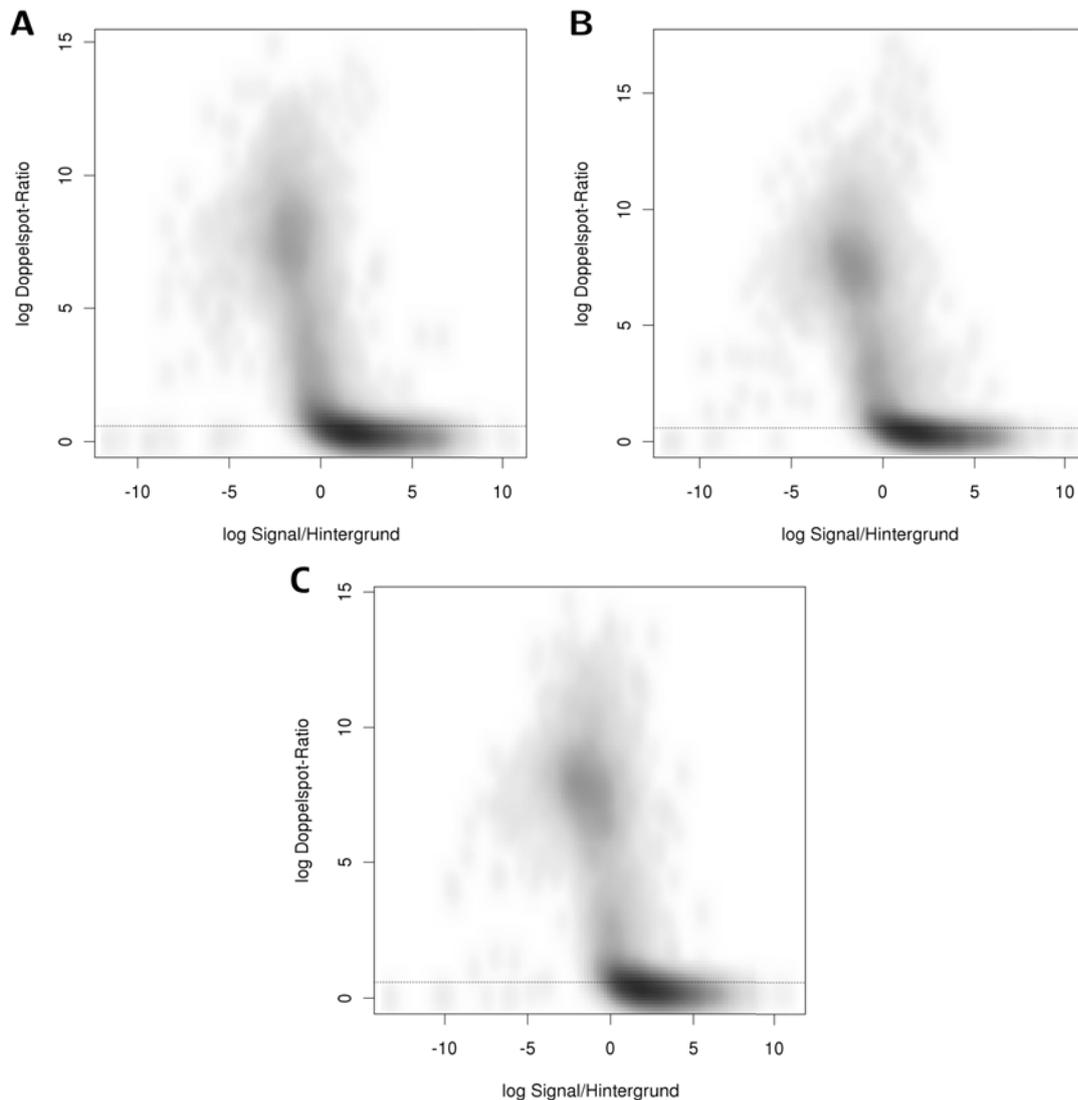


Abbildung 3.8 – Log₂-Mittelwerte der *Signal/Hintergrund* Verhältnis (x-Achse) und dem Doppelpot-Ratio (y-Achse) von Roggen (a), Weizen (b) und Gerste (c). Die gepunktete Linie stellt ein Doppelpotverhältnis von 1,5 dar. Die Spannweiten des Median der einzelnen Hybridisierungen (je 24) sind vergleichbar und betragen beim Roggen 1.13-1.29, bei Weizen 1,15-1,34 und bei Gerste 1,15-1,29.

3.3.2.3. Anzahl auswertbarer Signale

Da eine unterschiedliche Anzahl von auswertbaren Signalen (Doppelsportverhältnis < 2 , $Signal/Hintergrund > 2$) die spätere Interpretation der Analyseergebnisse beeinflussen könnte, bedarf es der Gewissheit, dass die einzelnen Hybridisierungen keine gravierenden Differenzen aufweisen. Ausgehend von den Kriterien der Doppelspot- und $Signal/Hintergrund$ -Verhältnisse, wird eine ähnliche Anzahl von Signalen bei allen Hybridisierungen erfasst (Abb. 3.9).

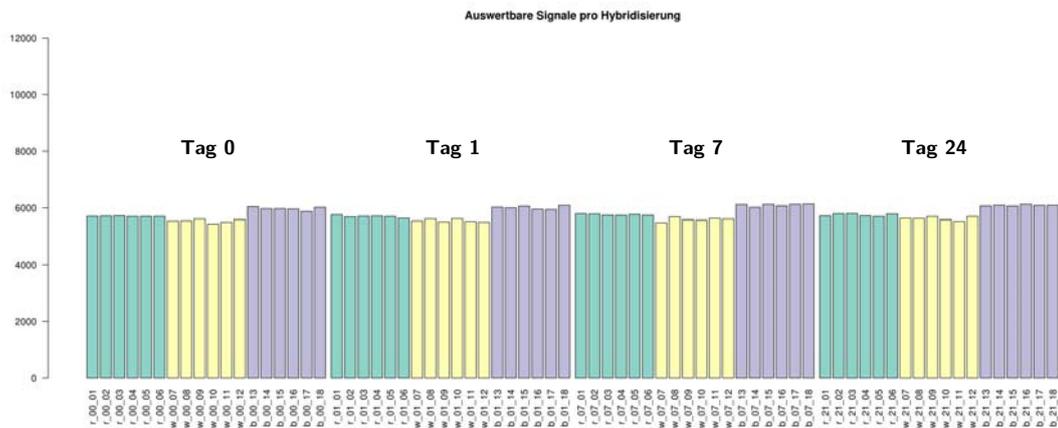


Abbildung 3.9 – Anzahl von auswertbaren Signalen (y-Achse) einzelner Hybridisierungen bei Roggen (türkis), Weizen (gelb) und Gerste (violett). Eine marginal höhere Anzahl von auswertbaren Signalen wird bei den Gerste-Hybridisierungen beobachtet. r, Roggen; w, Weizen; b, Gerste; 01–21, Tag 01–21; 01–18, Genotypen 01–18.

3.3.2.4. Hierarchische Clusteranalyse und mehrdimensionales Skalieren zur Gruppierung der Array-Hybridisierungsergebnisse

Die hierarchische Clusteranalyse (HC) ist eine statistische Methode, mit der man Gemeinsamkeiten und Unterschiede von komplexen Datensätzen prüfen kann. In den vorliegenden mehrdimensionalen Datensätzen mit vier Zeitpunkten und sechs Genotypen je Art wird geprüft, ob natürliche Gruppen mittels HC in den molekularen Daten gefunden werden können. Dabei soll geprüft werden, ob die Resultate zwischen Genotypen einer Spezies zu einem gegebenen Zeitpunkt grundsätzlich vergleichbar sind (Abb. 3.10).

Trotz der dynamischen Genexpression während der Kälteakklimatisierung und möglicher Synchronisierungsunterschiede zwischen Genotypen in der Physiologie und Entwicklung, lassen sich deutliche Muster ausmachen: identische Zeitpunkte gruppieren sich deutlich und zeigen chronologische Unterschiede zwischen den Spezies auf. Im Anhang B.1 befinden sich Dendrogramme, die mit dem R-Skript „Pvclust“ (Suzuki und Shimodaira, 2006) erstellt worden sind. Dabei handelt es sich um eine Bootstrap-Analyse der Clusterzugehörigkeit, um Unsicherheiten bei der Zuordnung von Clustern abschätzen zu können. Es werden AU-Werte (*approximately unbiased*) für jedes Cluster berechnet, die ein Maß für die Stabilität eines Cluster darstellen. Die Cluster sind bei Weizen und Gerste robust, bei Roggen besteht bei den größeren Clustern eine höhere Unsicherheit in der Zugehörigkeit von einigen Hybridisierungen.

Die mehrdimensionale Skalierung (MDS) wird in diesem Abschnitt eingeführt, um die Dynamik der Genexpression zwischen Genotyp und Zeitpunkt in Verbindung mit dem Rauschanteil der Daten darstellen zu können. Sie dient dazu, Gruppen zu identifizieren und Zusammenhänge zwischen einzelnen Zeitpunkten bzw. Genotypen zu visualisieren. Ausgangspunkt ist eine symmetrische („paarweise“) Distanzmatrix zwischen n Objekten. Dabei passt MDS die n Objekte in einem k -dimensionalen euklidischen Raum so an, dass die Punkte möglichst ähnlich der Distanzen sind (Gentleman, 2005). In diesem Abschnitt wird das klassische metrische MDS genutzt, das die Methode der „Kleinsten Quadrate“ als Ähnlichkeitsmaß nutzt.

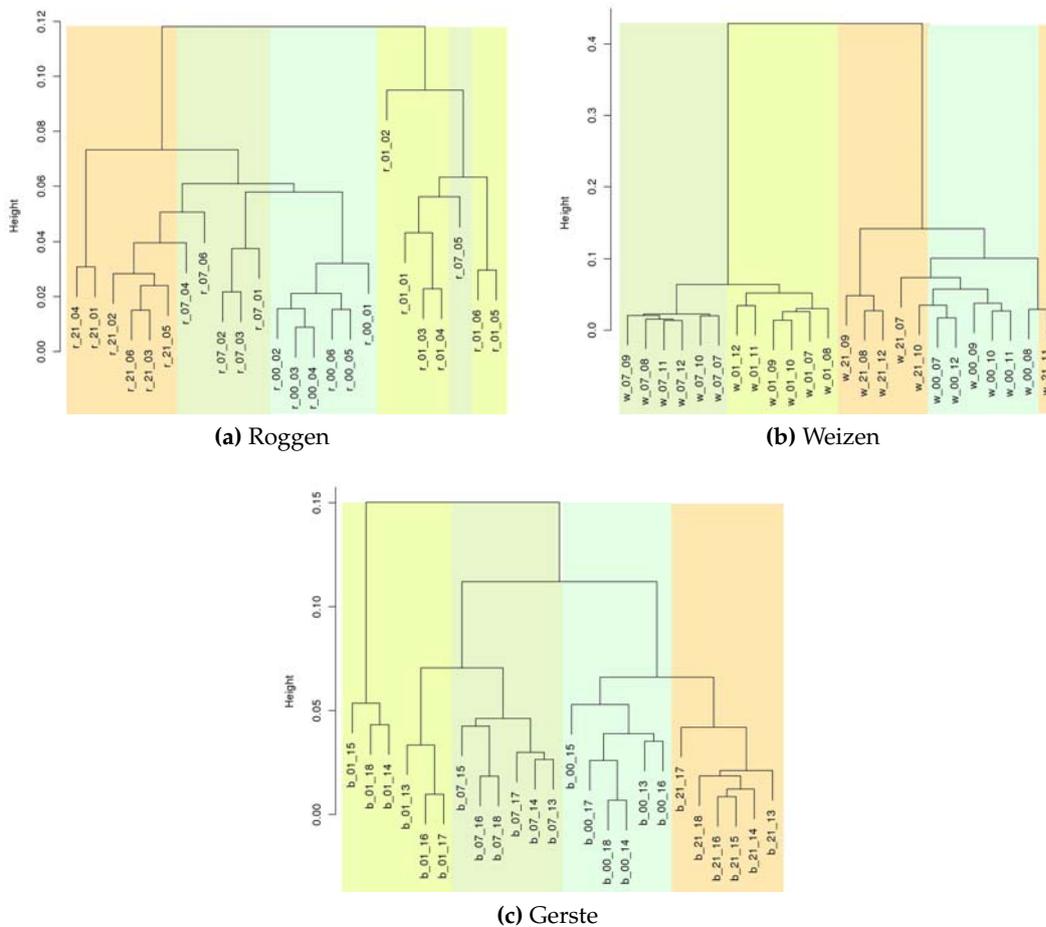


Abbildung 3.10 – Dendrogramme der Array-Hybridisierungen von Roggen (a), Weizen (b) und Gerste (c) nach hierarchischen Clustern. Es wurde eine korrelationsbasierte Distanzmatrix (Pearson) berechnet, ein hierarchisches Clustering durchgeführt (Mittelwertabstand) und es wurden die Cluster in einem Dendrogramm abgebildet. Die Clusteranalyse zeigt Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede zwischen den Arten. Bei Roggen und Gerste sind die Hybridisierungen von Tag 0 homogen, es befinden sich nur Hybridisierungen desselben Zeitpunktes in dem Cluster. Die Cluster der Zeitpunkte Tag 1 und Tag 7 sind bei Weizen und Gerste homogen. Bei Roggen befindet sich eine Hybridisierung des Zeitpunktes Tag 7 im Cluster von Tag 1. Sehr homogene Cluster sind bei Gerste und Roggen beim Tag 21 erkennbar. Die Anordnung der Zeitpunkte unterscheidet sich stark zwischen den Spezies. So bilden bei Weizen und Gerste Tag 0 und Tag 21 ein gemeinsames Cluster, was bei Roggen nicht der Fall ist. r, Roggen; w, Weizen; b, Gerste; 01-21, Tag 01-21; 01-18, Genotypen 01-18.

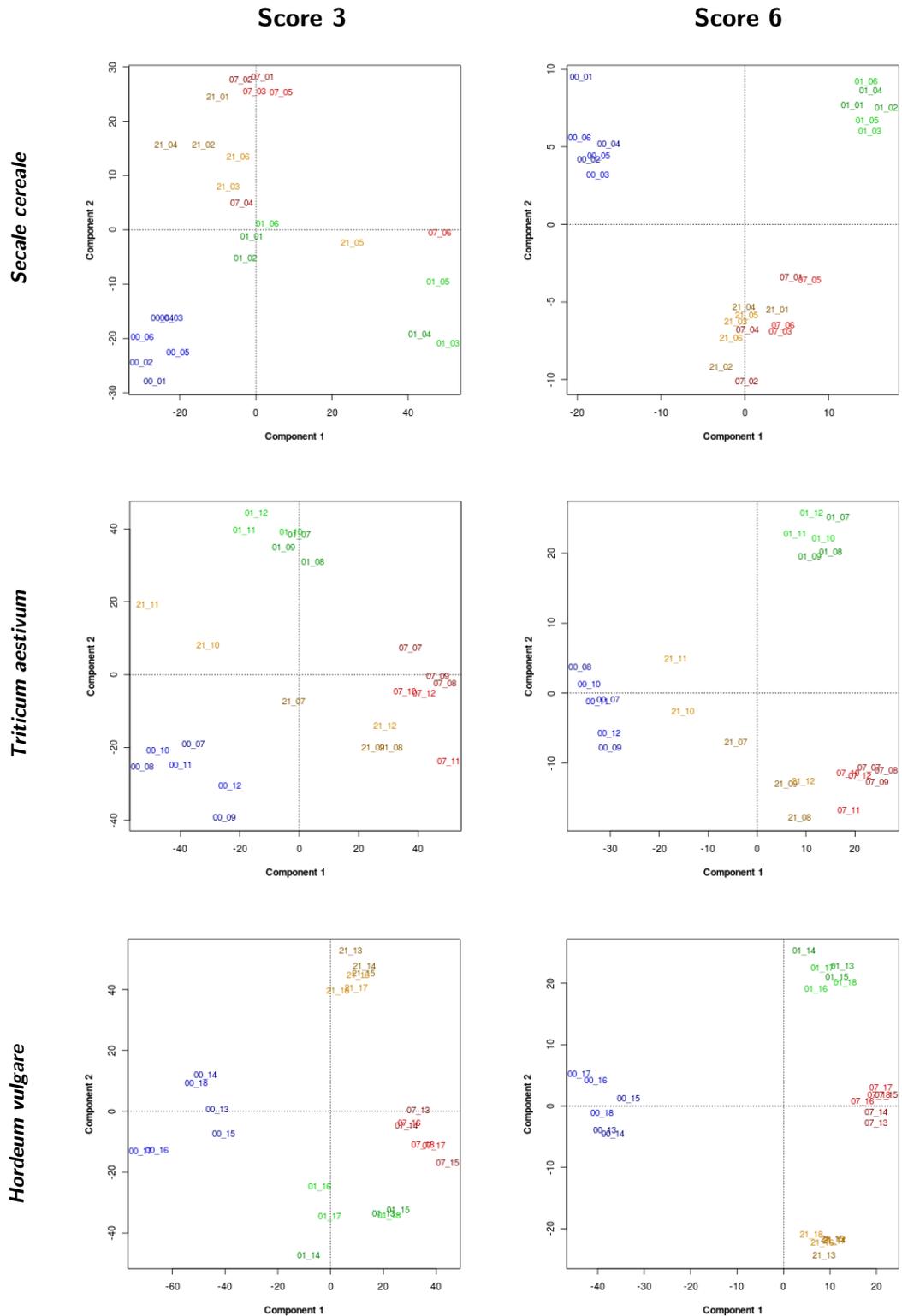


Abbildung 3.11 – Multidimensionale Skalierung mit verschiedenen Gen-Scores $\pm 3/6$ (siehe 3.3.6) von Roggen, Weizen und Gerste. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit denen der hierarchischen Clusteranalyse: Zeitpunkte gruppieren sich zu homogenen Clustern, insbesondere bei Erniedrigung des Rauschanteils durch Auswahl von Genen mit einem höheren Gen-Score. Blau, Tag 0; grün, Tag 1; rot, Tag 7; gelb, Tag 21; dunklere Farbtöne: tolerante Genotypen.

3.3.3. Korrelation zwischen Makroarray und qRT-PCR von ausgewählten Genen in Gerste und Roggen

Die Methode der quantitativen „real-time“-PCR (qRT-PCR) wurde ergänzend zur Verifikation der Makroarray-Daten eingesetzt. Die Experimente ermöglichen u.a. auch die Bestimmung der Varianz zwischen biologischen Replikaten. Das Auswahlkriterium für die Verifikationsgene bei Gerste bestand in der Korrelation zwischen Expressionswerten und dem Phänotyp. Bei Roggen standen die Verifikation der differentiellen Genexpression und deren technische Reproduzierbarkeit im Vordergrund. Um sicherzustellen, dass keine genomischen Loci amplifiziert werden, wurden die Primer in verschiedene Introns platziert, um einen Größenunterschied bei cDNA und gDNA detektieren zu können (Abb. 3.12). Primersequenzen für die Amplifizierung von Genen aus Roggen wurden basierend auf den öffentlich zugänglichen Sequenzen sowie von 454-Sequenzdaten (Haseneyer *et al.*, 2011) synthetisiert. Alle Amplifikate wurden kloniert und sequenziert, um die Spezifität der Primer zu überprüfen. Darüber hinaus wurden alle cDNA-Proben von Gerste aus den Klonbiobibliotheken sequenziert. Die Kontrolle diente der Überprüfung des Arrays und der Zuordnung des Arraysignals zu der richtigen Genannotation. Als Gene für die Normalisierung der qRT-PCR wurden bei Roggen β -Actin, eine ribosomale RNA (rRNA S28) sowie β -Tubulin ausgewählt. Bei Gerste dienen als Standardisierungsgene rRNA S28, Succinat-Dehydrogenase und Elongationsfaktor 1- α .

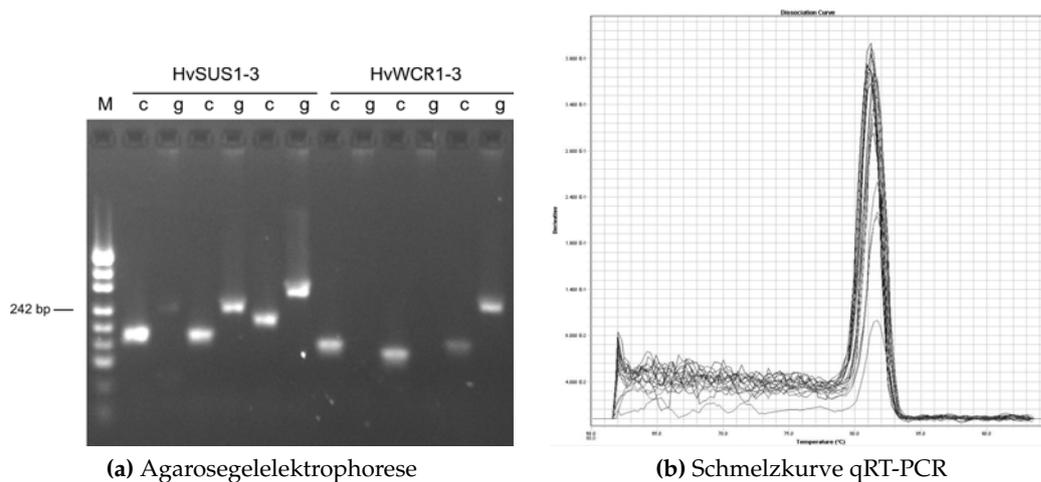


Abbildung 3.12 – (a) Agarosegelelektrophorese (1%) eines Tests von drei Primerpaaren (1-3) einer Saccharose-Synthase (HvSUS) und einem WCOR-Protein (HvWCR) mit cDNA (c) und gDNA (g) als Template. Deutlich sind die verschiedenen großen Fragmente zwischen cDNA- und gDNA-Proben bei HvSUS zu erkennen. Bei den ersten beiden PCR-Reaktionen von HvWCR wurden überhaupt keine Amplifikate der gDNA detektiert, was auf eine genaue Platzierung der Primer in einem Intron-Exon Bereich hindeutet. (b) Schmelzkurve der Verdünnungsreihen eines Amplicons (HvWCR-Primer). Einzelne Peaks sind deutlich zu erkennen und indizieren die hohe Sequenzspezifität eines Primers und Abwesenheit von Primerdimeren. x-Achse, Temperatur °C; y-Achse, Fluoreszenzintensität.

Neben der Validierung der differentiellen Expression wurde bei Gerste die Reproduzierbarkeit der Korrelation von Makroarraydaten mit den phänotypischen Daten untersucht. Insgesamt wurden für Roggen 12 und für Gerste 15 Verifikationsgene ausgewählt. Gene aus Weizen wurden aufgrund des hexaploiden Genoms und der daraus resultierenden

Problematik bei der Verifizierung mittels qRT-PCR nicht validiert. Zwei Gene (HA07D15, HT09B05) stellten sich nach der Sequenzierung als nicht übereinstimmend mit dem ursprünglich auf dem Array positionierten Gen heraus. In beiden Fällen konnte damit auch keine Übereinstimmung zwischen den Makroarray- und qRT-PCR-Daten berechnet werden. Damit blieben 13 Gene für die Verifikation bei Gerste übrig, zu denen eine belastbare Aussage gemacht werden kann. Das Profil der Expression der qRT-PCR stimmte in 4 Fällen bei Roggen bzw. 7 Fällen bei Gerste zu >70% mit den Expressionsprofilen der Arrays überein. Tabelle 3.2 veranschaulicht die Ergebnisse der Korrelationsanalyse des Makroarray und der phänotypischen Daten, die mindestens einen Korrelationskoeffizienten von $\geq \pm 0.7$ aufweisen. Unter den Genen sind, sowohl bei Roggen als auch Gerste, bekannte stressinduzierte Gene, die erwartungsgemäß mit Frosttoleranz korrelieren. Dies zeigt, dass die Makroarray-Datensätze belastbare Aussagen zulassen.

Tabelle 3.2 – Überblick über die Verifikation der Makroarray-Resultate mittels qRT-PCR. Zeitpunkte der differentiellen Genexpression sowie Korrelationskoeffizienten und die Anzahl der signifikanten ANOVAs sind in der Tabelle ersichtlich. Sc, Roggen; Hv, Gerste; r_{AP} , Korrelationskoeffizient (Spearman) Makroarray vs. Phänotyp; r_{APh} , Korrelationskoeffizient (Spearman) Makroarray vs. qRT-PCR; FC > 2, „fold-change“-Verifikation der Makroarray-Resultate in der qRT-PCR; r_{PPh} , Korrelationskoeffizient (Spearman) qRT-PCR vs. Phänotyp; $P < 0.05$, *; $P < 0.01$, **; $P < 0.001$, ***

Art	ID	BLAST-Hit	funktionelle Kategorie	Makroarray				qRT-PCR			
				Zeitp.	r_{APh}	r_{AP}	ANOVA	FC > 2	Zeitp.	r_{PPh}	
Sc	HF06E03	1e-174 Aldo/Keto Reduktase	Hormon-Metabolismus			0,869 ***	4x * 1x **	100%	Tag 1+7	-0,771	
Sc	HF17A10	0 Beta-amylase	Kohlenhydrat-Stoffwechsel I			0,723 ***	2x * 2x ** 2x ***	100%	Tag 7	0,657	
Sc	HZ52C18	0 uncharacterized protein	Entwicklung			0,721 ***	1x * 2x **	100%	Tag 1	-0,899 *	
Sc	HT11L12	5e-65 WS18 protein	Entwicklung (LEA)			0,706 ***	2x * 3x **	100%			
Sc	HA15M17	2e-67 Sugar transporter	Transporter (Zucker)	Tag 21	1,000 **	0,654 ***	1x * 1x **	64%	Tag 7	0,771	
Sc	HZ44C05	0 NAC domain transcription factor	Entwicklung	Tag 1	-0,886 *	0,645 ***	1x * 3x ** 1x ***	100%	Tag 21	-0,771	
Sc	HF11H21	0 Saccharose synthase	Kohlenhydrat-Stoffwechsel I	Tag 1	-0,829	0,599 **	1x * 3x ***	86%	Tag 7	-0,771	
Sc	HF14I16	0 Alcohol dehydrogenase 1	Fermentation			0,591 ***	1x **	100%	Tag 1	-0,886 *	
Sc	HT07K18	1e-112 WCOR413	Abiotischer Stress (Kälte)	Tag 1	0,886 *	0,472 *	4x * 1x **	93%	Tag 7	-0,714	
Sc	HF22F02	0 Acetolactate synthase	Aminosäure-Metabolismus			0,466 *		0%			
Sc	HY08K20	0 Enolase 2	Glykolyse (Enolase)	Tag 21	0,943	0,360	1x **	43%	Tag 7	-0,829	
Sc	HM01K23	5e-55 CER1 protein	Sekundär-Metabolismus	Tag 7	0,771	0,208	1x *	0%			
Hv	HZ39A14	0 Chorismate synthase	Aminosäure-Metabolismus	Tag 7	0,943	0,889 ***	2x * 3x**	100%	Tag 21	0,829	
Hv	HF23P23	1e-104 UMP/CMP kinase a	Nucleotid-Metabolismus	Tag 1	0,829	0,883 ***	1x * 3x ** 1x ***	75%			
Hv	HF24J18	1e-77 Dehydrin 1	Unbekannt	Tag 1	0,771	0,880 ***	3 x** 2x ***	88%	Tag 21	0,829	
Hv	HA21L06	1e-122 Choline kinase	Lipid-Metabolism	Tag 1	0,943 *	0,860 ***	1x * 5x **	100%			
Hv	HS14O05	1e-150 Ice recrystall. inhibition protein	Signaltransduktion	Tag 21	0,829	0,769 ***	3x** 2x**	100%			
Hv	HF02A08	0 ATP-NAD kinase family	Unbekannt			0,751 ***	2x * 1x ** 3x ***	100%			
Hv	HZ62F20	1e-118 Inositol-phosphate 3-kinase	Kohlenhydrat-Stoffwechsel II	Tag 1	0,896 *	0,719 ***	2x * 2x **	63%	Tag 1	0,943 *	
Hv	HA13D08	1e-162 Aldose reduktase	Kohlenhydrat-Stoffwechsel II	Tag 1	0,771	0,690 ***	4x * 1x **	100%			
Hv	HY01B17	1e-78 salt-tolerance protein	RNA (CONSTANS)	Tag 1	0,771	0,603 **	4x **	100%	Tag 1	-0,771	
Hv	HT10H12	1e-129 alternative oxidase	mitoch. Elektronentransport	Tag 21	0,771	0,534 **	2x * 3x **	100%	Tag 1	0,714	
Hv	HV13B09	0 Ca2+ exchanging protein	Transport (Calcium)	Tag 21	0,771	0,337	3x* 3x**	67%			
Hv	HT09B05	1e-160 pyridoxal biosynthesis protein	Vitamine-Metabolismus	Tag 21	0,829	0,224	3x* 1x ** 1x***	100%	Tag 7	0,771	
Hv	HA07D15	1e-123 Putative thioredoxin-like protein	Redox			-0,016		0%			
Hv	HF19F09	0 Tubulin-specific chaperone	Zellorganisation	Tag 1	0,943 *	-0,110		0%			
Hv	HA22D14	3e-67 Monothiol glutaredoxin-S10	Redox			-0,281		0%			

3.3.3.1. Varianz zwischen den biologischen Replikaten

Angesichts der fehlenden Replikate der Makroarraydaten konnte keine biologische Varianz zwischen den Wiederholungen berechnet werden. Aus diesem Grund wurden einige Gene für Verifikationsexperimente ausgewählt (Roggen s. Abb. 3.13 und Gerste s. Abb. 3.14).

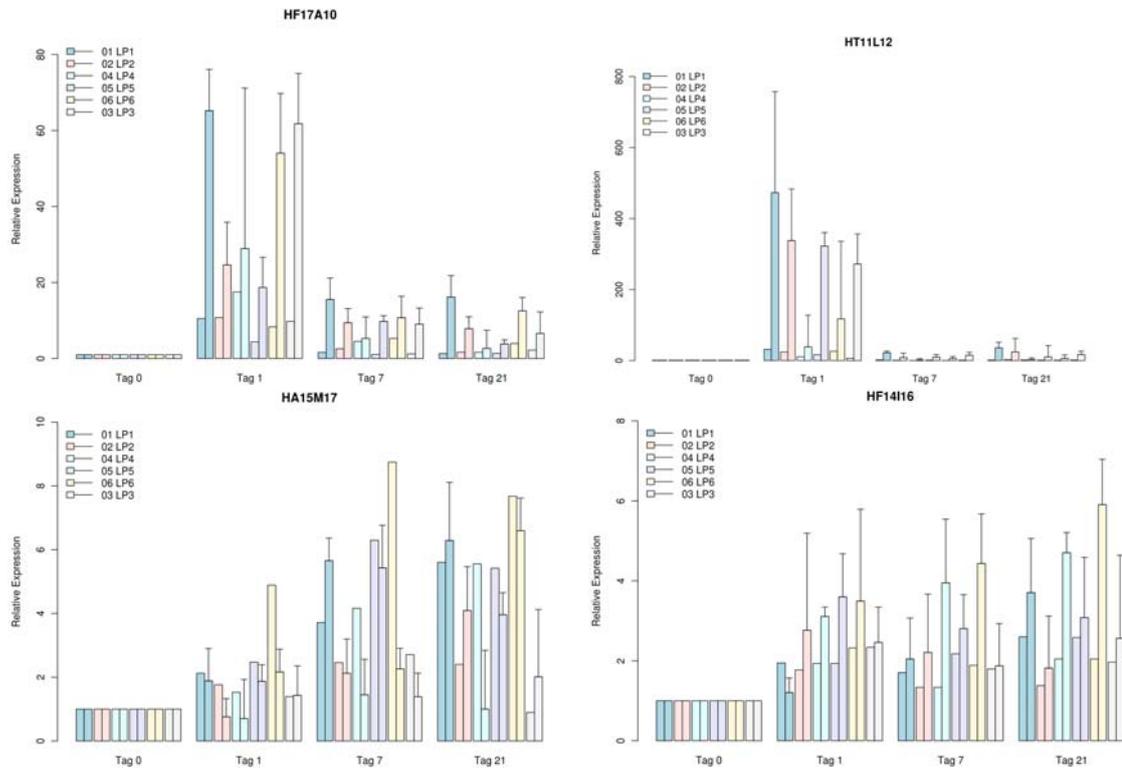


Abbildung 3.13 – Verifikationsexperimente bei *Secale cereale*. Balkendiagramme ohne Fehlerbalken stellen Makroarraydaten dar (Balken links). Fehlerbalken der qRT-PCR-Daten (Balken rechts) stellen den Fehler des Mittelwertes dar, der auf drei arithmetisch gemittelten Messwerten von drei biologischen Replikaten basiert. Die Daten der einzelnen Genotypen sind farblich kodiert. Die Daten wurden in Bezug zur Kontrolle (Tag 0) normalisiert und als relative Expression (FC) dargestellt. Die biologische Varianz zwischen den Replikaten ist abhängig vom betrachteten Gen, Genotyp und Zeitpunkt, wie man am ersten Beispiel von *Secale cereale* (HF17A10 bei LP4) erkennen kann. Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit der drei Messergebnisse einer biologischen Wiederholung (Daten nicht gezeigt) kann eine technische Varianz hier ausgeschlossen werden.

Die auffällig höheren Induktionsfaktoren der qRT-PCR-Verifizierung lassen sich dadurch erklären, dass geringfügige Abweichungen von niedrigen Werten bei der Kontrolle (Tag 0) bspw. durch unspezifische Hybridisierungen zu einer Überschätzung der FC-Werte führen. Andererseits können Kreuzhybridisierungen von anderen Genfamilienmitglieder zu einer Unterschätzung der FC-Werte führen. Bei Roggen zeigen von den 12 getesteten Genen zehn signifikante ($P < 0.05$) Korrelationen zwischen den Makroarray- und qRT-PCR-Daten (Tab. 3.2). Eine Korrelationen > 0.7 ist bei Aldo-Reduktase, β -Amylase, bei einem nicht-charakterisierten Protein sowie bei dem WSI18-Protein zu finden. Bei der Varianzanalyse konnte bei sieben Genen eine statistisch signifikante ($P < 0.05$) differentielle Genexpression bei mindestens drei Genotypen nachgewiesen werden. Dient der FC als Kriterium für Reproduzierbarkeit, kann bei fünf Genen eine differentielle Gen-

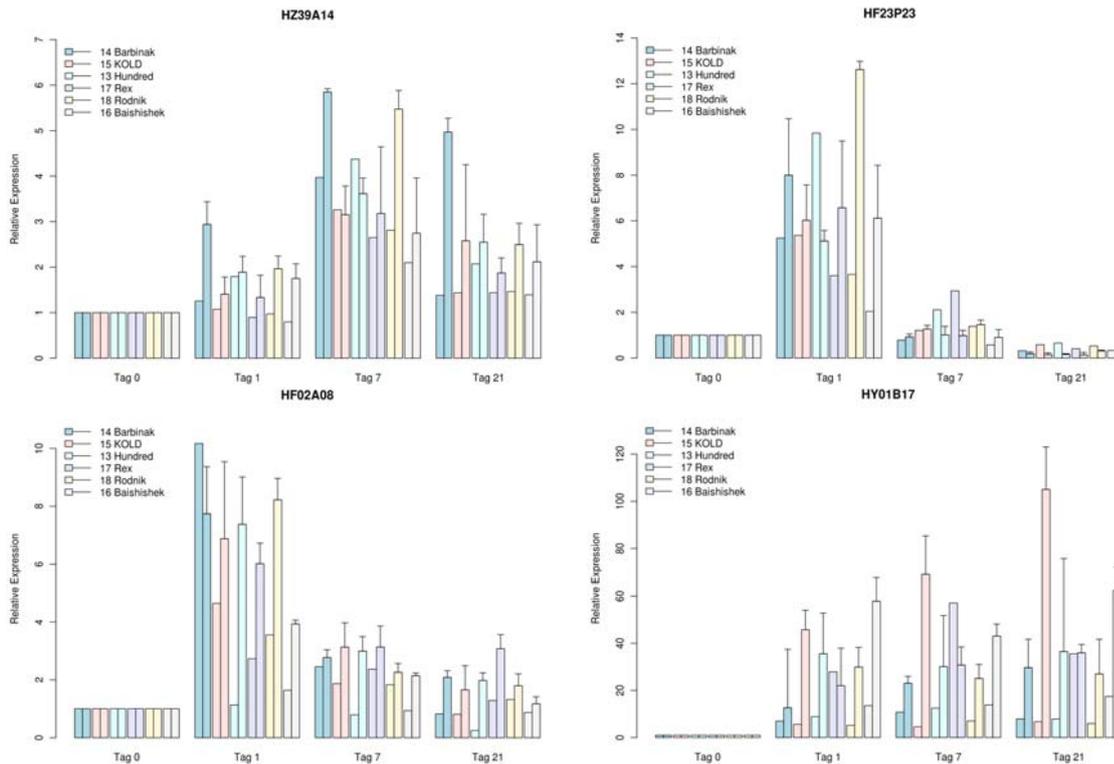


Abbildung 3.14 – Verifikationsexperimente bei *Hordeum vulgare*. Balkendiagramme ohne Fehlerbalken stellen Makroarraydaten dar (Balken links). Fehlerbalken der qRT-PCR-Daten (Balken rechts) stellen den Fehler des Mittelwertes dar, der auf drei arithmetisch gemittelten Messwerten von drei biologischen Replikaten basiert. Die Daten der einzelnen Genotypen sind farblich kodiert. Die Daten wurden in Bezug zur Kontrolle (Tag 0) normalisiert und als relative Expression (FC) dargestellt.

expression ($FC > 2$) bei allen Genotypen bestätigt werden. Bei den Verifikationsgenen von Gerste zeigt sich ein ähnliches Bild: von den 15 getesteten Genen besitzen ebenfalls zehn – z.T. hochsignifikante – Korrelationen zwischen Makroarray- und qRT-PCR-Daten. Korrelationen > 0.7 konnten bei Chorismat-Synthase, UMP/CMP-Kinase, Dehydrin 1, Choline-Kinase, Eisrekrystallisierungsinhibierungsprotein, ATP/NAD-Kinase und Inositol-Phosphat-Kinase berechnet werden. Bei der Varianzanalyse der qRT-PCR-Daten wurde bei 12 Genen und bei mind. drei Genotypen eine statistisch abgesicherte ($P < 0.05$) differentielle Genexpression erfasst. Bei acht Genen wird bei allen Genotypen ein $FC > 2$ in den qRT-PCR-Daten detektiert.

Hingegen kommt es bei der Korrelation der qRT-PCR-Daten und dem Phänotyp zu widersprüchlichen Ergebnissen. Bei Roggen weisen β -Amylase, Zuckertransporter, NAC-TF und Saccharose-Synthase gute Korrelationen zwischen dem Makroarray bzw. qRT-PCR und dem Phänotyp auf. Ähnlich verhält es sich mit Chorismat-Synthase, Dehydrin 1 und Inositol-Phosphat-Kinase bei den Testgenen für Gerste. Hohe Korrelationskoeffizienten zwischen qRT-PCR-Daten und Phänotyp können auch an Zeitpunkten berechnet werden, die ursprünglich bei der Analyse der Makroarraydaten nur geringe Assoziationen zeigten. Ein Beispiel dafür ist der Zuckertransporter bei Roggen, der beim Makroarray am Tag 21 korreliert, aber in der qRT-PCR am Tag 7 eine hohe Korrelation aufweist. Ein Sonderfall ist das Pyridoxal-Biosyntheseprotein bei Gerste, das aufgrund

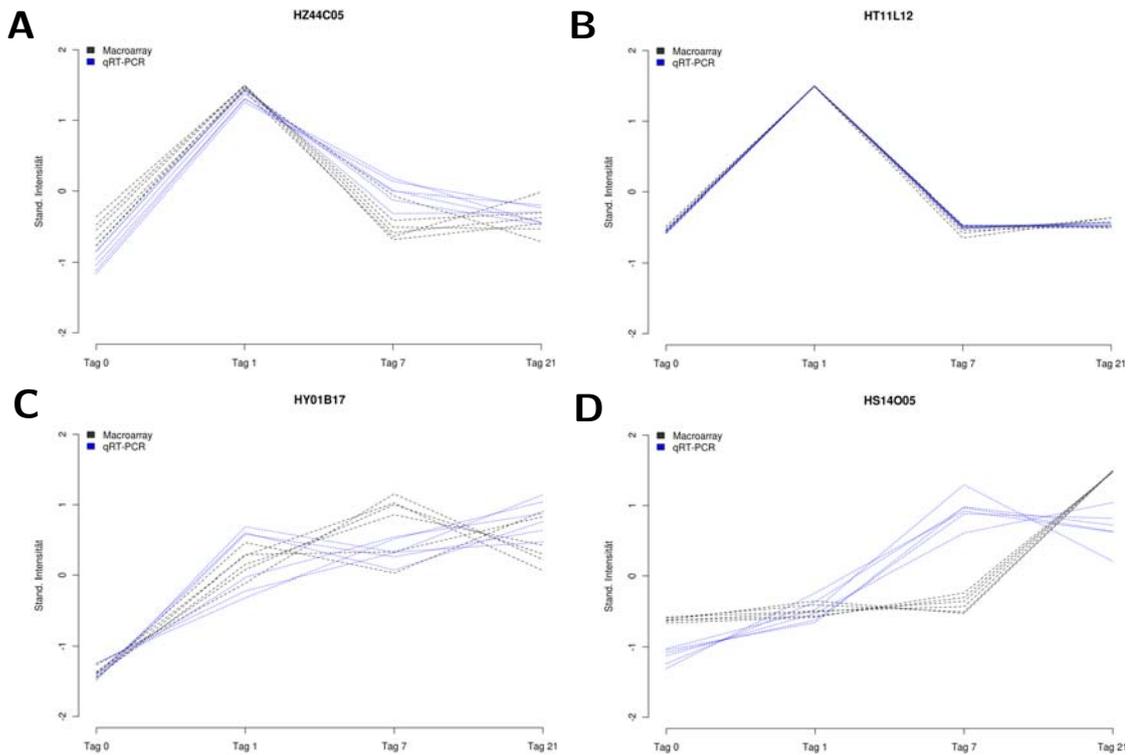


Abbildung 3.15 – Ausgewählte Beispiele standardisierter Expressionswerte der Makroarray- und qRT-PCR-Daten von *Secale cereale* (A-C) und *Hordeum vulgare* (D). Am Verlauf der Expressionsprofile bei den ersten drei Beispielen sind ähnliche Resultate erkennbar. Bei der letzten Graphik (HS14015) ist die Quantifizierung am Tag 7 unterschiedlich.

der chimären Sequenz auf dem Makroarray in der qRT-PCR getestet wurde und mit dem Phänotyp am Tag 7 korreliert. Bei einer Standardisierung der Expressionswerte werden die Profile zwischen qRT-PCR und Makroarray auf ein Niveau skaliert (Abb. 3.15).

3.3.4. Einteilung des Makroarrays in funktionelle Kategorien

Eine funktionelle Annotation verschafft einen Überblick darüber, welche physiologischen Vorgänge in der Pflanze vorgehen. Die Annotation wurde mit der Annotationssoftware „Mercator“, die für die Anwendung „MapMan“ (Thimm *et al.*, 2004; Steinhäuser *et al.*, 2005; Usadel *et al.*, 2009) entwickelt wurde, durchgeführt. Sie dient dazu, die differentielle Expression anhand der Annotation zu visualisieren um dies besser erfassen und interpretieren zu können. Die auf dem Makroarray befindlichen 12 086 cDNA-Proben sind in 34 funktionelle und pflanzenspezifische „MapMan“-Gruppen (sog. „BIN’s“) eingeteilt. Diese 34 BINs können hierarchisch weiter in subBINs untergliedert werden. So kann BIN 1 (Photosynthese) in die spezifischeren subBIN’s 1.1 (PS.lightreaction) oder subBIN’s 1.3 (PS.calvin cycle) unterteilt werden. Die Informationen hierfür befinden sich in einer sogenannten „Mapping-Datei“. Einen Überblick über die Verteilung der funktionellen Gruppen des hier verwendeten Makroarray verdeutlichen Abbildung 3.16 und die Tabelle A.2 im Anhang. Die Annotations-Parameter wurden stringent gewählt, um eine möglichst hohe Genauigkeit zu gewährleisten. Zusammenfassend lässt sich sagen,

dass der Makroarray eine Vielzahl von funktionellen Gruppen umfasst und geeignet ist, Kältestressreaktionen zu untersuchen.

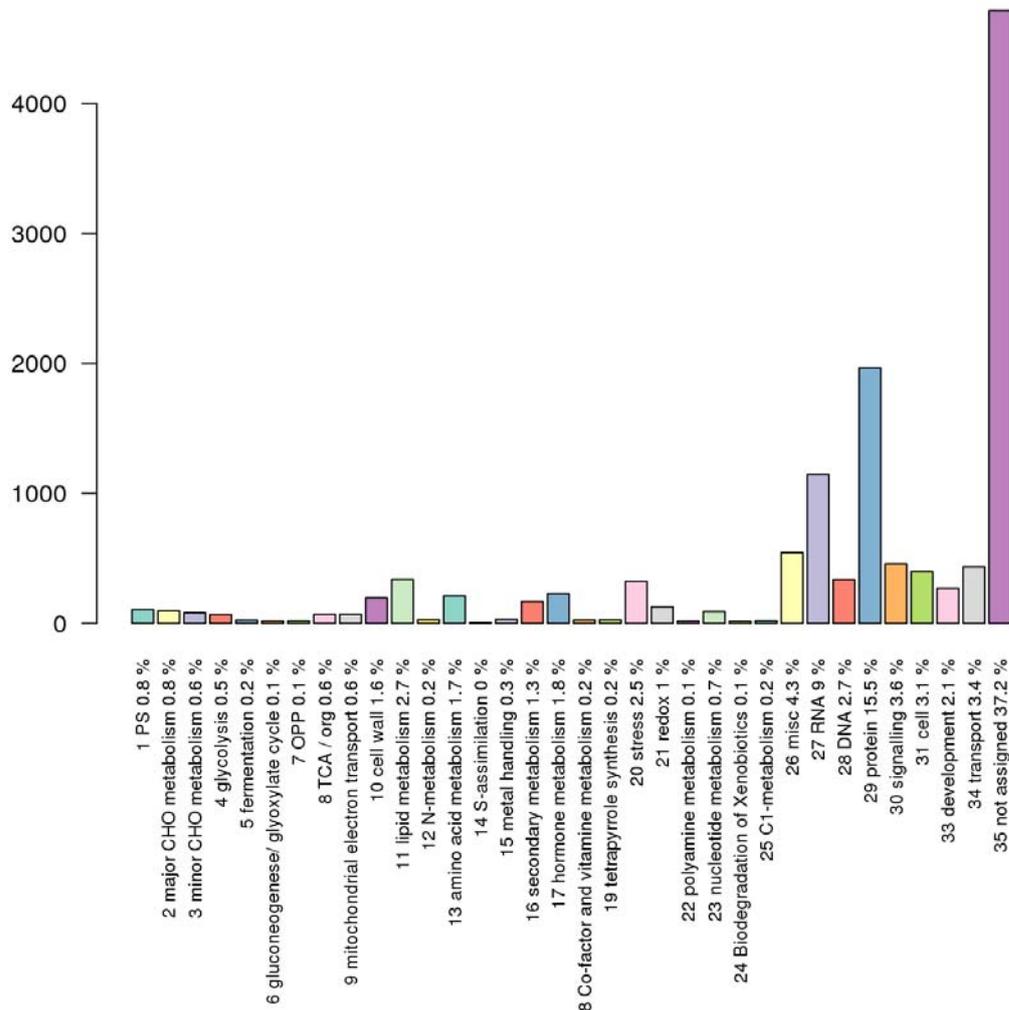


Abbildung 3.16 – Übersicht über die funktionelle Einordnung mittels dem hierarchischen „Map-Man“ BIN-Systems für die cDNA-Proben des Makroarrays. Der größte Anteil (37,6%) der Sequenzen wurde in BIN 35 klassifiziert. Der BIN umfasst Gene, deren Zuordnung nicht möglich war oder für Proteine kodieren, die unbekannte Funktionen aufweisen. Weitere BIN's mit vielen Einträgen sind Protein (15,5%) und RNA (9,0%). Zu beachten ist, dass rund 2,5% der cDNA-Proben zu BIN 20 eingeordnet wurden. Dieser BIN umfasst Gene, die spezifisch mit Stressreaktionen im Zusammenhang stehen. Rund 600 Gene besitzen multiple Zuweisungen zu unterschiedlichen BIN's, da diese in mehreren Stoffwechselwegen aktiv sind. Die anderen Gene verteilen sich mit recht ähnlichen Anteilen in die restlichen BIN's. PS, Photosynthese; CHO, Kohlenhydrat; OPP, oxidative Phosphorylierung; TCA, Tricarbonsäurezyklus. y-Achse: Anzahl von Genen.

3.3.5. Anzahl differentiell exprimierter Gene in Roggen, Weizen und Gerste während der Kälteakklimatisierung

Um den Rauschanteil zu minimieren, wurden jeweils die stärksten 2000 Regulationsereignisse (1000 induzierte und reprimierte Gene) betrachtet. Dabei wurden die Induktions- bzw. Repressionsfaktoren über die Zeit summiert. Die Tabelle A.3 gibt einen Überblick über die Verteilung der regulierten Gene an den Zeitpunkten und deren Kombinationen, sowie die Einteilung in induzierte und reprimierte Genexpressionen. Die Zeitpunktkombinationen beinhalten Einträge, bei denen Gene an mehreren Zeitpunkten differentiell exprimiert sind und detektieren daher umfassende, langsam ablaufende physiologische Veränderungen. Aus der Tabelle geht hervor, dass bei allen drei Arten am Tag 7 die höchste Aktivität in der Genregulation detektierbar ist. Einige Gerstekultivare zeigen eine größere Anzahl permanent induzierter bzw. reprimierter Gene. Dies zeigt eine deutliche genotypisch geprägte Variabilität temporärer Expressionsmuster. Wie bereits in Abschnitt 3.3.4 erwähnt, wurden alle Gene auf dem Makroarray klassifiziert und in 34 funktionelle Kategorien eingeteilt. Es wurde zunächst auf die Einteilung in induzierte und reprimierte Gene verzichtet. So sind bei allen Kultivaren die Photosynthese oder der Kohlenhydratstoffwechsel I die am stärksten regulierte Kategorie (Abb. 3.17). Funktionelle Kategorien des Primärstoffwechsels zeigen starke Regulationsereignisse in allen drei Arten: der Kohlenhydratstoffwechsel I, bei dem rund ein Drittel der Gene eine kältere regulierte Expression in allen *Triticaceae* aufweisen. Besonders in dieser Kategorie zeigen die Weizenkultivare die stärkste Regulation. Der Polyamin-Stoffwechsel ist von der kältere regulierten Genexpression ebenfalls speziesabhängig reguliert: bei den Roggen- und Weizenkultivaren sind 27% bzw. 30% und bei den Gerstekultivaren sind sogar 37% der Gene betroffen. Ebenfalls deutliche Unterschiede sind bei der Tetrapyrrolsynthese

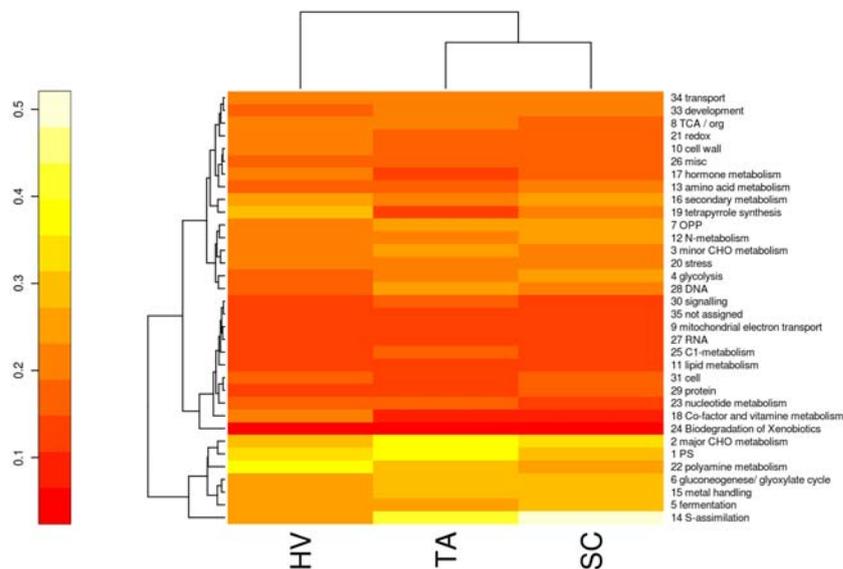


Abbildung 3.17 – Hierarchisches Clustern der Mittelwerte aus differentiell regulierten Genen zur Anzahl aller Gene einer funktionellen Gruppe von *Secale cereale* (SC), *Triticum aestivum* (TA) und *Hordeum vulgare* (HV). Zur besseren Übersicht wurden Kategorien mit weniger als 25 Einträgen (insg. 7) nicht in die Analyse mit einbezogen. Im Anhang sind die Werte tabellarisch zusammengefasst (Tab. A.4). Primärstoffwechsel wie Photosynthese oder Kohlenhydratstoffwechsel zeigen starke Regulationen.

zu finden: Roggen- und Weizengenotypen exprimieren 23% bzw. 16% der Gene dieser funktionellen Kategorie differentiell, Gerstegenotypen hingegen 29%. Funktionelle Kategorien mit ähnliche Anteilen differentiell exprimierter Gene zwischen den Arten sind z.B. RNA, DNA, Protein, Transport, Entwicklung und „Unbekannt“. Die Anzahl induzierter bzw. reprimierter Gene bei jedem Genotyp und in jeder funktionellen Kategorie wird in den Abbildungen 3.18 bzw. 3.19 gezeigt.

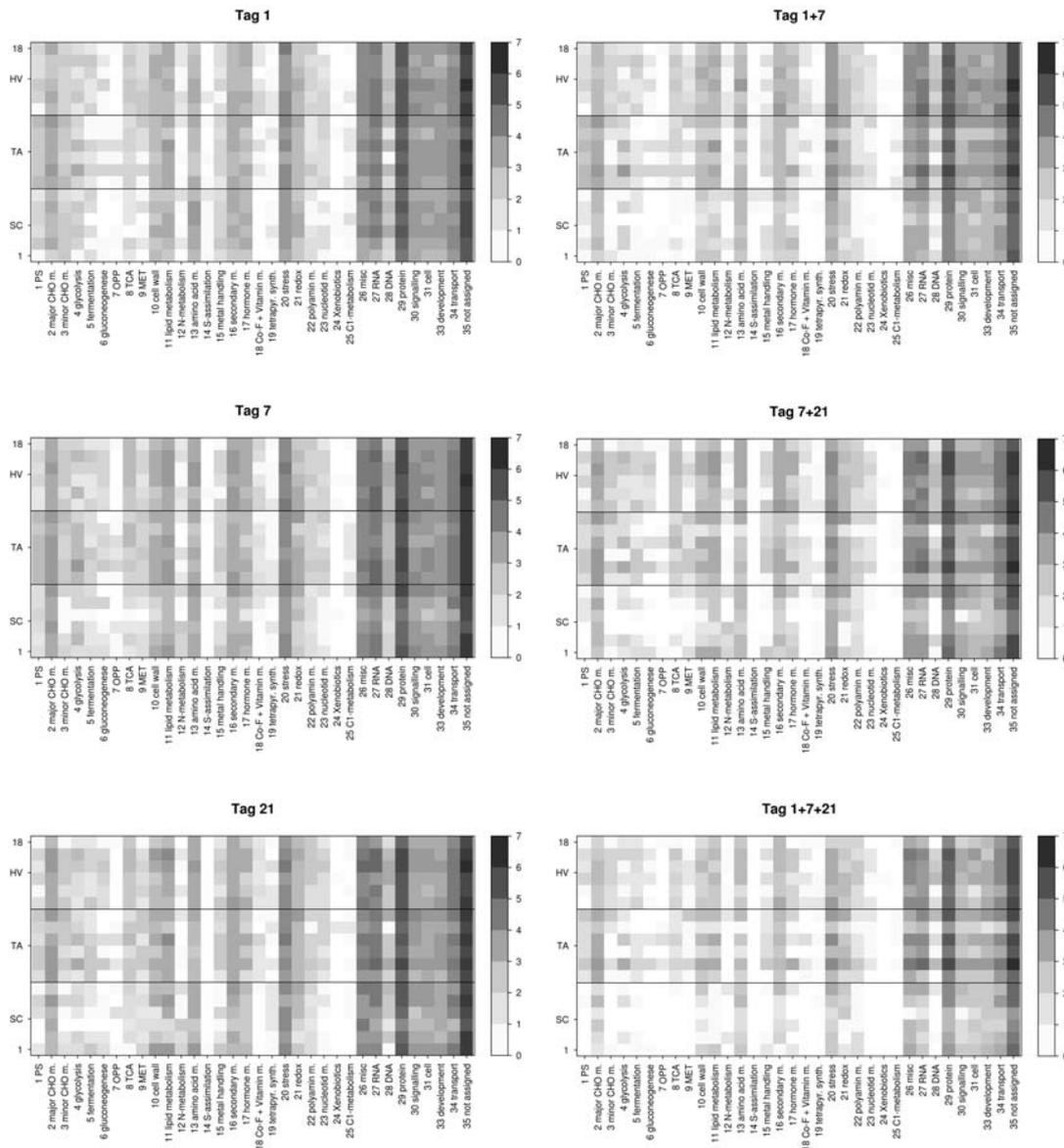


Abbildung 3.18 – Induzierte Genexpression an einzelnen Zeitpunkten (links) und Zeitpunktkombinationen (rechts). Abgebildet ist die Log₂-Anzahl induzierter Gene bei *Secale cereale* (SC), *Triticum aestivum* (TA) und *Hordeum vulgare* (HV). Funktionelle Kategorien des Kohlenhydratstoffwechsels, der Aminosäuren, des Stresses, der Redoxregulation, des Transportes, der „Sonstigen“ und „Unbekannten“ weisen eine konstant hohe Anzahl induzierter Transkripte über den gesamten Zeitraum auf. Dabei kommt es zu genotyp- und speziesspezifischen Einflüssen bei induzierter bzw. reprimierter Genexpression: Weizenkultivare induzieren im Unterschied zu den anderen Kultivaren eine geringe Anzahl von Photosynthesegenen.

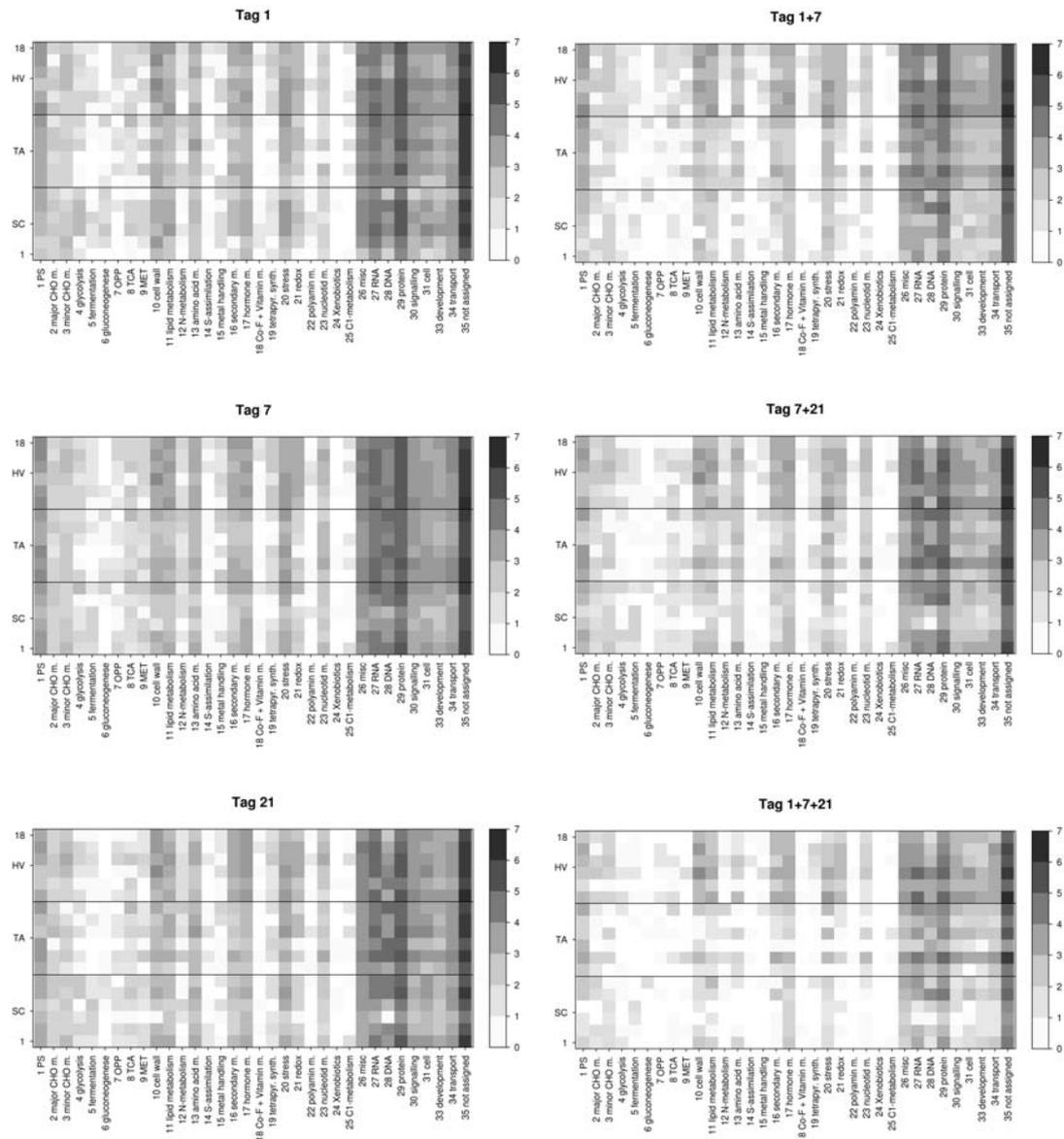


Abbildung 3.19 – Reprimierte Genexpression an einzelnen Zeitpunkten (links) und Zeitpunktkombinationen (rechts). Abgebildet ist die Log₂-Anzahl reprimierter Gene bei *Secale cereale* (SC), *Triticum aestivum* (TA) und *Hordeum vulgare* (HV). Zu einer permanenten Repression kommt es in den Kategorien Photosynthese, Zellwand, Lipid-Metabolismus und DNA. Sowohl eine hohe Anzahl induzierter als auch reprimierter Gene weisen auf eine dynamische Regulation bei RNA, Protein und „Unbekannt“ hin. Die umfassende Kategorie „Unbekannt“ zeigt sowohl bei den induzierten als auch bei den reprimierten Genen eine hohe Anzahl regulierter Gene auf.

Die Analyse erlaubt es, gezielt, die von der Kälteakklimatisierung am stärksten in Bezug auf Genregulation betroffenen, funktionellen Kategorien genotypspezifisch zu bestimmen. Anhand der Intensitäten erkennt man deutlich die wichtigsten Veränderungen in der Dynamik des Transkriptoms der *Triticeae*. Die Darstellung gibt Aufschluss darüber, wie die Genregulation der einzelnen Genotypen vollzogen wird. Erkennen sind synchronisierte Veränderungen in der Genregulation der funktionalen Kategorien Pho-

tosynthese, Kohlenhydratstoffwechsel, Zellwand, Aminosäuren, Stress, Redox, RNA, DNA und Protein.

Für die Erstellung einer Consensusliste speziesspezifischer Genexpression während der Kälteakklimatisierung und für die spätere Korrelationsanalyse werden Gene entsprechend ihrer differentiellen Expression an den Einzelzeitpunkten gezählt. Mit Hilfe von Venn-Diagrammen können die Schnittmengen zwischen den einzelnen Zeitpunkten übersichtlich dargestellt werden (Abb. 3.20). Besonders in der Frühphase und Spätphase der Kälteakklimatisierung kommt es zu Unterschieden bei der Anzahl der differentiell exprimierten Gene.

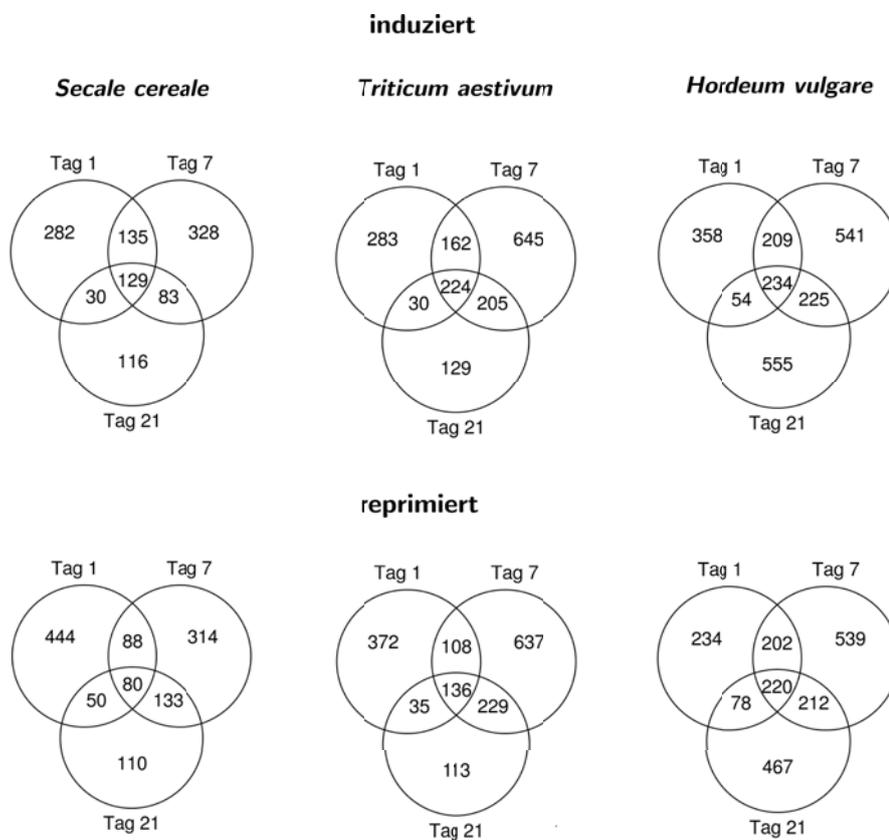


Abbildung 3.20 – Venn-Diagramme für induzierte und reprimierte Gene, die einen Gen-Score von ± 3 aufweisen. Die Genexpression wird in der Anfangsphase bei allen drei Arten ähnlich stark induziert (283-358). Bei *Triticum aestivum* und *Hordeum vulgare* kommt es in der mittleren Phase zu einer hohen Anzahl induzierter Gene. Bei *Hordeum* wird eine kontinuierlich hohe Anzahl induzierter Gene bis in die Spätphase der Kälteakklimatisierung (555) beobachtet. Bei den beiden anderen Arten hingegen werden deutlich weniger beobachtet (116 und 129). Bei den toleranteren Arten *Secale cereale* und *Triticum aestivum* kommt es in der Frühphase zu einer umfassenderen Repression (444 bzw. 372 zu 234 in Gerste). In der Spätphase der KA weist *Hordeum vulgare* noch weitreichende Genregulationen auf. Die Anzahl der permanent induzierten Gene bei *Secale cereale* ist im Vergleich zu den anderen *Triticeae* um etwa die Hälfte reduziert.

3.3.6. Anreicherungsanalyse für differentiell exprimierte Gene funktioneller Kategorien zu verschiedenen Zeitpunkten der Kälteakklimatisierung

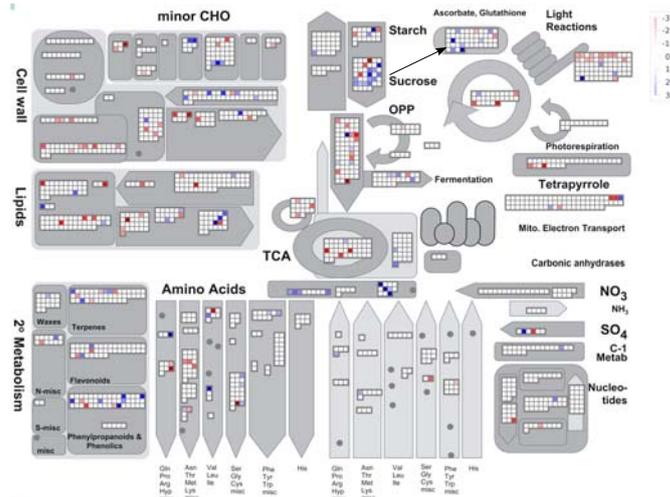
Der Zweck einer Anreicherungsanalyse ist die Beschreibung, zu welchem Zeitpunkt oder welcher Zeitpunktkombination eine Über- bzw. Unterrepräsentation einer funktionellen Gruppe bei induzierten oder reprimierten Genen statistisch signifikant beobachtet werden kann. Der Exakte-Test von Fisher dient dem Vergleich zweier relativer Häufigkeiten und eignet sich auch für kleinere Stichproben. Er wird hier als Signifikanztest für die Anreicherungsanalyse genutzt. Die genotypspezifische Analyse (Tab. A.9-A.42) zeigt, in welchem Umfang eine genotypgeprägte und temporal unterschiedliche Genexpression zu detektieren ist. Die genotypische Varianz der Genexpression basiert auf den 1000 am stärksten induzierten und reprimierten Genen (2000 pro Genotyp). Die Ergebnisse werden zusammen mit der speziesspezifischen Analyse in den Abschnitten 3.3.6.2-3.3.6.27 beschrieben. Bei der speziesspezifischen Analyse soll geklärt werden, ob es funktionelle Gruppen gibt, die in den Spezies bevorzugt differentielle Genexpressionen aufweisen.

3.3.6.1. Übersicht: Metabolismus

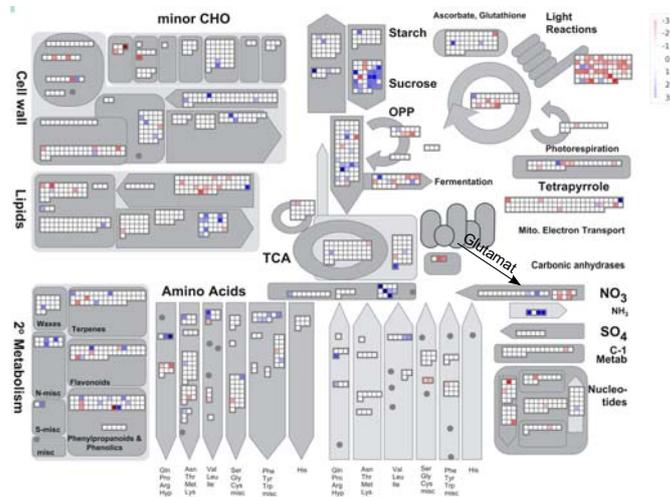
Die MapMan-Anwendung kann genutzt werden, um z.B. die FC-Werte in den funktionellen Kategorien darzustellen. Dazu wurde der arithmetische Mittelwert der FC-Werte pro Spezies berechnet und logarithmiert (zur Basis 2). In den Abbildungen 3.21-3.23 weisen die so symbolisierten Transkripte mindestens einen Bewertungspunkt (Gen-Score) von ± 3 auf. Symbolisierte Induktionswerte sind in blau und Repressionswerte in Rot dargestellt. Die Analyse erlaubt, die wichtigsten physiologischen Veränderungen während der Kälteakklimatisierung zu erfassen.

Secale cereale
Metabolismus

Tag 1



Tag 7



Tag 21

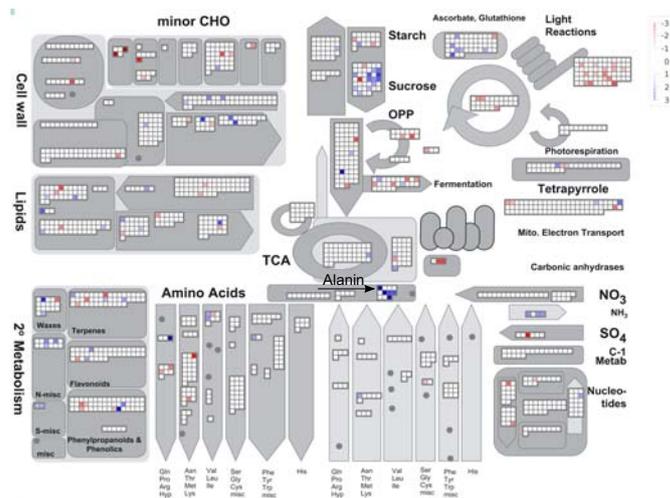
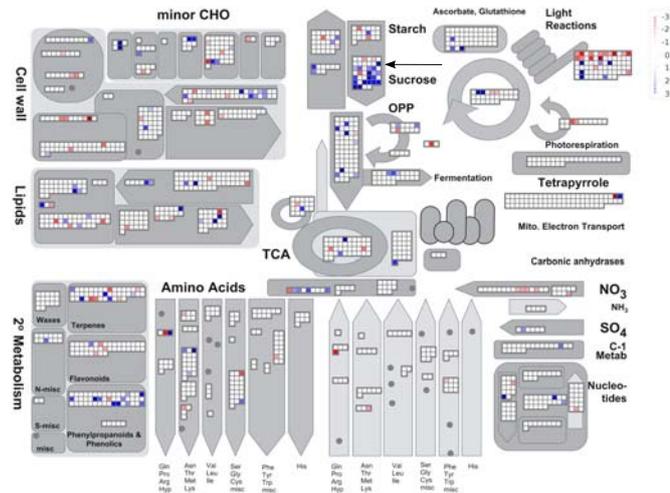


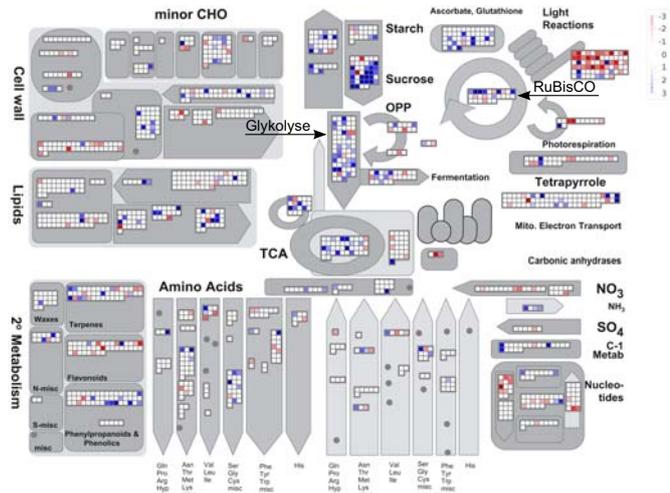
Abbildung 3.21 – Metabolismus *Secale cereale*. Bei Roggen kommt es zu einer raschen Induktion des Ascorbat- und Gluthationsystems (Tag 1, Pfeil). Glutamat-Dehydrogenasen werden transient am Tag 7 hochreguliert. Der Alanin-Stoffwechsel bleibt bis in die Spätphase induziert. Im Vergleich zu den beiden anderen Spezies kommt es zu einer weniger starken Repression der Photosynthese.

Triticum aestivum
Metabolismus

Tag 1



Tag 7



Tag 21

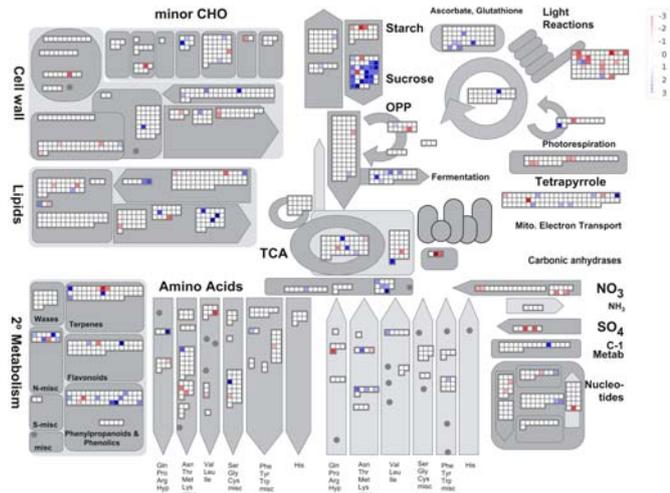
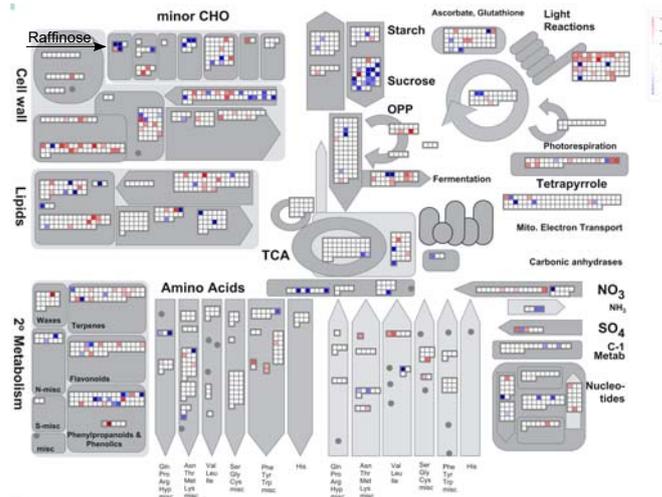


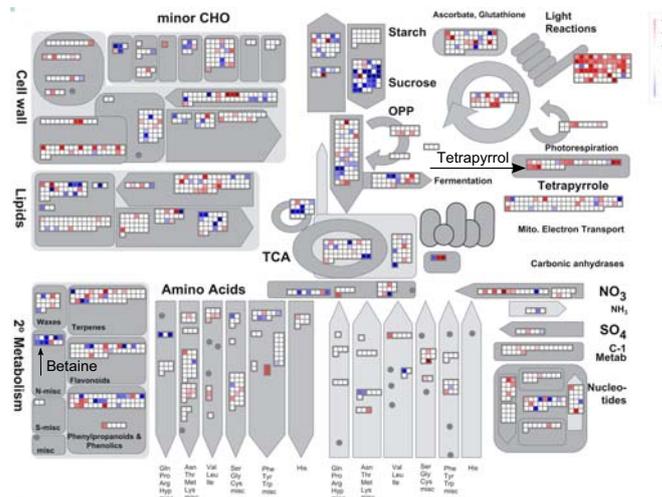
Abbildung 3.22 – Metabolismus *Triticum aestivum*. Der Saccharose-Stoffwechsel wird bei Weizen ausgeprägter und lang anhaltender induziert als bei den anderen Spezies. Die Glykolyse und die nachgeschalteten Stoffwechselwege werden gleichermaßen hochreguliert. Transkripte der RuBisCO werden sehr stark am Tag 7 exprimiert. Die Repression der Photosynthese ist am prägnantesten bei Weizen.

Hordeum vulgare
Metabolismus

Tag 1



Tag 7



Tag 21

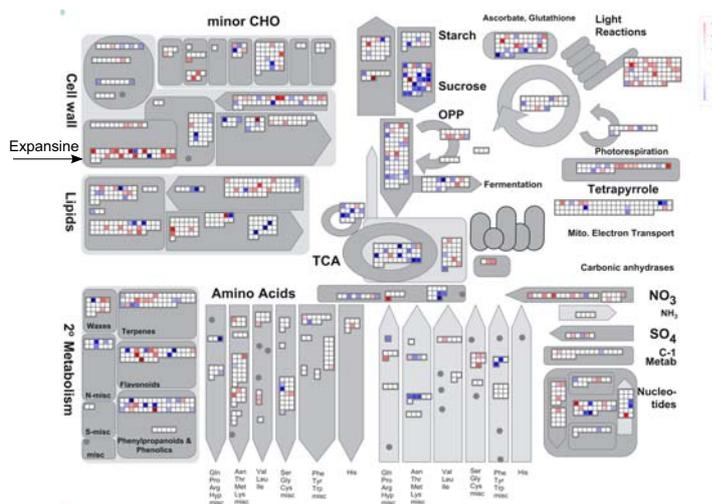


Abbildung 3.23 – Metabolismus *Hordeum vulgare*. Zu umfangreichen Veränderungen während der Kälteakklimatisierung kommt es bei Gerste. Dazu zählt neben der Repression der Photosynthese auch die Induktion des Kohlenhydrat-Stoffwechsels. Die Repression der Photosynthese geht einher mit der Repression der Gene für die Tetrapyrrol-Synthese am Tag 7. Am Tag 1 werden Gene der Raffinose-Synthese stark differentiell exprimiert. Eine sehr starke Induktion wird auch in der Betain-Synthese erfasst. In der Spätphase werden Transkripte der Expansine charakteristisch herunterregliert.

3.3.6.2. Photosynthese

Genotypen Die Photosynthese wird bei allen Genotypen über mehrere Zeitpunkte signifikant herunterreguliert. Bei der Mehrheit der Genotypen wird eine Repression der Photosynthesegene (31% *Ta cv.* Uljanovka, $P = 3 \times 10^{-15}$) bereits in der Frühphase bis zum Tag 7 erfasst. Bei den drei tolerantesten Roggen- und Gerstekultivaren kommt es zu einer weniger stark ausgeprägten Repression. Bei den toleranten Weizenkultivaren dagegen kommt es zu einer verstärkten Repression, die über den gesamten Zeitraum signifikant bleibt. Nur bei wenigen Genotypen wird eine permanente Genrepression erfasst (z.B. *Ta. cv.* G.K. Tiszatáj $P = 9 \times 10^{-07}$).

Spezies Mit 107 Einträgen ist die Kategorie in Lichtreaktion, Calvin-Zyklus und Photorespiration untergegliedert. Eine konservierte Repression wird vor allem bei Chlorophyll-A/B-Bindeproteinen und anderen Proteinen des Lichtsammelkomplexes II (LHC II) beobachtet: der speziesspezifische Fisher-Test indiziert eine Überrepräsentation reprimierter Gene des Lichtsammelkomplexes II und dessen Polypeptid-Untereinheiten des PS II bei *Secale cereale* ($P = 0.001$), besonders signifikant bei *Triticum aestivum* ($P = 4 \times 10^{-16}$) und *Hordeum vulgare*. Auffällig divergent reguliert sind z.B. induzierte Gene für ein Protein des Reaktionszentrums des PS II und der ATP-Synthase C¹ bei *Triticum aestivum* und *Hordeum vulgare*. *Secale cereale* und *Triticum aestivum* induzieren zusätzlich eine Untereinheit des PS II². Induziert wird die große Untereinheit von Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase³ in *Triticum aestivum* und weniger stark ausgeprägt in *Hordeum vulgare*. Die Roggeninzuchtlinien induzieren den Elektronenüberträger Ferredoxin⁴, dessen Expression in den beiden anderen Arten unverändert bleibt. Am Tag 7 werden die niedrigsten p-Werte bei allen Spezies für die Photosynthese erreicht (Abb. 3.24). Zu den signifikantesten Änderungen gehört die Repression von Polypeptiden⁵ des PS I, die bei Roggen signifikant akkumuliert ist (Tag 7, $P = 0.025$). Es kommt ebenfalls zur Repression von weiteren Bestandteilen des PS II bspw. die des Sauerstoffentwickelnden-Komplexes⁶ bei allen *Triticeae*. Am Tag 21 wird eine Normalisierung in Relation zu Tag 0 jener Kategorien beobachtet, die drastische Änderungen erfahren haben: die Repression der Photosynthese (Lichtreaktion) wird gemildert, so dass beide Reaktionszentren vergleichsweise wenige reprimierte Gene in den *Triticeae* aufweisen. Besonders die Transkriptabundanz der Chlorophyll-A/B-Bindeproteine im Lichtsammelkomplex II erhöht sich bei *Secale cereale* und *Hordeum vulgare* im Vergleich zu Tag 7. Bei den Weizenkultivaren und auch bei einigen Roggengenotypen kommt es weiterhin zu hochsignifikanten Anreicherungen reprimierter Gene (Tag 21 $P = 9 \times 10^{-07}$ bzw. $P = 9 \times 10^{-09}$), bei der Mehrheit der Weizengenotypen sogar über den gesamten Zeitraum (Tag 1+7+21 $P = 9 \times 10^{-07}$). Die Repression des PS I wird bei *Secale cereale* und *Hordeum vulgare* weitgehend vermindert, verbleibt aber beim Ersteren statistisch signifikant ($P = 0.015$).

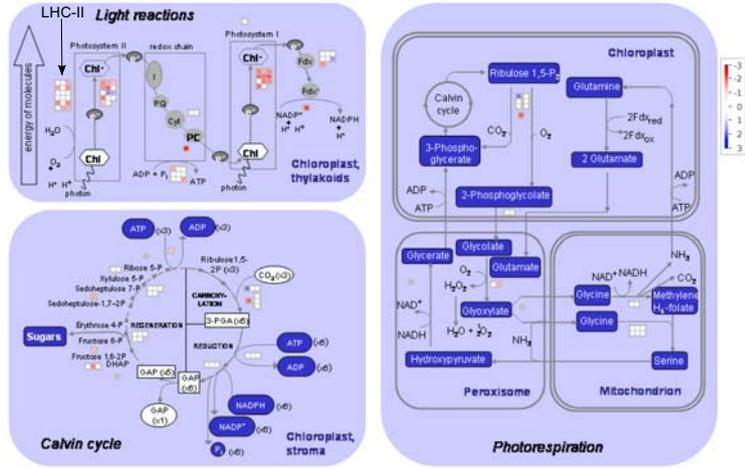
3.3.6.3. Kohlenhydrat-Stoffwechsel I

Genotypen Bereits am Tag 1 werden zwischen 5-19% der Gene bei allen Genotypen differentiell reguliert. Das Maximum der Genexpression wird am Tag 7 erreicht, an

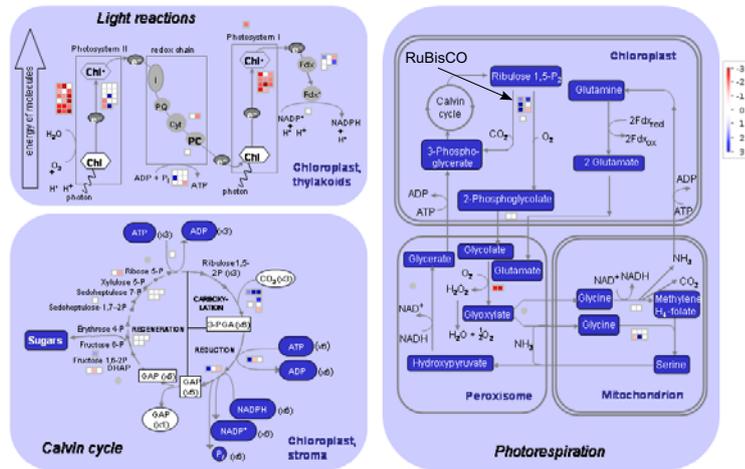
¹ HA14P07, HB16C04, HZ51K03, HB25K03 ² PSB28-Protein, HZ51K03 ³ HA23M03, HY01G14
⁴ HZ45C05 ⁵ HZ40N13, HA18H17, HZ58E05, HA02C10, HA25B19, HA09K16, HZ63B05 ⁶ HA13C02, HZ52G10

Photosynthese (Tag 7)
Primärer Metabolismus

Secale cereale



Triticum aestivum



Hordeum vulgare

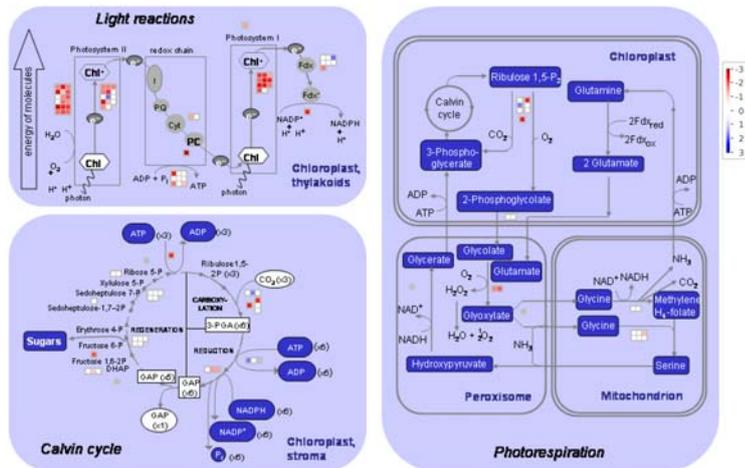


Abbildung 3.24 – Photosynthese (Tag 7). Die Photosynthese wird in allen *Triticeae* am Tag 7 signifikant herunterreguliert. Betroffen sind Polypeptide des Photosystem I und II. Transkripte des LHC-II (Pfeil) bei Roggen werden weniger stark herunterreguliert. Bei Weizen wird eine starke Induktion von Untereinheiten der RuBisCO beobachtet.

dem 13-26% der Gene induziert vorliegen. Die Anreicherungsanalyse zeigt bei den Weizenkultivaren eine hohe Signifikanz über alle Zeitpunkte (bis $P = 8 \times 10^{-08}$, am Tag 1 bis $P = 2 \times 10^{-05}$). Gerstekultivare weisen zum Tag 1 nur wenige signifikante Anreicherungen dieser funktionellen Gruppe auf. Bei den Roggenlinien hingegen kommt es bereits zum selben Zeitpunkt bei fast allen Genotypen zu einer statistischen Anreicherung induzierter Gene. Die Aktivierung des Kohlenhydrat-Katabolismus geht mit der Aktivierung der Glykolyse in der mittleren Phase einher. Eine fast vollständige Normalisierung der Transkriptabundanz wird dann später bei Roggen und Weizen beobachtet.

Spezies Die funktionelle Kategorie (97 Einträge) umfasst den Anabolismus und Katabolismus von Saccharose und Stärke. Stark konserviert ist die Induktion des Stärke-Saccharose-Metabolismus. Bei allen drei Spezies kommt es am Tag 1 zu einer Anreicherung der Multigenfamilie der Saccharose-Synthasen (*Triticum aestivum* $P = 3 \times 10^{-06}$), die den Abbau von Saccharose zu UDP-Glucose bzw. deren Umkehrreaktion katalysieren. Bei *Triticum aestivum* wird bei der gesamten funktionellen Gruppe eine statistische Signifikanz einer induzierten Genexpression beobachtet ($P = 5 \times 10^{-05}$). Verschiedene Saccharose-Synthase Isoformen werden in allen drei Arten auf hohem Niveau am Tag 7 induziert¹, wobei *Triticum aestivum* alleinig mehrere Isoformen² reguliert. Eine besonders ausgeprägte Geninduktion am Tag 7 (Abb.3.25) ist bei *Triticum aestivum* und *Hordeum vulgare* zu erkennen, die bis in die Spätphase signifikant bleibt ($P = 2 \times 10^{-06}$ bzw. $P = 8 \times 10^{-04}$). Alle *Triticeae* zeigen signifikante Anreicherungen über alle Zeiträume auf, am deutlichsten bei *Triticum aestivum* (Tag 1+7+21 $P = 9 \times 10^{-09}$). Eine speziesspezifische Aktivierung wird bei mehreren Invertasen³ in allen drei Arten beobachtet, die bei *Secale cereale* und *Triticum aestivum* besonders stark ist ($P = 0.008$ bzw. $P = 2 \times 10^{-04}$). Die für die Saccharose-Synthese involvierten Transkripte der Saccharose-Phosphat-Synthase (SPS) und der cytosolischen Fructose-1,6-Bisphosphatase werden besonders bei *Triticum aestivum* am Tag 1 bzw. Tag 7 verstärkt induziert. Zusätzlich wird die Genexpression von α - bzw. β -Amylasen am Tag 1 bei den *Triticeae*⁴ transient aktiviert. Sie verdeutlicht damit einerseits den Bedarf an gespeicherter Energie bzw. Störung der circadianen Genexpression und andererseits den Bedarf von Saccharose und anderen Polysacchariden (Maltose und Glucose) als Osmoprotektant. Eine speziesspezifische Genexpression von Stärke-Synthasen⁵ kann am Tag 7 beobachtet werden. Ein Beispiel für eine konservierte Kältestressantwort der *Triticeae* ist die Induktion einer Fructan-6-Exohydrolase⁶ am Tag 7.

3.3.6.4. Kohlenhydrat-Stoffwechsel II

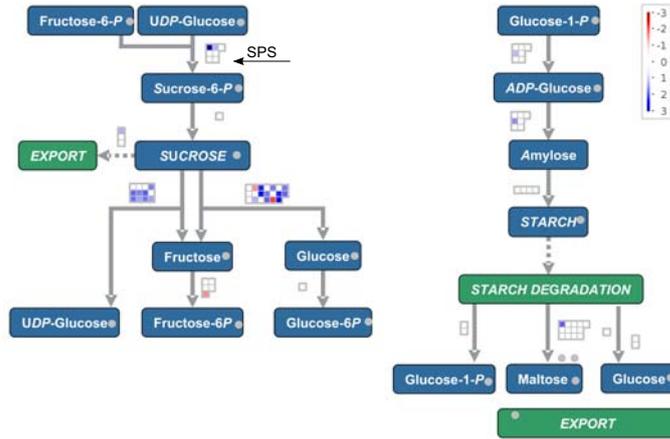
Genotypen Die Genregulation dieser Gruppe ist zumeist transient ausgeprägt. Nur bei einem Gerstegenotyp bzw. Weizengentyp kommt es zu einer signifikanten Überrepräsentation reprimierter bzw. induzierter Gene bei Tag 1 ($P < 0.05$).

Spezies Die funktionelle Einheit umfasst 82 Einträge und ist in die Untergruppen Raffinose-, Trehalose-, Galactose-Biosynthese usw. untergliedert. Am Tag 1 werden Gene des Inositol⁷ und Raffinose-Stoffwechsels⁸ sowie eine Aldose-Epimerase⁹ induziert. Bei

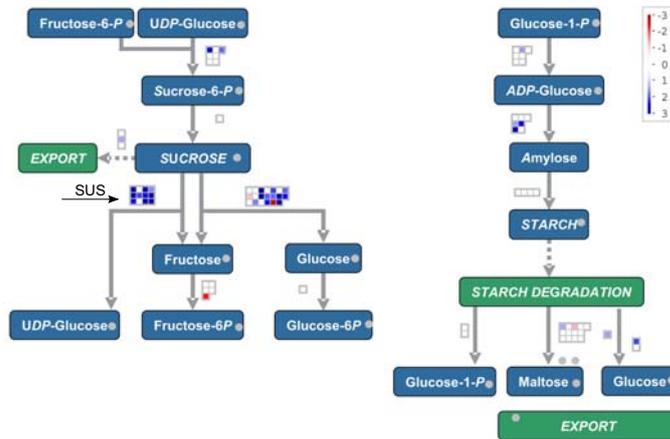
¹ HF11H21, HY05O13 ² HB05N09, HT12J13, HT01D22, HF07C20, HA31O14 ³ HB25B07, HZ44H21, HZ37F12 ⁴ HV02D09, HZ50D04, HG17A10 ⁵ HB05N09, HB02N20 ⁶ HZ01D05 ⁷ HZ62F20
⁸ HT07G15 ⁹ HF12M07

Saccharose/Stärke (Tag 7)
Primärer Metabolismus

Secale cereale



Triticum aestivum



Hordeum vulgare

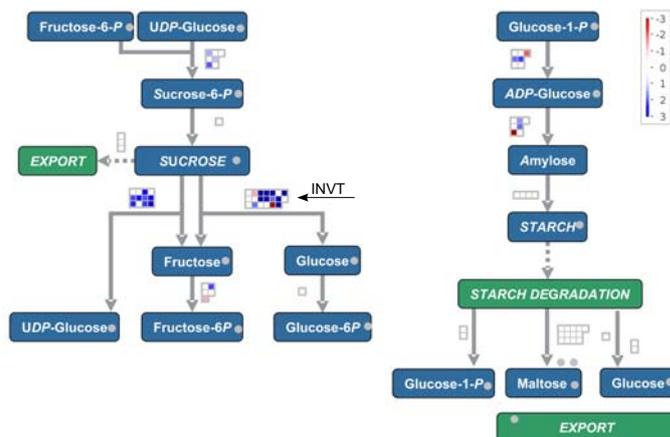


Abbildung 3.25 – Saccharose- und Stärke-Stoffwechsel (Tag 7). Transkripte der Saccharose-Synthasen (SUS) und -Invertasen (INVT) werden konserviert induziert. Eine besonders ausgeprägte Expression kann bei Weizen erfasst werden. Gene der Saccharose-Phosphat-Synthasen (SPS) werden weniger stark hochreguliert.

Secale cereale und *Triticum aestivum* wird eine Aldose-Reduktase¹ ausschließlich induziert. Die konzertierte Expression von putativen Inositol-Triphosphat-Kinasen² in allen drei *Triticeae* weist auf die evolutionär konservierte Rolle in der Signaltransduktion von Inositol-Phosphaten hin. Aktiviert wird bei *Triticum aestivum* und *Hordeum vulgare* der Trehalose-Metabolismus durch die Induktion von putativen Trehalose-Phosphatasen³. Ein weiteres für die Kälteakklimatisierung wichtiges in der Literatur beschriebenes Enzym ist die Raffinose-Synthase⁴, die nur bei *Triticum aestivum* und *Hordeum vulgare* transient exprimiert wird. Hingegen liegt sie bei *Secale cereale* permanent reprimiert vor (Tag 1+7+21, $P = 0.031$). Exklusiv bei *Hordeum vulgare* wird eine isoforme Galactosinol-Synthase⁵ induziert, die die Reaktion von Galactinol zu Stachyose katalysiert, das seinerseits als Osmoprotektant wirkt.

3.3.6.5. Glykolyse

Genotypen Die Geninduktion findet überwiegend am Tag 7 vorrangig bei den Weizenkultivaren statt, bei denen bis zu 26% der Gene differentiell exprimiert werden. Bei einigen Genotypen wird die Genexpression über mehrere Zeitpunkte induziert. (*Ta. cv. Cheyenne* und *Ta. cv. G.K. Tiszatáj*). Eine statistische Anreicherung von induzierten Genen wird bei den erwähnten Weizenkultivaren an mehreren Zeitpunkten beobachtet (*Ta. cv. Cheyenne* izo am Tag 7: $P = 2 \times 10^{-05}$). Eine deutliche Aktivierung wird auch bei den anderen Weizenkultivaren beobachtet, wie die niedrigen p-Werte verdeutlichen. Auffällig ist die moderate Aktivierung der Glykolyse bei zwei Roggeninzuchtlinien.

Spezies Die 68 Einträge der Gruppe umfassen die einzelnen enzymatischen Reaktionen der Glykolyse. Obwohl der speziesspezifische Fisher-Test bei keiner Art eine vermehrte Transkriptabundanz indiziert, vollziehen sich hier grundlegende induktive Regulationen, die spezifisch für die mittlere Phase sind. Eine deutliche Induktion wird bei *Triticum aestivum* (Abb. 3.26) bei Transkripten der Glykolyse⁶, des TCA⁷, des Oxidativen-Pentose-Phosphatweges⁸ und des mitochondrialen Elektronentransportes⁹ beobachtet, die bei den anderen Spezies weniger stark ausgeprägt sind. Es kommt in den *Triticeae* zu einer konservierten Aktivierung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenasen, Pyruvat-Kinasen, Fructose-6-Phosphate-1-Phosphotransferasen¹⁰ und diversen Enolasen.

3.3.6.6. Fermentation

Genotypen Signifikante Überrepräsentationen durch induktive Ereignisse sind bei Weizen- und Gerstegenotypen zu finden. Hingegen kommt es bei mehreren Roggeninzuchtlinien zu signifikanten Anreicherungen reprimierter Gene ($P = 8 \times 10^{-04}$).

Spezies Die funktionelle Kategorie (25 Einträge) ist in die einzelnen enzymatischen Reaktionen eingeteilt: Alkohol-, Lactat- und Aldehyd-Dehydrogenase. Unter an- oder hypoxischen Bedingungen bei Eiseinschluss stellt die Fermentation Energie bereit und produziert als Nebenprodukte die toxischen Metabolite Ethanol, Lactat und Kohlenstoffdioxid.

¹ HB30J07 ² HZ62F20, HF22B12 ³ HS01B18, HP01A07 ⁴ HT07G15 ⁵ HF12G23 ⁶ HY09H16, HF23G15, HX02J16, HS08O12, HY07N13, HA02B04, HS16K08, HT07N06 ⁷ HT01C14, HA25H05, HF02K04, HF21B01, HS18I20, HA11N21 ⁸ HB32M14, HB04H10 ⁹ HU12D08, HZ44L09, HF13P08 ¹⁰ HB08K16

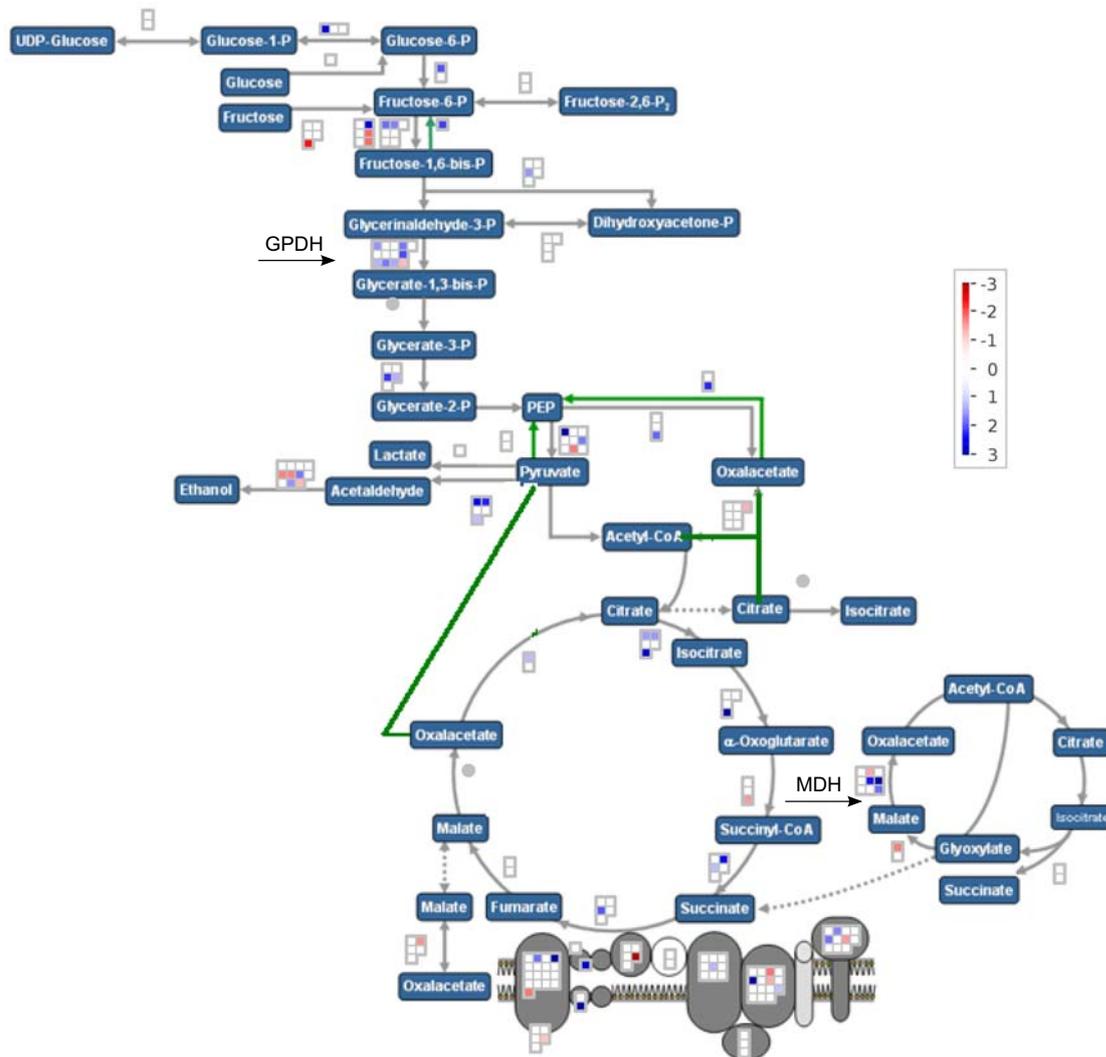


Abbildung 3.26 – Glykolyse und TCA von *Triticum aestivum* (Tag 7). Transkripte der Glykolyse und des TCA werden besonders bei *Triticum aestivum* induziert. Diese Reaktion verdeutlicht den vermehrten Energiebedarf der Pflanzen während der Kälteakklimatisierung. Betroffen sind bspw. Transkripte für Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenasen (GPDH) oder Malat-Dehydrogenasen (MDH) im TCA.

Die speziesspezifische Anreicherungsanalyse zeigt eine statistisch signifikante Anreicherung reprimierter Alkohol-Dehydrogenasen Transkripte bei den Roggeninzuchtlinien ($P = 0.008$), die bis in die Spätphase hineinreicht. Bei den beiden anderen Arten kommt es vorwiegend zu induktiver Genregulation v.a. von Pyruvat-Decarboxylasen¹. Bei *Secale cereale* und *Triticum aestivum* liegt eine differentielle Genexpression (Induktion bzw. Repression) von Alkohol-Dehydrogenasen² vor. Des weiteren wird bei *Hordeum vulgare* die Repression einer Sorbitol-Dehydrogenase³ erfasst.

¹ HF23C05, HT03J20 ² HT08P24, HU10K04, HB27E07, HY01O02, HT01P04 ³ HB04D17

3.3.6.7. Gluconeogenese und Glyoxylatzyklus

Genotypen Der genotypspezifische Fisher-Test zeigt ein signifikantes Ergebnis nach FDR-Korrektur bei einer Roggeninzuchtlinie.

Spezies Die aus 18 Einträgen bestehende Gruppe wird in die einzelnen enzymatischen Reaktionen unterteilt: Malat-Synthasen, Malat-Dehydrogenasen sowie Phosphoenolpyruvat-Carboxykinasen. Der vermehrte Bedarf an Energie während der Kälteakklimatisierung wird durch die Verstoffwechslung von Fettsäuren durch die Gluconeogenese bei den Gerstegenotypen gedeckt. Der speziesspezifische Fisher-Test indiziert für *Hordeum vulgare* eine statistische Anreicherung von Malat-Dehydrogenasen¹ Transkripten in der Spätphase (Tag 7+21, $P = 0.045$).

3.3.6.8. Oxidative Photophosphorylierung, Tricarbonsäurezyklus und Elektronentransportkette

Genotypen Generell werden die Stoffwechselwege in der mittleren und späteren Phase (Tag 7+21) in einigen Gersten- und Weizenkultivare aktiviert, was einige signifikante p-Werte verdeutlichen.

Spezies Der Krebs-Zyklus mit 70 Einträgen ist Teil der Respiration, bei der das in der Glykolyse entstandene Pyruvat zu CO₂ oxidiert wird und die Reduktionsäquivalente (NADH und FADH₂) generiert werden. Bei dem speziesspezifischen Fisher-Test konnten keine signifikanten Ergebnisse berechnet werden. Dies ist auch der Fall für die oxidative Photophosphorylierung und den mitochondrialen Elektronentransport. Mehrere Enzyme werden jedoch speziesspezifisch bzw. in Kombination reguliert. Ein Beispiel für ein *Triticeae*-konserviertes Expressionsmuster ist die permanente Induktion einer Aldehyd-Dehydrogenase². Eine artspezifische Regulation betrifft bei *Hordeum vulgare* eine Succinat-Dehydrogenase³ und das NADP-abhängige Malatenzym⁴. Eine Induktion liegt bei einer Succinat-CoA-Ligase⁵, einer putativen 3-Isopropylmalat-Dehydrogenase⁶, einer Isocitrat-Dehydrogenase⁷ und bei einer putativen Pyruvat-Dehydrogenase⁸ in *Triticum aestivum* und *Hordeum vulgare* vor. Eine deutliche Repression wird bei allen drei Arten in der mittleren Phase von Carboanhydrasen⁹ vollzogen, deren Aktivität aufgrund der inhibierten Photosynthese nicht gebraucht wird. Untereinheiten der mitochondrialen Elektronentransportkette werden ebenfalls konzertiert induziert. So werden eine für die ATP-Synthese wichtige NADH-Dehydrogenase¹⁰ sowie Cytochrom C¹¹ z.T. in allen *Triticeae* induziert.

3.3.6.9. Zellwand

Genotypen Aus der Anreicherungsanalyse lässt sich eine statistische Häufung genotypspezifischer Genrepressionen bei Gerste entnehmen, die z.T. hochsignifikant sind (*Hv. cv. Rex*, $P = 1 \times 10^{-05}$), und bei denen 14% der Gene bis zum Tag 7 reprimiert werden.

¹ HT07K03, HS03G23, HZ42C05, HS06H115 ² HB10D14 ³ HT13A11, HF02H01 ⁴ HZ55B10
⁵ HA11N21 ⁶ HS18I20 ⁷ HT01C14 ⁸ HF02K04 ⁹ HV04N24, HB08N22 ¹⁰ HF14M10 ¹¹ HA11N14

Spezies Die aus 197 Genen bestehende funktionelle Gruppe gliedert sich u.a. in Cellulose-Synthese, Zellwand-Proteine und Zellwand-Abbau. Bereits in der Frühphase werden in *Triticum aestivum* und *Hordeum vulgare* Transkripte für die Synthese von Zellwandvorstufen induziert. Der Fisher-Test zeigt Anreicherungen dieser funktionellen Gruppe bei *Hordeum vulgare* ($P = 0.038$). Das von den Saccharose-Synthasen umgesetzte UDP-D-Glucose kann mithilfe des Rhamnose-Biosynthese-Enzym¹ in UDP-L-Rhamnose metabolisiert werden. Zudem kommt es bei *Hordeum vulgare* zu einer signifikanten Überrepräsentation ($P = 0.032$) reprimierter Gene im Bereich der Zellwandmodifikation (α - und β -Expansine²) und des Zellwandabbaus (Abb. 3.27). Die Repression der zellwandmodifizierenden Enzyme Expansine, einigen Zellwandvorstufen, oder Zellwandproteinen von *Hordeum vulgare* wird bis in die Spätphase aufrechterhalten und unterscheidet sich in dieser Hinsicht deutlich von den anderen Spezies (Tag 1+7+21, $P = 0.013$). Ein weiteres, permanent induziertes und gut charakterisiertes zellwandmodifizierendes Enzym ist die Xyloglucan-Endotransglycosylase (XET), das ebenfalls kontinuierlich in *Hordeum vulgare* induziert vorliegt. In *Secale cereale* kann eine alleinige Gentranskription von einer UDP-D-Glucose Epimerase³ beobachtet werden, die ebenfalls eine Vorstufe für Zellwandbestandteile darstellt. Zu einer konservierten und z.T. permanenten Induktion kommt es bei weiteren Enzymen für die Synthese von Zellwandbausteinen (UDP-D-Glucuronat-Decarboxylase⁴, putativies Protein⁵ mit einer LysM-Domäne). In *Secale cereale* und *Triticum aestivum* wird eine transiente Repression einer putativen Pectin-Acetylerase⁶ detektiert. Eine besondere Expressionsdynamik zwischen den Spezies zeigen UDP-Glucose-Dehydrogenasen⁷, die UDP-D-Glucose und UDP-D-Glucuronsäure (beide Zellwandvorstufen) umsetzen. In der mittleren Phase induzieren alle *Triticeae* diverse Cellulose-Synthase Gene⁸.

3.3.6.10. Lipid-Metabolismus

Genotypen Die Anreicherungsanalyse zeigt wenig signifikante Ergebnisse und deutet darauf hin, dass sich beim Lipid-Metabolismus aufgrund des eingestellten Wachstums nur geringfügige Änderungen in der Transkriptmenge einstellen.

Spezies Die funktionelle Gruppe hat 338 Einträge und lässt sich u.a. in Fettsäure-Synthese, Fettsäure-Desaturasen und Phospholipid-Synthese unterteilen. Auch der speziesspezifische Fisher-Test indiziert beim Lipid-Metabolismus keine signifikanten Ergebnisse. Es kommen jedoch Genregulationen, insbesondere während der Frühphase, vor: eine konservierte Induzierung erfolgt bei der Glycolipid⁹-, Phospholipid-Synthese¹⁰, bei Lipidtransfer-Proteinen¹¹ und bei der β -Oxidation¹². In *Secale cereale* und *Triticum aestivum* (Abb. 3.28) wird zusätzlich eine in der β -Oxidation vorkommende putative Acyl-CoA Thioesterase¹³ am Tag 1 induziert, die erst am Tag 7 in *Hordeum vulgare* induziert wird. In *Triticum aestivum* werden Gene, die in der β -Oxidation¹⁴, Fettsäure-Synthese und -Elongation¹⁵ und im Lipid-Katabolismus¹⁶ vorkommen reprimiert. Beispiel für die synchronisierte Aktivierung der β -Oxidation in den *Triticeae* ist die Induktion eines glyoxysomalen Proteins¹⁷, das in der frühesten Phase (Tag 1) exprimiert wird. Die Transkripte der β -Oxidation (Lipid-Metabolismus) werden in der Spätphase deutlich

¹ HU04C15, HA26N18, HA12M20 ² z.B. HZ42I19, HS17P08, HZ43I17, HR01E04 ³ HB19L11
⁴ HF19D20 ⁵ HZ56C12 ⁶ HV03J15 ⁷ HY03B24, HA24N01, HK06A01, HA31A05 ⁸ HT10H13
⁹ HF09A05 ¹⁰ HV02A09 ¹¹ HZ53I16 ¹² HB21H12 ¹³ HS07N01 ¹⁴ HB09O06 ¹⁵ HZ58N09
¹⁶ HB28B23 ¹⁷ HB21H12

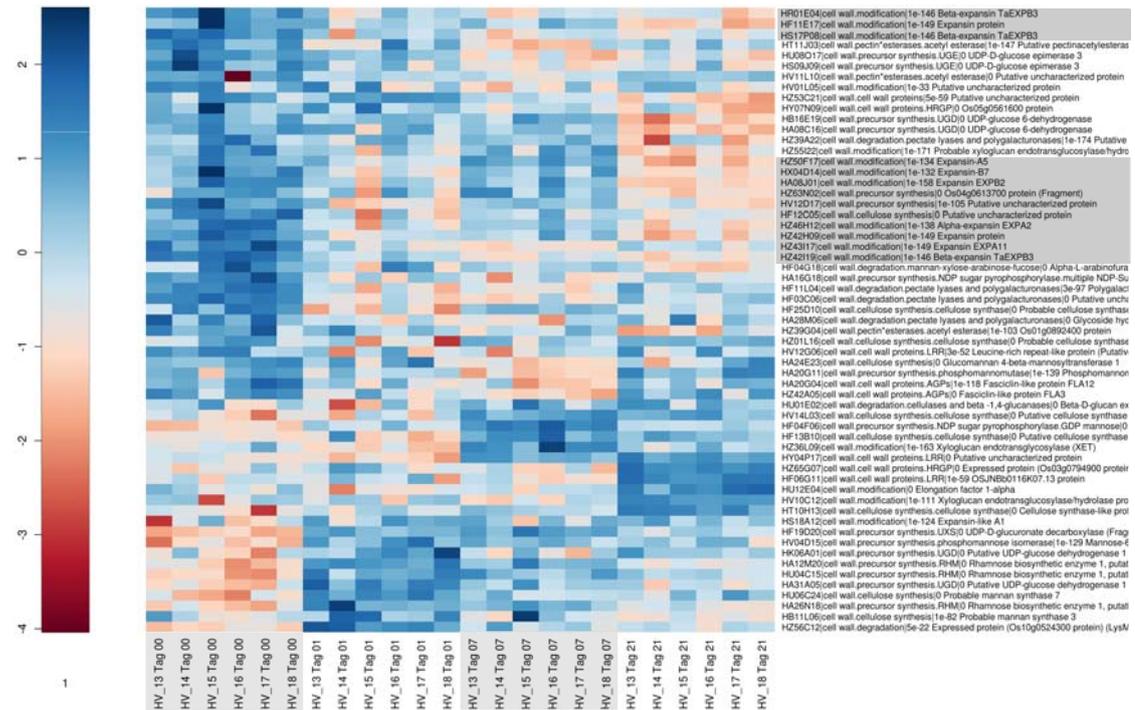


Abbildung 3.27 – Heatmap der Expressionswerte der Kategorie „Zellwand“ bei *Hordeum vulgare* (Tag 0 - Tag 21). Deutlich erkennbar ist die hochgradige Repression der Expansine in der Spätphase der Kälteakklimatisierung (grau hervorgehoben).

herunterreguliert. Wenige Transkripte wie z.B. Desaturasen verbleiben bei *Triticum aestivum* und *Hordeum vulgare* jedoch auf einem hohem Niveau. *Secale cereale* und *Triticum aestivum* reprimieren transient Transkripte der Phospholipid-Synthese¹ und der β -Oxidation². In *Hordeum vulgare* werden eine Lysophospholipase³ und Sphingolipase⁴ exklusiv herunterreguliert. Die Expression der im Lipid-Metabolismus eingeordneten Lipidtransfer-Proteine⁵ (Transporter-Moleküle) erreicht in der Spätphase in den *Triticeae* die höchste Transkriptionsaktivität. Besonders markant ist die Akkumulierung der Transkripte bei *Hordeum vulgare*. *Triticum aestivum* induziert in der Fettsäure-Elongation und -Desaturierung vorkommende Enzyme⁶, die erst in den späteren Phasen bei den anderen *Triticeae* hochreguliert werden. *Hordeum vulgare* induziert exklusiv ein Oleosin⁷ und eine Acyltransferase in der Phospholipid-Synthese⁸. Bei *Secale cereale* und *Hordeum vulgare* werden zugleich Transkripte hochreguliert, die in die Fettsäuresynthese⁹ bzw. -abbau¹⁰ involviert sind.

3.3.6.11. N-Metabolismus

Genotypen Die genotypische Anreicherungsanalyse indiziert zwei signifikante Anreicherungen (Induktion bzw. Repression) der Transkripte bei den Roggen- und Weizengentypen.

¹ HU12I04 ² HS04D02 ³ HZ48F24 ⁴ HF25E0 ⁵ HZ44D24, HA28C17, HZ38P01, HT12K04, HT12M05
⁶ HA10H07, HS01C24 ⁷ HB26I24 ⁸ HV03P11 ⁹ HB13H12 ¹⁰ HZ36J09

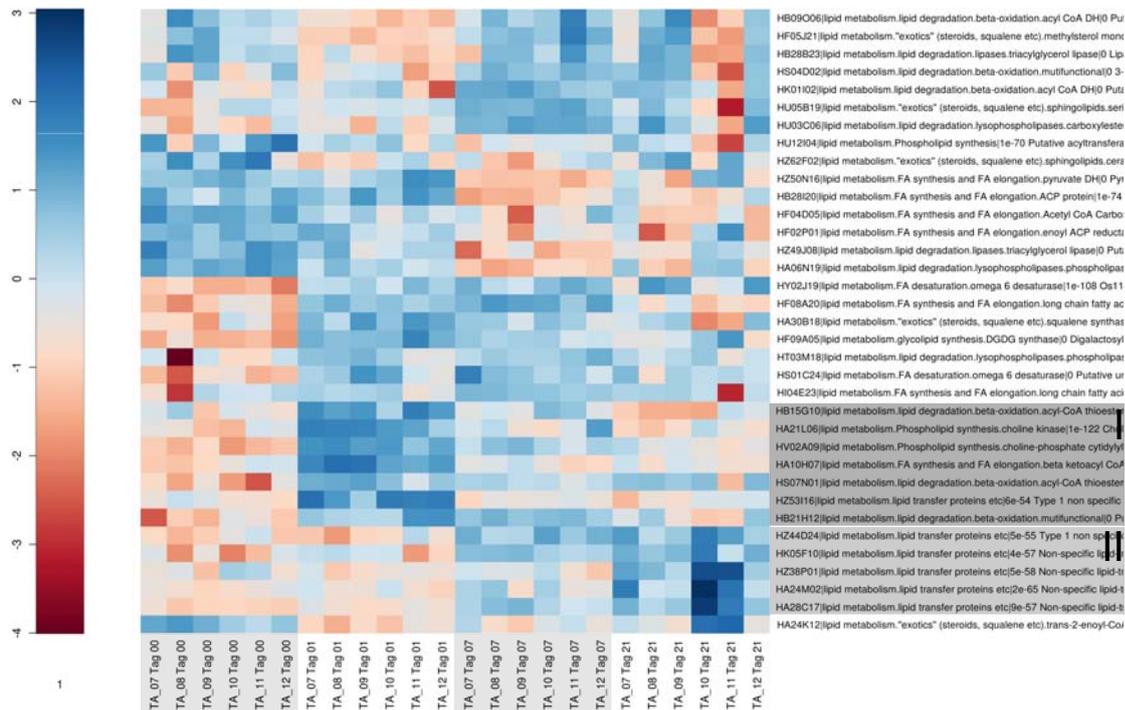


Abbildung 3.28 – Heatmap der Expressionswerte der Kategorie „Lipide“ bei *Triticum aestivum* (Tag 0 - Tag 21). Hervorgehoben sind Cluster für die Induzierung von Genen der β -Oxidation, Phospholipid-Synthese, Fettsäuresynthese (I) und von Lipidtransfer-Proteinen in der Spätphase (II).

Spezies Die funktionelle Kategorie umfasst 12 Einträge, die sich in Nitrat- und Ammonium-Metabolismus einteilen. Bei der speziesspezifischen Analyse hingegen kommt es zu einer signifikanten Häufung der Transkriptabundanz von Glutamat-Dehydrogenasen (GDH, N-Katabolismus) bei *Secale cereale* (bei Tag 7+21, $P = 0.006$), die bis in die Spätphase niedrige p-Werte aufweist. Die Induktion einer isoformen GDH¹ wird auch bei den beiden anderen Arten detektiert, bei denen aber der Signifikanzschwellenwert nicht überschritten wird. Eine Aktivierung der Expression v.a. bei *Secale cereale* wird auch bei Glutamin-Synthasen² erfasst, deren Expression in *Triticum aestivum* inhibiert wird.

3.3.6.12. Aminosäure-Stoffwechsel

Genotypen Die funktionelle Gruppe des Aminosäure-Stoffwechsels zeigt Induktions- und Repressionsereignisse an einzelnen Zeitpunkten. Einige Roggeninzuchtlinien erreichen signifikante Anreicherungen ($P = 0.03$) bei induzierten Genen und verschiedenen Zeitpunkten.

Spezies Die 211 Gene lassen sich in Aminosäure-Synthese und -Abbau gliedern. Signifikante Anreicherungen finden sich bei *Secale cereale* im zentralen Aminosäure-Stoffwechsel (Alanin) sowie bei den Alanin-Aminotransferasen (Tag 7+21, $P = 0.008$ bzw. $P = 0.038$). Die permanente und konservierte Induktion der gut charakterisierten und

¹ HA07A13 ² HV04J18, HB01P06

als Stressmarker bekannten Δ -1-Pyrroline-5-Carboxylat-Synthetase (P5CS)¹ im Prolin-Anabolismus ist erwartungsgemäß zu beobachten (Abb. 3.21-3.23). Es werden unterschiedliche Isoformen zwischen den *Triticeae* spezifisch reguliert. Eine konservierte Antwort besteht in der Induktion von Glutamat-Decarboxylasen² im zentralen Aminosäure-Metabolismus, die bei *Secale cereale* transient sind. Funktionelle Redundanz zwischen den Spezies, z.T. auch zwischen den Genotypen, ist bei den Glutamat-Decarboxylasen (GAD) zu beobachten, bei denen mehrere Isoformen³ induziert werden. Ein ebenfalls divergentes Expressionsverhalten ist in der Biosynthese der Vorstufe Chorismat für die aromatischen Aminosäuren Phe, Tyr und Trp erfassbar. Weitere hochregulierte Gene sind bspw. eine Shikimat-Kinase 1⁴ in *Secale cereale* und *Hordeum vulgare* (Tag 1) und Shikimat-Kinase 2⁵, die ausschließlich in *Secale cereale* aktiviert wird. Bei den *Triticeae* kommt es zu einer synchronisierten Induktion einer S-Adenosylmethionin Synthase 1 im Methionin-Anabolismus. Deutlich ist in *Secale cereale* und *Triticum aestivum* die konservierte Expression einer putativen Serin-Acetyltransferase⁶ (Serin-Glycin-Stoffwechsel). *Secale cereale* induzieren ausschließlich und kontinuierlich eine Acetolactat-Synthase⁷ für die Synthese von Aminosäuren mit verzweigten Seitenketten (Val, Leu und Ile). Ebenfalls in den Roggeninzuchtlinien wird eine Alanin-Aminotransferase⁸ im zentralen Aminosäure-Metabolismus hochreguliert. In der mittleren Phase kommt es bei *Secale cereale* zu charakteristischen Veränderungen im Aminosäure-Metabolismus: neben den bereits induzierten Transkripten in der Frühphase werden sowohl eine Arginase⁹ wie auch eine putative Thiolase¹⁰ im Aminosäure-Katabolismus aktiviert. Eine besonders starke und kontinuierliche Induktion zeigt eine isoforme Alanin-Aminotransferase¹¹, die in der mittleren Phase in *Triticum aestivum* und *Hordeum vulgare* anhaltend induziert wird. Die Kategorie Alanin-Synthese wird jedoch nur bei *Secale cereale* signifikant angereichert (Tag 1+7+21 $P = 0.039$).

3.3.6.13. Metalloproteine

Die Genregulation von Metalloproteinen soll hier kurz erwähnt werden, da es nur zu wenigen – zumeist in der mittleren bis späteren Phase – signifikanten Ergebnissen nach FDR-Anpassung kommt. Zu einer Transkription von Ferritin-Genen¹², die unter oxidativen Stressbedingungen wichtige Aufgaben übernehmen, kommt es bei *Triticum aestivum* und *Secale cereale*.

3.3.6.14. Sekundär-Metabolismus (BIN 16)

Genotypen Man findet signifikante Anreicherungen induzierter Gene bei Roggen- und Gerstegenotypen (Tag 7, $P = 6 \times 10^{-04}$), die bei zwei Roggenkultivaren bereits früh erfassbar sind. Es treten signifikante Anreicherungen induzierter Genexpression am Tag 7 bei vier Gerstegenotypen ($P = 0.01$) auf. Bei den Weizenkultivaren kommt es zu vereinzelt signifikanten Anreicherungen induzierter Gene.

Spezies Die 168 Einträge umfassende Kategorie ist u.a. in Isoprenoid-, Phenylpropanoid- und Flavonoid-Stoffwechsel eingeteilt. Die speziesspezifische Analyse indiziert für

¹ HB14O13 ² HY02N05, HZ47N10 ³ HF08O03, HV10O03 ⁴ HB16E18 ⁵ HF09M05 ⁶ HZ58I12
⁷ HF22F02 ⁸ HY10G24 ⁹ HF09P19 ¹⁰ HF22C21 ¹¹ HF06E08 ¹² HA04K22, HB25I07, HY05I22

den sekundären Stoffwechsel (Abb. 3.29) nur bei *Triticum aestivum* am Tag 1 eine signifikante Anreicherung von Transkripten des gesamten sek. Metabolismus ($P = 0.033$) und der Lignin-Biosynthese (Phenylpropanoide, $P = 0.003$). Bei *Hordeum vulgare* zeigen Anreicherungen reprimierter Gene im gesamten sek. Stoffwechsels am Tag 7 und 21 (Tag 7, $P = 0.026$) sowie des Mevalonat-Stoffwechsels bei Tag 7 ($P = 0.044$). In allen *Triticeae* werden isoforme Gene induziert, die im Isoprenoid-¹ und Phenylpropanoid-Stoffwechsel² (Lignin-Biosynthese) funktionell annotiert sind. *Secale cereale* und *Triticum aestivum* induzieren alleinig mehrere Gene in der Ligninbiosynthese wie z.B. eine Phenylalanin-Ammonia-Lyase³ oder eine Agmatine-Coumaroyltransferase⁴. Allgemein ist die Genregulation der Lignin-Biosynthese in den *Triticeae* sehr divergent ausgeprägt. So werden artspezifisch Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenasen⁵ induziert. Eine Repression bei *Hordeum vulgare* wird in der mittleren und späteren Phase bei Transkripten der Ligninbiosynthese⁶, (Iso)-Flavonoid-⁷ und des Mevalonat-Stoffwechselweges⁸ festgestellt. Zusätzlich werden artspezifisch verschiedene Betain-Aldehyd-Dehydrogenasen⁹ reguliert. Zu einer konservierten Induzierung kommt es bei einem Transkript der Flavonoid-Chalcon-Biosynthese¹⁰, das bereits in der frühen Phase in allen *Triticeae* induziert wird. In der frühen und mittleren Phase werden bei *Triticum aestivum* Transkripte¹¹ induziert, die für die Biosynthese von Tocopherol essentiell sind. Reprimiert werden in *Secale cereale* Transkripte der Flavonol-Synthese¹². Die im Mevalonat-Metabolismus vorkommende Hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A-Synthase¹³ wird bei *Triticum aestivum* herunterreguliert. Außerdem kann die Repression von Transkripten der Lignin-Biosynthese¹⁴ und Wachs-Biosynthese¹⁵ in *Hordeum vulgare* beobachtet werden. In einer konservierten Transkription werden Gene der Betain-Synthese¹⁶ und des Flavonoid-Stoffwechsel¹⁷ (Chalcone, Dihydroflavonol) induziert. Zu einer starken zeitpunktspezifischen Induktion am Tag 7 kommt es bei Betainaldehyd-Dehydrogenasen¹⁸ in *Hordeum vulgare*. Induziert in den *Triticeae* bleiben in der Spätphase sowohl eine Aldehyd-Dehydrogenase¹⁹ der Betain-Biosynthese als auch speziesspezifisch induzierte Transkripte der Tocopherol-Biosynthese²⁰ und des Flavonoid-Stoffwechsels²¹.

3.3.6.15. Hormon-Metabolismus

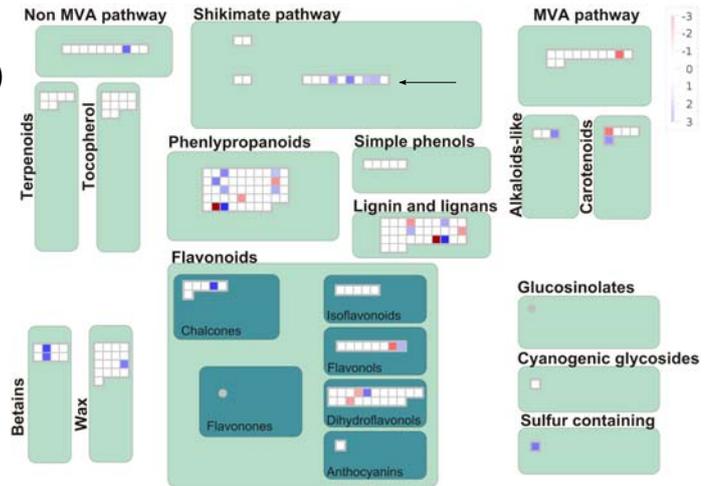
Genotypen Es liegen Anreicherungen an den späteren Zeitpunkten bei Gerste und Roggen bei den reprimierten Genen vor (*Hv. cv. Rex* $P = 0.002$, LP3 $P = 0.019$).

Spezies Die aus 230 Genen bestehende funktionelle Kategorie lässt sich in die verschiedenen Biosynthesewege für Abscisinsäure, Auxin, Brassinosteroide, Salizylsäure etc. einteilen. Die speziesspezifische Analyse des Hormon-Metabolismus zeigt keine Signifikanz nach der FDR-Korrektur. Aufgrund der biologischen Bedeutung sollen aber hier einige spezifische Expressionsmuster vorgestellt werden. Abscisinsäure (ABA) spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Toleranz gegen abiotische Stressbedingungen. So kommt es in allen *Triticeae* zu einer konservierten Repression der in der ABA-Synthese vorkommenden putativen 9-cis-Epoxy-carotenoid-Dioxygenase²². Dies steht im Widerspruch zur geläufigen Annahme, dass die ABA-Synthese während der

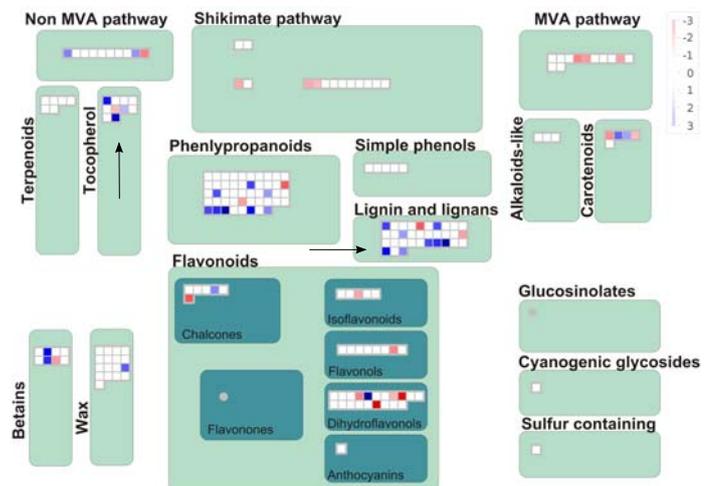
¹ HZ65F24, HM01K08 ² HM04B05, HS05A02, HY04P21 ³ HZ58F14 ⁴ HZ43H20 ⁵ HV13L15, HA12E09 bzw. HT11L08, HM04B05 ⁶ HA11D12, HR01H18 ⁷ HZ65J24 ⁸ HF04A18. ⁹ HB10L24, HF19L16, HF01J01, HS07M01 ¹⁰ HF23B09 ¹¹ HF16H12, HY03F05, HZ49C18 ¹² HV13K06
¹³ HF24D17 ¹⁴ HZ43H20, HA11D12 ¹⁵ HZ41A03 ¹⁶ HF19L16, HF01J01 ¹⁷ HF23B09, HB28L02
¹⁸ HB10L24, HF08H18 ¹⁹ HF01J01, HF19L16 ²⁰ HY03F05, HZ36F12, HF16H12, HF14O16 ²¹ HF23B09
HB28L02 ²² HZ48K08

Sek. Metabolismus (Tag 7)
Übersicht

Secale cereale



Triticum aestivum



Hordeum vulgare

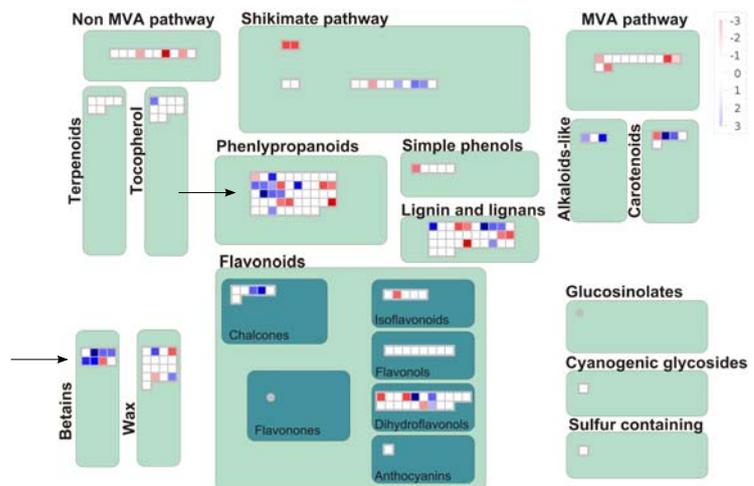


Abbildung 3.29 – Sekundärer Stoffwechsel (Tag 7). Eine konservierte Induktion wird bei den Genen des Phenylpropanoid-Stoffwechsels beobachtet. Hochreguliert werden bei Weizen Gene der Tocopherol- und Lignin-Biosynthese. Eine ausgeprägte Induktion wird von Transkripten des Shikimat-Stoffwechsel bei Roggen detektiert. Transkripte für die Synthese von Betainen werden bei Gerste signifikant angereichert.

Kälteakklimatisierung aktiviert wird. Es kann sich aber hierbei um ein Gen handeln, das für ein isoformes Enzym kodiert. Es ist aber auch möglich, dass bereits das Maximum der Genexpression nicht erfasst werden konnte. Zu einer konservierten Induktion kommt es bei einem ABA-regulierten Protein¹, das für die Frühphase der Kälteakklimatisierung kennzeichnend ist. Die Geninduktion des ABA-regulierten HVA22-Proteins² wird vor allem bei *Triticum aestivum* und *Hordeum vulgare* stark hochreguliert. Eine Zeaxanthin-Epoxidase³ wird bei *Triticum aestivum* besonders stark induziert. Ebenfalls divergent exprimiert werden die in der Jasmonat-Synthese involvierte Allenoxid-Synthase und die Oxophytodiensäure-Reduktase⁴, die in *Secale cereale* bereits in der Frühphase mobilisiert wird. Am Tag 7 werden bei *Hordeum vulgare* Lipoxygenase und Allenoxid-Synthase⁵ (Jasmonat-Metabolismus), die beide pflanzliche Verteidigungsmechanismen induzieren und in die abiotische Signaltransduktion einbezogen sind, induziert. Bei einigen Transkripten anderer Hormone wie z.B. Auxin-, Jasmonat-, Brassinosteroid-Stoffwechsel kann eine kontinuierliche Repression in den *Triticeae* festgestellt werden.

3.3.6.16. Tetrapyrrol-Synthese

Genotypen Es kommt zu signifikanten Überrepräsentation reprimierter Gene bei den Gerstekultivaren am Tag 7 ($P = 0.012$).

Spezies Die funktionelle Gruppe beinhaltet insgesamt 28 Einträge für die Synthese von Vorstufen diverser Redoxverbindungen und Komplexbildner für die Chlorophyllsynthese, für Photorezeptoren oder für Vorstufen der Lichtsammelkomplexe. Die Ergebnisse der genotypischen Anreicherungsanalyse werden gleichermaßen vom speziesspezifischen Fisher-Test verifiziert: es kommt bei *Hordeum vulgare* zu signifikanten Anreicherungen reprimierter Transkripte am Tag 7 ($P = 0.014$). Die Regulation der Transkriptabundanz wird an mehreren an der Biosynthese beteiligten Enzymen deutlich: in den *Triticeae* werden z.B. Aminolävulinsäure⁶ (ALA) und Protochlorophyllid-Reduktase Gene⁷ konserviert reprimiert. Die in der mittleren Phase stark reprimierte Tetrapyrrol-Biosynthese der *Hordeum vulgare* normalisiert sich fast bis auf das Ausgangsniveau. Es verbleiben jedoch einige Gene auf einem niedrigen Transkriptionsniveau.

3.3.6.17. Stress

Genotypen Die genotypspezifische Anreicherungsanalyse zeigt eine stark signifikante Überrepräsentation der Geninduktion bereits am Tag 1 bei der Mehrheit der Genotypen aller *Triticeae* (z.B. *Hv. cv. Rodnik* $P = 2 \times 10^{-06}$). Am Tag 1 sind bei Roggen 6-8%, bei Weizen 6-11% und bei Gerste zwischen 5-13% der Gene induziert. Die Mehrheit der Weizen- und Gerstegenotypen zeigt die höchste signifikante Anreicherung von stressinduzierten Transkripten bereits bei Tag 1, die bei einigen Genotypen über mehrere Zeitpunktkombinationen stabil bleibt. Bei den beiden tolerantesten Roggeninzuchtlinien (LP1 und LP2) kommt es bei Tag 1 bereits zu signifikanten Anreicherungen. Hingegen verbleibt die Geninduktion der sensitiven Roggenlinien – wie auch einige sensitivere Genotypen der anderen *Triticeae* – auf einem höheren Signifikanzniveau (LP3 $P = 5 \times 10^{-07}$).

¹ HF08D16 ² HF06L17, HF11P23 ³ HT13F23 ⁴ HF12F02 ⁵ HZ36H04, HY02J18, HZ39L18)

⁶ HB03D05, HA05F16, HZ36C12 ⁷ HV08F03, HB17G07, HA30D21

Spezies Die 322 Einträge gliedern sich allgemein in biotischen und abiotischen Stress (Trockenheit, Hitze und Kälte). Der speziesspezifische Fisher-Test zeigt bei *Secale cereale* signifikante Ergebnisse in der funktionellen Gruppe des biotischen Stresses an der Zeitpunktkombination Tag 7+21 ($P = 0.027$). Außerdem zeigt sich bei *Hordeum vulgare*, dass die gesamte Kategorie „Stress“ signifikant mehr induzierte Transkripte aufweist als zu erwarten wäre (Tag 7 bzw. Tag 21, $P = 0.035$ bzw. $P = 0.007$). Die Abbildungen 3.31-3.33 fassen die wichtigsten zellulären Antworten zusammen. Die o.g. Analyse deutet bereits in der Frühphase eine starke Induktion dieser Kategorie an. Gemeinsam induziert werden v.a. 70kDa-Hitzeshock-Proteine¹ und mit biotischen Stress in Verbindung stehende Gene². Viele weitere Hitzeshock-Proteine verschiedener Klassen (HSP-17.4, HSP-70, HSP-81-2, HSP-101) werden nur zwischen zwei Arten bzw. nur in einer Art spezifisch induziert: Bei *Secale cereale* konnte bspw. ein putatives DnaJ-Protein³ mit Chaperon-Funktion detektiert werden. Alleinig induziert wird bei *Hordeum vulgare* ein USP-Protein⁴ (*universal stress protein*). Hingegen sind die Kälteakklimatisierungsproteine WCOR413/410⁵ in allen Spezies differentiell exprimiert, aber z.T. unterschiedlich stark ($FC \sim 20$). Isoforme WCOR413-ähnliche Proteine werden nur in *Secale cereale* und *Triticum aestivum* induziert⁶. Darüber hinaus wird ein COR413-TM1-Protein⁷ ausschließlich in *Triticum aestivum* kontinuierlich reguliert. Die Expression eines WCOR413-ähnlichen Proteins wird bei allen *Triticeae* bis in die Spätphase auf einem niedrigeren Niveau induziert, dessen Transkriptabundanz sich aber zwischen den Spezies unterscheidet.

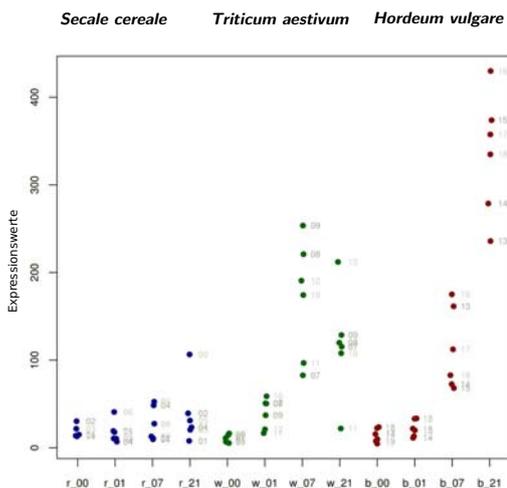


Abbildung 3.30 – Vergleich der Expressionswerte des AFP (*anti-freeze protein*) zwischen den Spezies. Bei *Secale cereale* (blau) wird nur eine moderate Expressionsänderung erfasst. Deutliche Expressionssteigerungen sind bei *Triticum aestivum* (grün) und *Hordeum vulgare* (rot) zu beobachten.

Stresseffektoren wie Chitinasen¹³ und Thaumatin-ähnlichen Genen¹⁴ besteht. Auch *Triticum aestivum* und *Hordeum vulgare* induzieren in der Spätphase eine Vielzahl von Faktoren gegen biotische Stressoren. In allen *Triticeae* werden diverse Verteidigungsfak-

Ein weiteres nicht genauer spezifiziertes stressinduziertes Protein⁸ wird gleichermaßen in allen *Triticeae* über den gesamten Zeitraum reguliert. Außerdem wird ein weiteres kältere reguliertes Protein⁹ besonders stark in *Triticum aestivum* induziert. Es verbleibt auf einem hohen Expressionsniveau. Weitere nicht genauer spezifizierte Gene werden alleinig in *Hordeum vulgare* transkribiert wie z.B. ein putatives ERD4-Protein¹⁰ (*early responsive to dehydration*). Biotische Effektoren¹¹ sind wichtige Komponenten der Stresstoleranz gegenüber Kälte und werden in allen *Triticeae* meist in der Spätphase hochreguliert. Zu einer kontinuierlichen und starken Induktion kommt es bei einer mit dem γ -Hordothionin verwandten Transkript¹² in *Secale cereale* und *Triticum aestivum*. Eine deutlich speziesspezifische Expression von *Secale cereale* erkennt man in einer Gruppe von Genen, die aus biotischen

¹ HZ61E11, HY10N15 ² HB04G06, HF22G23, HZ65E10, HS05A02 ³ HY06P18 ⁴ HB01K10
⁵ HT07K18, HW01N21, HB28C03 ⁶ HY07I23 ⁷ HB26G20 ⁸ HZ65F24 ⁹ HZ59C18 ¹⁰ HZ42F18
¹¹ HB04G06, HF22G23, HZ65E10, HS05A02 ¹² HF16F13 ¹³ HT01L11 ¹⁴ HZ55J23

toren¹ wie bspw. Chitinasen oder Thaumatin-ähnlicher Proteine induziert. So werden in der Spätphase Transkripte mehrerer Thaumatin-ähnlicher² Proteine in *Secale cereale* und *Hordeum vulgare* induziert. Auch sehr kältespezifisch exprimierte Proteine wie das Eisrekristallisierung-Inhibierungsprotein³ (*anti-freeze protein*, Abb. 3.30) zeigen ein speziespezifisches Expressionsverhalten, das bei *Secale cereale* nur schwach ausgeprägt ist.

3.3.6.18. Redox-Metabolismus

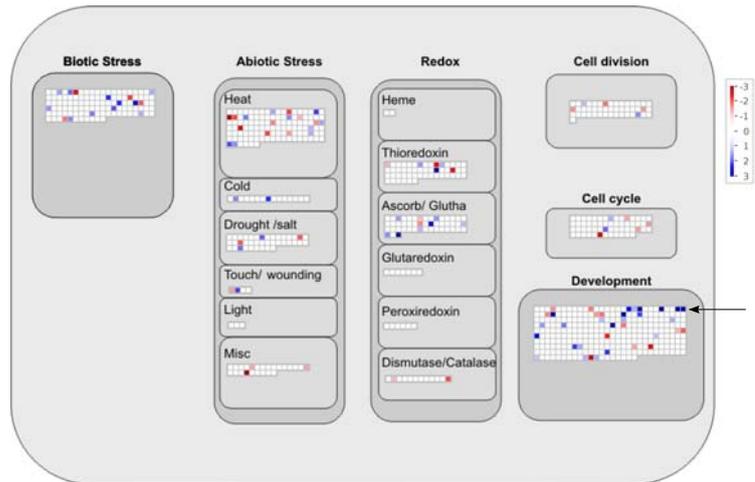
Genotypen Die Transkripte des Redoxsystems werden in den *Triticeae* z.T. synchronisiert reguliert und verdeutlichen die wichtige Funktion zur Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoffderivaten. Die Genexpression wird bei den Weizenkultivaren am Tag 1 induziert, besonders signifikant und lang anhaltend bei *Ta cv.* Martonvásári 8 und *Ta cv.* Uljanovka ($P = 0.005$ bzw. $P = 0.008$). Bei zwei Roggeninzuchtlinien kommt es zu vereinzelt signifikanten Anreicherungen (bis $P = 0.008$). Beim tolerantesten Gerstegenotyp treten signifikante Ereignisse bei den Zeitpunktkombinationen Tag 7+21 und 1+7+21 auf (bis $P = 0.009$). Bei dem sensitivsten Gerstegenotyp tritt sogar eine signifikante Häufung reprimierter Gene bei der Zeitpunktkombination Tag 7+21 auf ($P = 0.025$).

Spezies Diese Gruppe (127 Einträge) umfasst Gene mit Funktionen im Gluthation-, Ascorbat-, Thioredoxin- und Peroxidase-Metabolismus. Im Gegensatz zu den beiden anderen *Triticeae* erreicht *Triticum aestivum* eine signifikante Anreicherung von induzierten Genen der gesamten Redoxregulation am Tag 7 ($P = 0.023$), die auch über alle Zeitpunkte hinaus signifikant bleibt (Tag 1+7+21, $P = 0.015$). Betroffen sind Transkripte des Gluthation- und Ascorbat-Stoffwechsels, Thioredoxine sowie Catalasen bzw. Dismutasen (Abb. 3.31-3.33). Die differentielle Expression Letzterer ist in *Secale cereale* nicht ausgeprägt. Zu einer raschen Induktion des Gluthation- und Ascorbat-Stoffwechselweges kommt es bei *Secale cereale*, die sich in der mittleren Phase abschwächt und in der Spätphase wieder verstärkt wird. *Triticum aestivum* induziert bis zur mittleren Phase eine beträchtliche Anzahl von Genen. Bei Gerste indes kommt es ebenfalls zu Induktionen, die erst in der Spätphase ihren Höhepunkt finden. Bereits in der Frühphase wird kontinuierlich eine Monodehydroascorbate-Reductase⁴ in *Secale cereale* und *Triticum aestivum* induziert. Bei *Triticum aestivum* wird eine kontinuierliche Geninduktion einer Superoxid-Dismutase⁵ erfasst, die bei den anderen Arten nur schwach reguliert wird. Zu umfangreichen aber nicht-signifikanten Repressionen kommt es bei *Hordeum vulgare*. Betroffen sind u.a. Thioredoxine, Gene des Gluthation- und Ascorbatstoffwechsels (z.B. GDP-Mannose 3,5-Epimerase), Catalasen⁶ sowie Superoxid-Dismutasen⁷. Die dynamischen Veränderungen im Redoxsystem am Tag 7 werden nur in *Hordeum vulgare* bis in die Spätphase aufrechterhalten. *Secale cereale* und *Triticum aestivum* exprimieren einige Transkripte des Gluthation-Ascorbatstoffwechsels (z.B. Gluthation-Reduktasen und -Peroxidasen und Ascorbat-Peroxidasen) auf hohem Niveau. Des Weiteren werden in den *Triticeae* diverse Thioredoxine, Glutaredoxine und Dismutasen bis in die Spätphase hinein differentiell reguliert. In diesem Zusammenhang sind die ROS-detoxifizierenden Gluthation-S-Transferasen zu nennen, die artspezifisch und besonders ausgeprägt bei

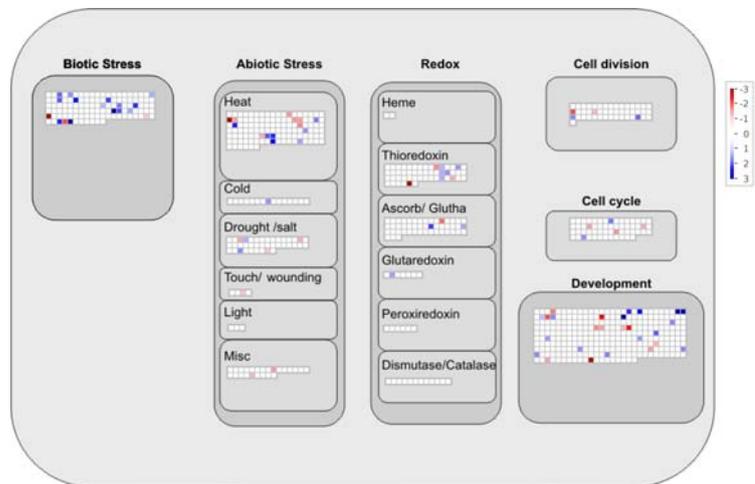
¹ HT01L11, HT02F22, HZ61P07, HT04C19, HS05A02, HS05B13 ² HZ56K16, HT14C24, HZ55J23, HS09D24
³ HS15H14 ⁴ HZ52E05 ⁵ HT01P18 ⁶ HB11L24, HB29N12 ⁷ HB19I17

Secale cereale
Stress - Redox - Zellantwort

Tag 1



Tag 7



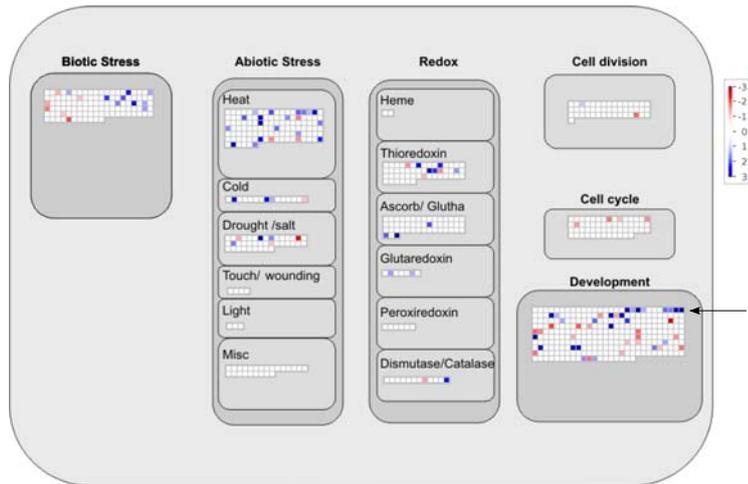
Tag 21



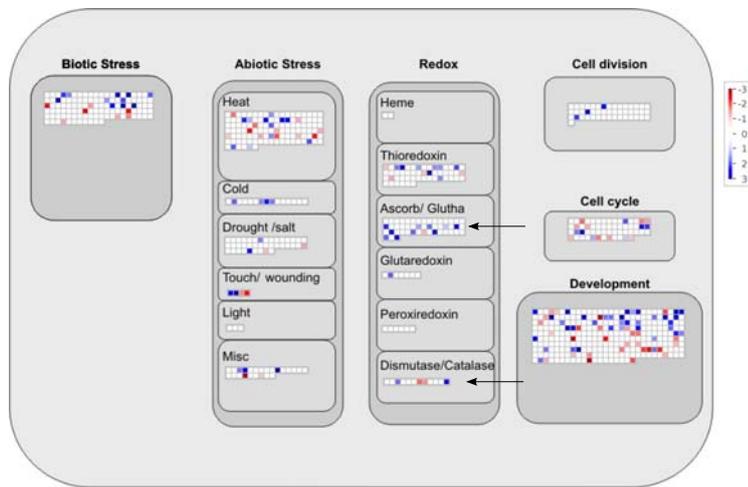
Abbildung 3.31 – Stress, Redox und Zellantwort von *Secale cereale*. Wie bei Weizen bleiben auch bei Roggen LEA-Transkripte bis in die Spätphase induziert. Signifikante Anreicherungen induzierter Gene des biotischen Stresses liegen in der Spätphase vor.

Triticum aestivum
Stress - Redox - Zellantwort

Tag 1



Tag 7



Tag 21

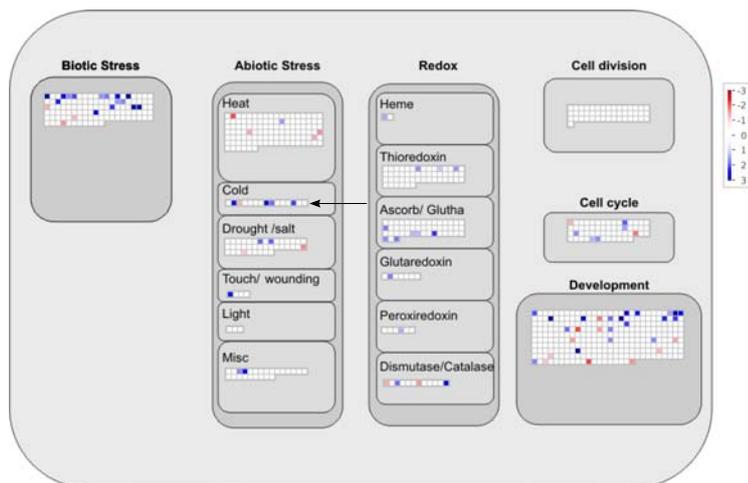
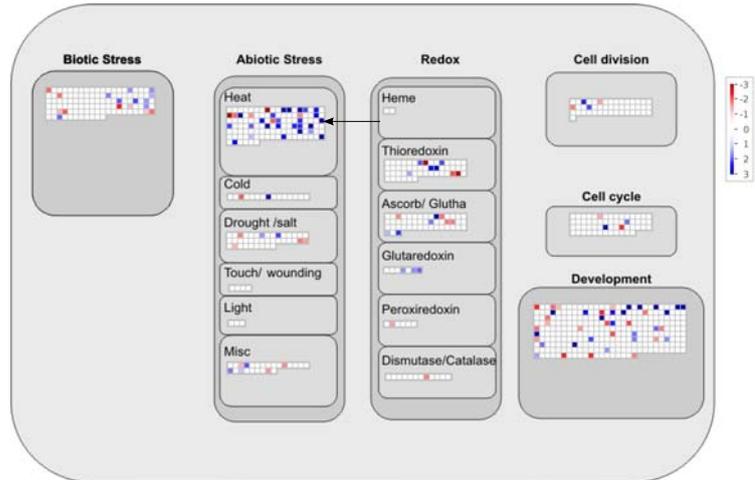


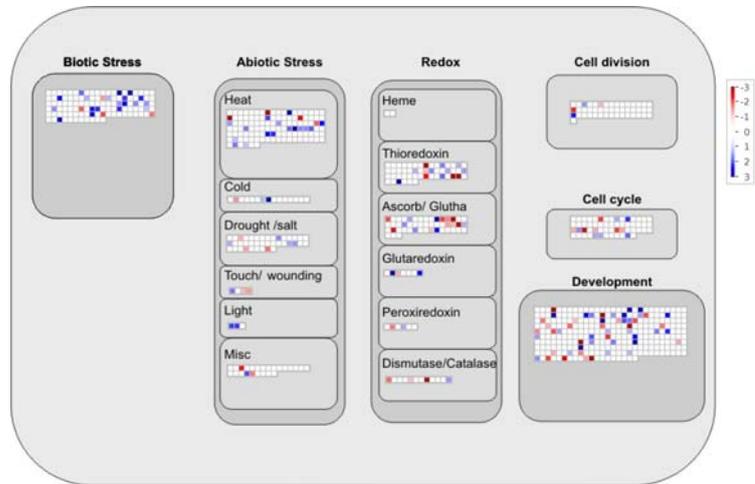
Abbildung 3.32 – Stress, Redox und Zellantwort von *Triticum aestivum*. Die ausgeprägte Induktion bis in die Spätphase der Kälteakklimatisierungs-Proteine (WCOR) wird auch bei Roggen beobachtet. Bei Weizen wird eine signifikante Überrepräsentation induzierter Gene der gesamten Redoxregulation beobachtet.

Hordeum vulgare
Stress - Redox - Zellantwort

Tag 1



Tag 7



Tag 21

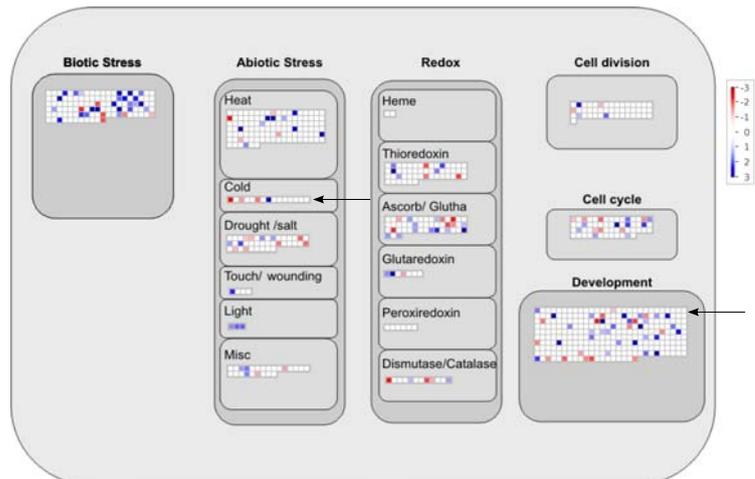


Abbildung 3.33 – Stress, Redox und Zellantwort von *Hordeum cereale*. In der Frühphase werden in den *Triticeae* Hitzeschockproteine verschiedener Klassen induziert. Im Gegensatz zu den anderen Arten ist die Induktion von Kälteakklimatisierungs- und LEA-Proteinen moderat.

Triticum aestivum induziert werden. Transkripte diverser Peroxidasen¹ werden zeitpunkt-spezifisch in *Hordeum vulgare* induziert.

3.3.6.19. Polyamin-Metabolismus

Genotypen Signifikante Überrepräsentationen induzierter Gene kommen bei allen *Triticeae* vor, besonders ausgeprägt sind sie jedoch bei den Gerstekultivaren und den Zeitpunktkombinationen (Tag 7+21, $P = 8 \times 10^{-04}$).

Spezies Die Gruppe (18 Einträge) besitzt mehrere Untergruppen wie Spermidin-Synthase, S-Adenosylmethionin-Decarboxylase oder Polyamin-Oxidase. Die Polyamin-Synthase zeigt bei allen drei Arten eine signifikante Anreicherung induzierter Gene bereits am Tag 1. Besonders stark induziert werden in allen *Triticeae* S-Adenosylmethionin-Decarboxylasen (SAMDC), deren Transkripte sich über den gesamten Zeitraum signifikant akkumulieren. SAMDC ist ein Schlüsselenzym für die Bildung von den Polyaminen Putrescin und Spermidin. Bei *Hordeum vulgare* tritt eine hohe Signifikanz ($P = 2 \times 10^{-06}$) auf, gefolgt von *Triticum aestivum* und *Secale cereale* ($P = 3 \times 10^{-04}$ bzw. $P = 0.004$). In allen drei Spezies wird eine SAMDC² z.T. transient und zeitpunktspezifisch induziert (FC 19,7). Drei verschiedene Isoenzyme der SAMDC sind in den drei *Triticeae* artspezifisch oder in Kombination kälterreguliert³. Divergente Expressionsprofile sind bei einer transient reprimierten Spermidin-Synthase⁴ in *Hordeum vulgare* zu beobachten.

3.3.6.20. Sonstige

Genotypen Die genotypische Analyse indiziert am Tag 7 und Tag 21 signifikante Anreicherungen induzierter Gene bei Roggen- und Gerstegenotypen. Bereits in der Frühphase werden bei den sensitiven Gerstegenotypen signifikante Beobachtungen induzierter Gene beobachtet ($P = 0.002$).

Spezies Die Gruppe umfasst eine Vielzahl verschiedener funktioneller Kategorien mit insgesamt 545 Einträgen: z.B. Gluthation-S-Transferasen, Oxidasen, Cytochrom P450 und GDSL-Motiv Lipasen (Abb. 3.34). Der speziesspezifische Fisher-Test zeigt eine signifikante Anhäufung induzierter Transkripte der Gluthation-S-Transferasen bei *Triticum aestivum* (Tag 21, $P = 0.05$). Darüber hinaus werden bei *Hordeum vulgare* signifikante Anreicherungen induzierter Gene der gesamten funktionellen Gruppe über alle Zeitpunkte (Tag 1+7+21, $P = 0.008$) beobachtet. Außerdem werden Gluthation-S-Transferasen (GST) sehr speziesspezifisch induziert. Exemplarisch kommt es bei *Secale cereale* neben der alleinigen Induktion einer GST⁵, die bis in die Spätphase induziert wird, auch zu einer Induktion zweier Peroxidasen⁶. In der Spätphase werden bei *Hordeum vulgare* Peroxidasen in hohem Maße induziert. Eine Gengruppe mit einem *Triticeae*-konservierten Induktionsprofil besteht aus GSTs⁷, Alkenal-Reduktasen⁸ und β -Glucosidasen⁹. Bei den β -Glucosidasen¹⁰ zeigt sich eine funktionelle Redundanz zwischen den *Triticeae*, wenngleich bei *Triticum aestivum* eine besonders ausgeprägte Induktion detektierbar ist. In einer weiteren Gruppe von Genen, deren Expression bei *Triticum aestivum* und *Hordeum*

¹ HR01H14, HV05K16, HZ38I21, HA28L21, HS14P23 ² HF24G21 ³ HT10D21, HT10D21, HY08K17, HT01K08 ⁴ HZ44N22 ⁵ HA18O09 ⁶ HF17M04, HZ55D17 ⁷ HR01D11, HF25I13, HT11M12
⁸ HF06E06 ⁹ HT13P01, HB01N04 ¹⁰ HF01J17

vulgare konserviert ist, finden sich Gluthation-S-Transferasen¹, β -Glucosidasen² und Cytochrom P450³.

3.3.6.21. RNA

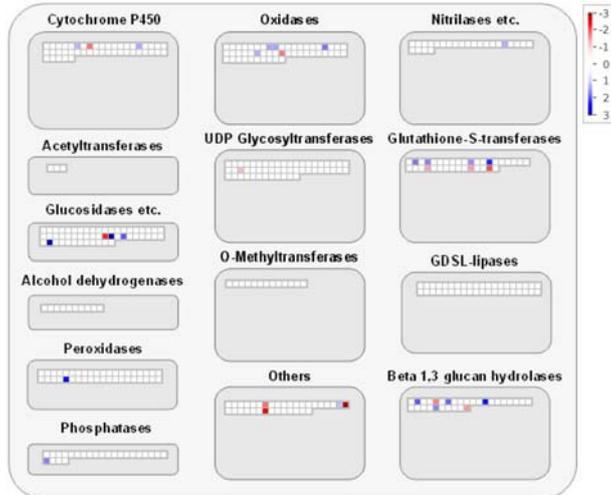
Genotypen Die genotypspezifische Analyse zeigt signifikante Unterrepräsentationen induzierter und reprimierter Gene bei einigen Kultivaren, zumeist in der mittleren und späteren Phase (*Sc. cv.* LP1 bei Tag 21: $P = 8 \times 10^{-04}$).

Spezies Die mit 1146 Einträgen drittgrößte funktionelle Gruppe umfasst diverse Unterkategorien wie Prozessierung, Regulation der Transkription oder RNA-Bindung. Die Transkription bzw. RNA-Regulation ist von herausragender Bedeutung und wird trotz fehlender Signifikanz nach der FDR-Korrektur hier beschrieben. In den *Triticeae* werden bereits in der Frühphase AP2/EREBP-, CO-LIKE, HSF-, NAC- bZIB-, MYB-, bHLH-, MADS-Box, Homöobox- Zinc-Finger- und Pseudo-ARR-Transkriptionsfaktoren (TF) reguliert. Bei *Secale cereale* fällt auf, dass nur eine geringe Anzahl von 32 Faktoren reguliert werden. In den beiden anderen *Triticeae* wird eine doppelt so hohe Anzahl differentiell exprimiert. Synchronisiert induziert werden C3H-Zinfinger-Protein, Homöobox-Protein HOX-22 und Hitzeschock-TF⁴, WRKY-40-TF⁵, NAC-TF⁶ und putative ARR-9⁷. Trotz dieser Gemeinsamkeiten werden Transkriptionsfaktoren sehr charakteristisch in den *Triticeae* exprimiert. Nur eine kleine Anzahl gemeinsam exprimierter Transkriptionsfaktoren weist *Secale cereale* mit den anderen *Triticeae* auf. Es werden weniger induzierte als reprimierte Gene bei *Secale cereale* detektiert: Induziert werden ein Zinkfinger-Protein⁸ und ein HMG-ähnliches (*high mobility group*) Transkript⁹. Unter den reprimierten Genen sind EMF2¹⁰ (*embryonic flower 2*) und diverse Zinkfinger-Proteine. Über mehrere Zeitpunkte (Tag 1+7) wird ein APETELA2/EREBP¹¹ induziert. Es stellt ein wichtiges potentielles Ziel für die Verbesserung der Frosttoleranz in den übrigen *Triticeae* dar. Eine synchronisierte Geninduktion zwischen *Secale cereale* und *Triticum aestivum* wird lediglich bei einem Zinkfinger-Protein¹² und einem heterogenen nukleären Ribonukleoprotein (hnRNP A1)¹³ beobachtet. Die größte Schnittmenge kommt bei *Triticum aestivum* und *Hordeum vulgare* vor. Zu einer positiven Regulation kommt es u.a. bei einem AP2-TF¹⁴, Pseudo-ARR-95¹⁵, CO-like Zinkfinger-Protein¹⁶ und diversen nicht charakterisierten Faktoren. Eine transiente Induktion wird bei einer Histone-Acetyltransferase ADA2¹⁷, einem Auxin-regulierten Protein IAA15¹⁸ und einem CO-like Zinkfinger-Protein¹⁹ in *Triticum aestivum* detektiert. Bei *Hordeum vulgare* kommt es zu einer Induktion diverser Transkriptionsfaktorfamilien, wie einem AP2/EREBP-TF²⁰, einem VIN3-Protein²¹ (*vernalisation insensitive 3*), Zinkfinger-Protein SAP1²² (*multiple stress-associated protein*) und einen CO-like Transkriptionsfaktor²³. Aufgrund der ausgewählten Zeitpunkte, wird die Expression der sogenannten CBF-Transkriptionsfaktoren nicht detektiert, da sie charakteristisch nach etwa zwei Stunden induziert wird, und dieser Zeitraum bei dieser Analyse nicht berücksichtigt worden ist. Die Expression von Transkriptionsfaktoren spielt in der späten Phase eher eine untergeordnete Rolle und ist in *Hordeum vulgare* stärker ausgeprägt. Zu erwähnen bleibt hier aber eine konservierte Expression eines CO-like Transkriptionsfaktors²⁴, der zwar bereits in der Frühphase bei einigen Genotypen

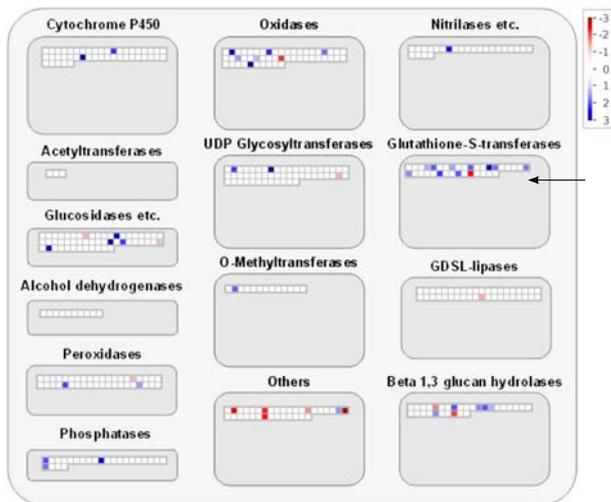
¹ HZ61C04, HU01G03 ² HV05D22 ³ HS16M19 ⁴ HT01J17, HZ39J10, HS01H02, HB12N10 ⁵ HF08L01
⁶ HZ44C05 ⁷ HF24H01 ⁸ HB19D01 ⁹ HF25H03 ¹⁰ HB16F15 ¹¹ HX01C17 ¹² HZ42M17
¹³ HY05K12 ¹⁴ HZ60N22 ¹⁵ HU02I09 ¹⁶ HZ38P03 ¹⁷ HS01P04 ¹⁸ HS01N22 ¹⁹ HT02I20
²⁰ HS15K09 ²¹ HB27G17 ²² HZ42E211 ²³ HS15K07, HV03B12 ²⁴ HY01B17

Sonstige (Tag 21)
Enzym-Familien

Secale cereale



Triticum aestivum



Hordeum vulgare

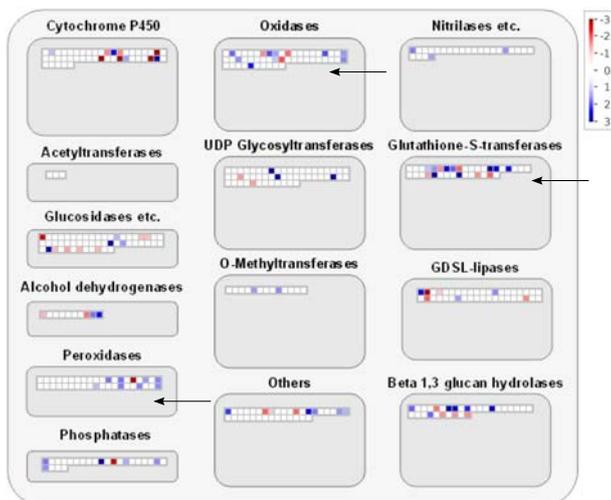


Abbildung 3.34 – Sonstige (Tag 21). Die niedrige Stresstoleranz der Gerste drückt sich in der Anreicherung von Transkripten der gesamten funktionellen Kategorie aus. Beispielsweise werden wichtige Enzyme zur Detoxifizierung induziert: Glutathion-S-Transferasen bei Weizen und Peroxidasen bzw. Oxidasen bei Gerste.

exprimiert wird aber erst in der Spätphase als konservierte Expression zu detektieren ist. Einige andere CO-like Transkriptionsfaktoren bleiben in *Hordeum vulgare* und auch in den *Triticum aestivum* stärker induziert als in *Secale cereale*. In *Secale cereale* werden kontinuierlich bis in die Spätphase u.a. ein Hitzeschock-TF¹ und das glycinreiche RNA-Bindeprotein² bis in die Spätphase induziert. Abgesehen von TF werden auch andere RNA-regulierende und -modifizierende Transkripte in den *Triticeae* reguliert. So werden eine RNA-prozessierende S-ähnliche RNase³ und eine DEAD-Box ATP-abhängige RNA Helicase⁴ kontinuierlich induziert.

3.3.6.22. DNA

Genotypen Die Repression der Histongene ist ein *Triticeae*-konserviertes Expressionsmuster. Bei den Roggengenotypen werden bis zu 17% der Gene der funktionellen Gruppe reprimiert, bei Weizen 25% und bei Gerste bis zu 16%. Die Repression startet bei der Mehrheit der Genotypen bereits am Tag 1 und wird z.T. bis zum Tag 21 aufrecht-erhalten. Am Tag 7 ist die Signifikanz bei den meisten Genotypen am höchsten. Sie ist bei Weizen und Roggen besonders ausgeprägt ($P = 2 \times 10^{-16}$).

Spezies Die funktionelle Kategorie umfasst 337 Einträge mit den Unterkategorien DNA-Synthese, Chromatinstruktur und DNA-Reparatur. Dabei werden mehrere heterogene Expressionsmuster erfasst (Abb. 3.35). Eine besonders intraspezifische Heterogenität wird bei *Secale cereale* deutlich, bei der nur schwach ausgeprägte Gencluster mit moderater Genrepression zu beobachten sind. Homogene Gencluster sind in den Heatmaps bei *Triticum aestivum* und *Hordeum vulgare* zu identifizieren. Darin kann ein relativ homogenes Cluster aus H2- und H4 Histontypen erfasst werden, das weniger stark bei *Hordeum vulgare* ausgeprägt ist. Auch artspezifische Cluster für *Hordeum vulgare* sind identifizierbar. Das erste besteht aus einer Agglomeration inhomogener Histongruppen, das zweite hauptsächlich aus H2(A/B)-Histonen. Zwischen den Arten und Genotypen gibt es auch deutliche temporale Unterschiede. So zeigt *Hordeum vulgare* eine Aufhebung der Repression bereits in der Spätphase. Der speziesspezifische Fisher-Test indiziert nach FDR-Korrektur hochsignifikante Überrepräsentationen reprimierter Histongene in *Secale cereale* und *Triticum aestivum* (Tag 7, $P = 3 \times 10^{-09}$ bzw. $P = 2 \times 10^{-16}$) bis in die Spätphase. Die Signifikanz der Roggeninzuchtlinien wird erst in der mittleren Phase erreicht. Bei *Hordeum vulgare* ist die Repression der Histongene bereits in der Frühphase erkennbar.

¹ HS01H02 ² HA11J24, HY05K12 ³ HZ44J03 ⁴ HZ61H16

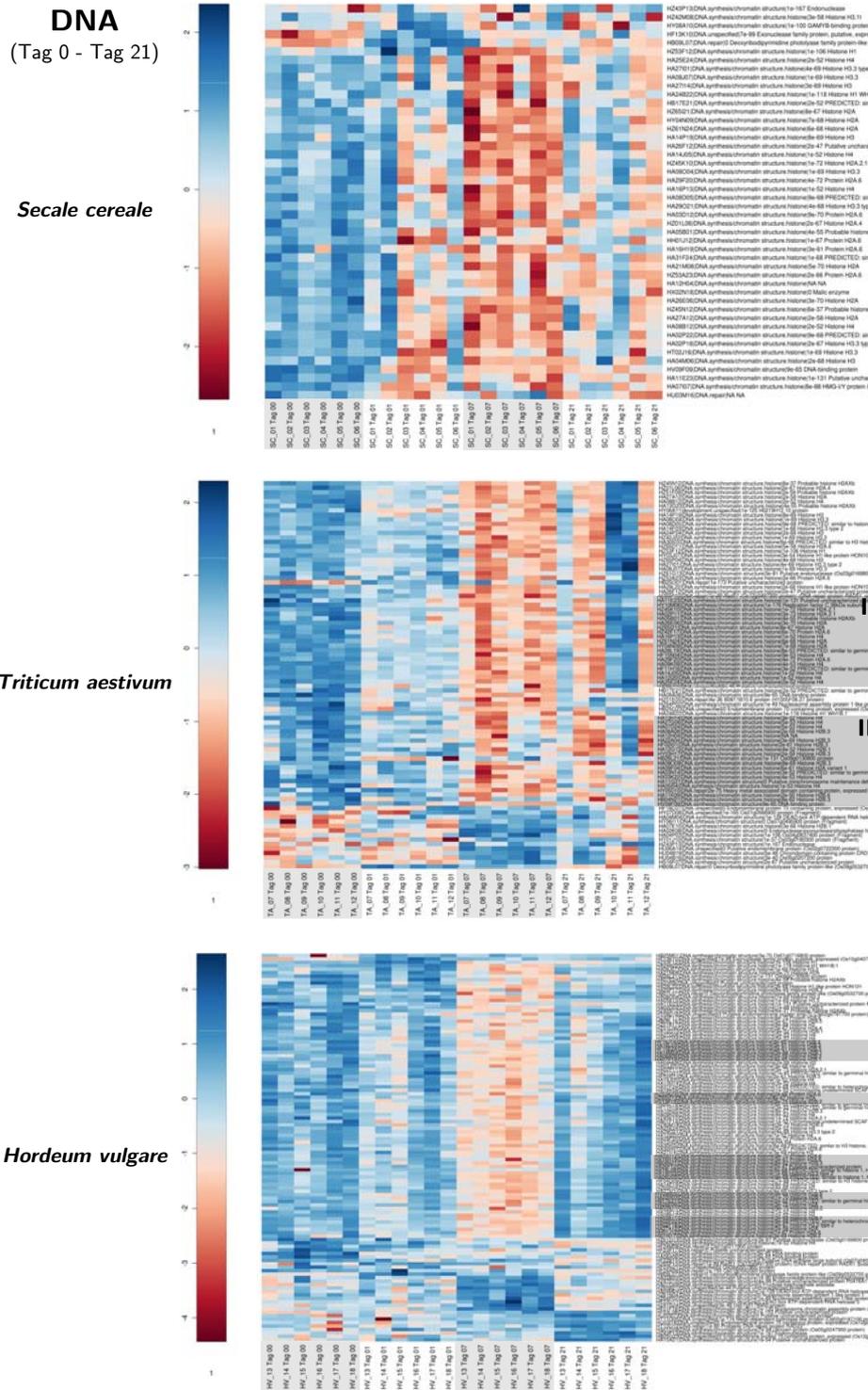


Abbildung 3.35 – Heatmap der Expressionswerte der Kategorie „DNA“ (Tag 0 - Tag 21). Die Heatmap von Weizen zeigt zwei Cluster aus H2- und H4-Histontypen (I bzw. II). Bei Gerste sind die Cluster inhomogen, hervorgehoben sind kleinere Cluster aus H2-Histonen. Man beachte die Aufhebung der Repression am Tag 21 bei Gerste. Eine vergrößerte Ansicht der Abbildungen befindet sich im Anhang (Abb. B.2-B.4)

3.3.6.23. Protein

Genotypen Bei zwei Weizengenotypen kommt es zu signifikanten Anreicherungen induzierter Transkripte am Tag 7 (*Ta cv. Cheyenne izo*, $P = 0.007$). Bezüglich der reprimierten Genen kommt es im gesamten Zeitraum zu signifikanten Unterrepräsentationen bei den Weizen- und Gerstengenotypen: besonders ausgeprägt sind Unterrepräsentationen in der mittleren bis späteren Phase (*Hv cv. Rodnik* bei Tag 21, $P = 8 \times 10^{-04}$).

Spezies Die mit 1968 Einträgen zweitgrößte funktionelle Kategorie umfasst u.a. die Untergruppen Proteinsynthese, posttranslationale Modifikation, Proteinlokalisierung und -glycosylierung. Die erhöhte Transkriptionsaktivität während der Frühphase spiegelt sich bei der Aktivierung der Translation wieder: der speziesspezifische Fisher-Test indiziert signifikante Unterrepräsentation reprimierter Gene sowohl in der gesamten Kategorie am Tag 1, bzw. Tag 1+7+21 bei *Triticum aestivum* ($P = 0.011$ bzw. $P = 0.02$), als auch bei der Protein-Ubiquitinylierung ($P = 0.009$). Es kommt zu umfassenden speziesspezifischen Veränderungen (Abb. 3.36) prokaryotischer und eukaryotischer ribosomaler Proteine (große bzw. kleine Untereinheiten). Beispielsweise wird das ribosomale Protein L3¹ (eukary. 60S LSU) in allen Spezies induziert. Interessanterweise werden vielfach fast ausschließlich bei *Hordeum vulgare* die Transkripte der chloroplastidären ribosomalen Proteine (LSU, 50S) während Tag 7 induziert. Die Genregulation des Protein-Metabolismus ist in *Hordeum vulgare* umfangreicher, wie die alleinige Induktion verschiedener Transkripte ribosomaler Proteine² verdeutlicht. Weitere umfassende Geninduktionen vollziehen sich im Ubiquitinylierungs-Prozess, die bei *Triticum aestivum* und *Hordeum vulgare* stärker ausgeprägt sind und eine große Schnittmenge von gemeinsam regulierten Genen³ aufweisen. Bei *Triticum aestivum* erreicht diese Unterkategorie eine signifikante Unterrepräsentation reprimierter Gene ($P = 0.009$). Auch Enzyme für die posttranslationalen Modifikationen (Serin-Threonine-Kinase⁴) und den Proteinabbau (Serin-Protease *ERD1*⁵) werden konserviert, früh induziert und erreichen bei *Hordeum vulgare* eine fast signifikante Anreicherung nach FDR-Korrektur bei Tag 1 ($P = 0.081$). Deutliche Gegensätze werden im Proteinmetabolismus in der Spätphase erkennbar. Bei *Secale cereale* und *Triticum aestivum* werden regulatorische Aktivitäten in der mittleren Phase beendet. Der Fisher-Test indiziert zwar keine signifikanten Ergebnisse bei *Hordeum vulgare*, es kann aber eine umfassende Geninduktionen bei der Proteindegradation (BIN 29.5) festgestellt werden. Ferner werden bei *Hordeum vulgare* Transkripte der Proteinubiquitinylierung umfangreich induziert. Betroffen von der Genregulation sind Ubiquitine, RING-Finger und Transkripte des Proteasoms. In der Mittelphase werden jedoch auch bei *Triticum aestivum* Transkripte der Proteasom-Untereinheiten transient induziert. Konserviert hochreguliert wird bei *Secale cereale* und *Triticum aestivum* ein SUMO-konjugiertes Enzym⁶.

¹ HS01N21 ² HA27I07, HA13G18, HY08N19, HY02K11, HY06E05, HU10C22, HA27O01 ³ HT07F04, HB24N23, HU01A15, HS01C16, HT01L08, HA04N11, HA18D24, HT01I17, HT05L23, HS07A03, HS02M18, HB20L22, HU12I11, HS09F22 HB21N19, HU10H23 ⁴ HV06F20 ⁵ HB32E06 ⁶ HB23N08

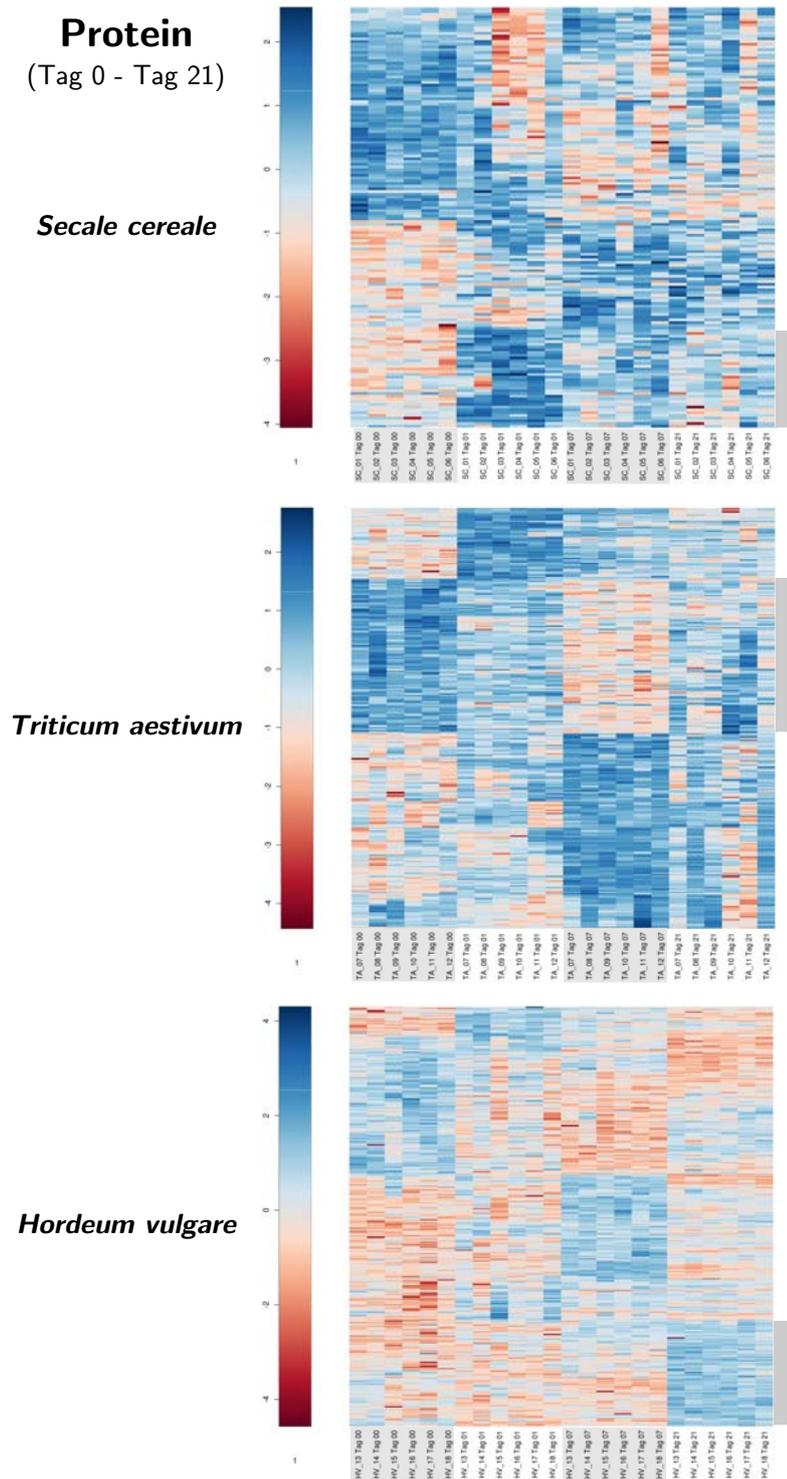


Abbildung 3.36 – Heatmap der Expressionswerte der Kategorie „Protein“ (Tag 0 - Tag 21). Hervorgehoben sind bei Roggen Gene, die am Tag 1 induziert werden und hauptsächlich in den funktionellen Kategorien Proteinabbau und posttranslationale Modifikation lokalisiert sind. Das hervorgehobene Cluster am Tag 7 bei Weizen enthält reprimierte Transkripte der Proteinbiosynthese (rib. Proteine) und des Proteinabbaus. Das kenntlich gemachte Cluster am Tag 21 bei Gerste enthält mehrheitlich induzierte Transkripte des Proteinabbaus (v.a. Ubiquitin). Detaillierte Heatmaps der hervorgehobenen Cluster befinden sich im Anhang (Abb. B.5-B.7).

3.3.6.24. Signaltransduktion

Genotypen Der genotypspezifische Fisher-Test indiziert keine signifikanten Ergebnisse nach FDR-Korrektur.

Spezies Die funktionelle Kategorie umfasst mehrere Untergruppen wie Calcium-, Rezeptorkinasen, G-Proteine u.ä. mit insgesamt 458 Einträgen. Auch der speziesspezifische Fisher-Test indiziert keine signifikanten Ergebnisse nach der FDR-Anpassung. Nur drei Signaltransduktionsfaktoren werden in den *Triticeae* konserviert induziert: zum einen wird ELIP-HV58¹ (*early light induced protein*) kontinuierlich induziert, zum anderen wird das G-Protein Rab-2-B² wie auch ein *EF hand family protein*³ transient in allen Arten induziert. Die für abiotischen Stress wichtigen Ca²⁺-bindenden Proteine Calcineurin, Calmodulin, EF-Hand-⁴ und G-Proteine werden in den Spezies auffallend variabel reguliert. Es kommt bei *Triticum aestivum* und *Hordeum vulgare* (Abb. 3.37) zu einer ausgeprägten Induktion von *CRYPTOCHROM-2*⁵. Zusätzlich wird in den Roggeninzuchtlinien ein Calmodulin-bindendes Protein⁶ induktiv reguliert. Transient induziert werden EF-Hand und Calmodulin-bindende Proteine⁷ sowohl in *Triticum aestivum* als auch diverse Calcium-Signaltransduktionsfaktoren⁸ in *Hordeum vulgare*. In den beiden toleranten Arten *Triticum aestivum* und *Secale cereale* wird eine SNF1-ähnliche Proteinkinase⁹ in der Spätphase induziert (*signalling in sugar and nutrient physiology*).

3.3.6.25. Entwicklung

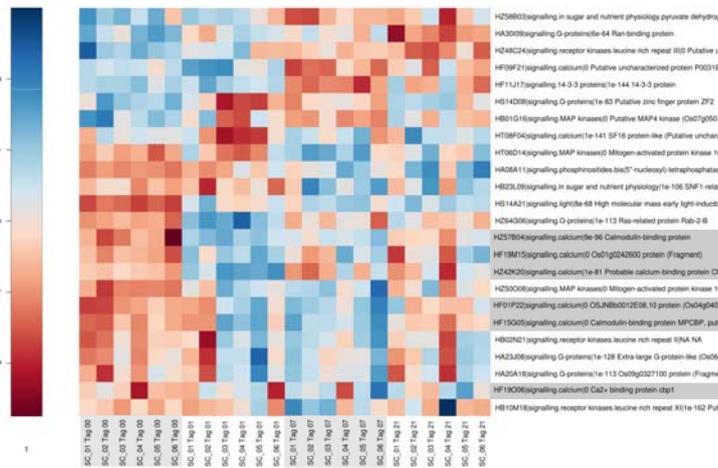
Genotypen Die genotypspezifische Anreicherungsanalyse zeigt vereinzelte signifikante Überrepräsentationen, die in der Frühphase bei Roggen- oder Weizengentypen zu finden sind. Die Weizengentypen zeigen eine frühe Induzierung von Genen mit statistischer Anreicherung ($P = 0.03$).

Spezies Die Gruppe ist unterteilt in Speicher-Proteine, Proteine der späten Embryogenese (*late-embryogenesis abundant proteins*, LEA) und umfasst 271 Einträge. Eine signifikante Anreicherung von Proteinen der späten Embryogenese findet man bei *Secale cereale* und *Triticum aestivum*, die über den gesamten Zeitraum signifikant bleibt ($P = 2 \times 10^{-04}$ bzw. $P = 0.002$). LEA-Proteine sind die mit am stärksten induzierten Gene in den *Triticeae* (bis zu 294-fache Induktion bei *Hordeum vulgare*). An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass bekannte und potentielle Dehydrine bzw. Hydrophiline als unbekannt annotiert worden sind. Einige LEA-Proteine¹⁰ werden *Triticeae*-konserviert und transient in der Frühphase exprimiert. Bei *Secale cereale* und *Triticum aestivum* wird in der Frühphase ein putatives LEA¹¹ induziert. Fernerhin wird die transiente Induktion eines weiteren LEA's in *Secale cereale* beobachtet: WSI18¹² (*water stress induced*), das ein interessanter Kandidat für die Resistenz gegenüber abiotischem Stress sein könnte. Bei *Triticum aestivum* werden ausgewählte LEA-3¹³ induziert, die nur im geringem Maße in den beiden anderen Arten exprimiert werden. Ebenso induziert wird ein LEA-ähnliches Gen WRAB1¹⁴ in *Hordeum vulgare*. Es zeigt, wie spezifisch LEA's in den verschiedenen Arten reguliert

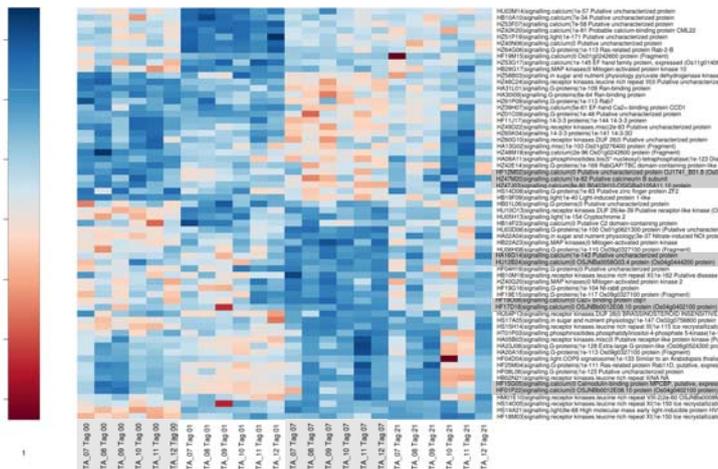
¹ HS14A21 ² HZ64G06 ³ HZ53G17 ⁴ HB13F18, HF15G05, HZ53G17, HF24L09, HY06D15, HZ57B04, HZ40N06, HZ63B11 ⁵ HU05H13 ⁶ HZ57B04 ⁷ HZ53F07, HU03M14, HZ40N06 ⁸ HB06I17, HA05G18, HZ63B11, HZ49O12, HY01M07, HB15A04 ⁹ HB23L09 ¹⁰ HS16K05, HF03M15, HS03G04, HS05A18, HF14H10 ¹¹ HB23J18 ¹² HT11L12 ¹³ HB03C09, HF22C02, HT10J22, HS06M22 ¹⁴ HF09K06

Signaltransduktion
(Tag 1 - Tag 21)

Secale cereale



Triticum aestivum



Hordeum vulgare

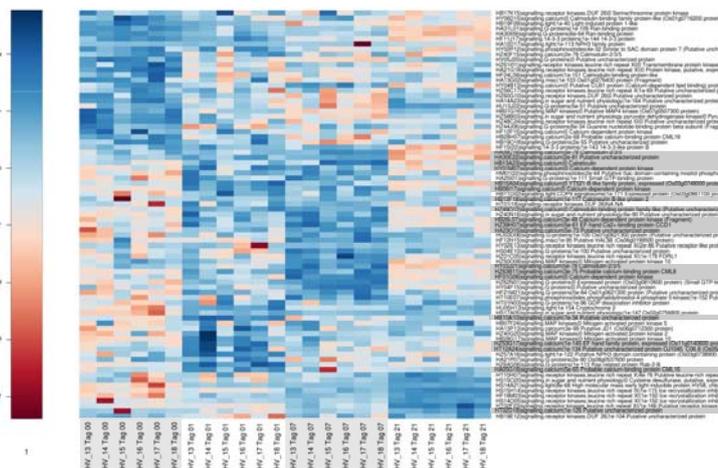


Abbildung 3.37 – Heatmap der Expressionswerte der Kategorie „Signaltransduktion“ (Tag 0 - Tag 21). Ca^{2+} -bindende Proteine werden in den *Triticeae*, v.a. bei Gerste, charakteristisch induziert. Grau hinterlegt sind stark induzierte Ca^{2+} -bindende Proteine. Eine vergrößerte Ansicht der Abbildungen befindet sich im Anhang (Abb. B.8-B.10)

werden können. LEA-Proteine¹ in *Secale cereale* und *Triticum aestivum* bleiben bis zu letzt induziert. Ein weiteres LEA-Transkript² wird konserviert und kontinuierlich bis in die Spätphase aktiviert. Darüber hinaus bleiben sowohl Dehydrine³ als auch potentielle Hydrophiline in *Secale cereale* und *Triticum aestivum* bis in die Spätphase hinein induziert. Das MtN3-ähnliche Protein⁴ zeigt ein *Triticeae*-konserviertes, permanent-induziertes Expressionsmuster und besitzt wie die LEA's eine bifunktionelle Bedeutung bei der Entwicklung und bei der Bewältigung von abiotischem Stress.

3.3.6.26. Transport

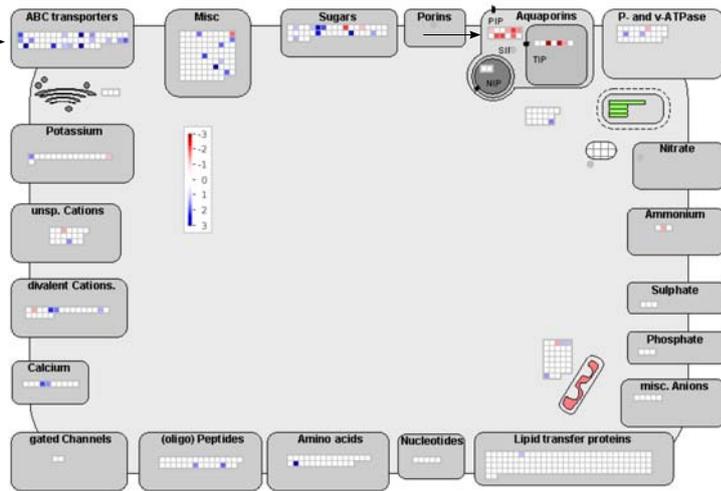
Genotypen Die Transportprozesse werden in der mittleren bis späteren Phase intensiviert und mobilisieren wichtige Stoffwechselprodukte für diverse physiologische Anpassungen. In der mittleren und späteren Phase kommt es zu hochsignifikanten Anreicherungen von Transporter-Transkripten. Besonders ausgeprägt ist diese Anreicherung bei den Weizen- und Gerstegenotypen am Tag 7 und 21 (bis $P = 1 \times 10^{-05}$).

Spezies Die funktionelle Gruppe mit 434 Einträgen umfasst u.a. Transporter für Zucker, Aminosäuren und für diverse andere Metabolite. Die speziesspezifische Analyse indiziert eine signifikante Anreicherung induzierter Transporter-Transkripte (Abb. 3.38) in der Mittel und Spätphase bei allen *Triticeae* (Tag 7 bei *Secale cereale* und *Hordeum vulgare* $P = 0.005$ bzw. $P = 5 \times 10^{-05}$; Tag 21 bei *Triticum aestivum*: $P = 0.031$). Zu einer statistisch angereicherten Induktion von ABC-Transportern kommt es bei allen *Triticeae* ($P = 0.031$, $P = 0.046$, $P = 3 \times 10^{-04}$), die bei *Hordeum vulgare* und *Triticum aestivum* bis in die Spätphase signifikant bleibt. Demgegenüber steht eine konservierte Repression von Aquaporinen (PIP), die in *Secale cereale* und *Hordeum vulgare* besonders signifikant ist. Die besonders starke Repression bei *Secale cereale* wird bereits früh vollzogen und dauert über den gesamten Zeitraum an (Tag 1+7+21 $P = 4 \times 10^{-04}$). Zusätzlich zu den PIP-Aquaporinen werden die im Tonoplast lokalisierten TIP-Aquaporinen signifikant bei *Secale cereale* bis in die Spätphase reprimiert (Tag 21, $P = 0.002$). Trotz der großen Bedeutung des Zuckertransportes zur Ausbildung der Frosttoleranz kommt es zu keiner signifikanten Anreicherung. Einige Zuckertransporter⁵ werden in allen *Triticeae* früh und kontinuierlich differentiell exprimiert. *Triticum aestivum* weist am Tag 1 die niedrigsten p-Werte für die Anreicherung von Zuckertransportern⁶ auf. In *Secale cereale* wird speziesspezifisch ein Saccharose-Transporter⁷ hochreguliert. In *Secale cereale* und *Triticum aestivum* kommt es zur Induktion eines Prolin⁻⁸, Zuckertransporters⁹ sowie diverser anderer Transporter¹⁰ in der Frühphase.

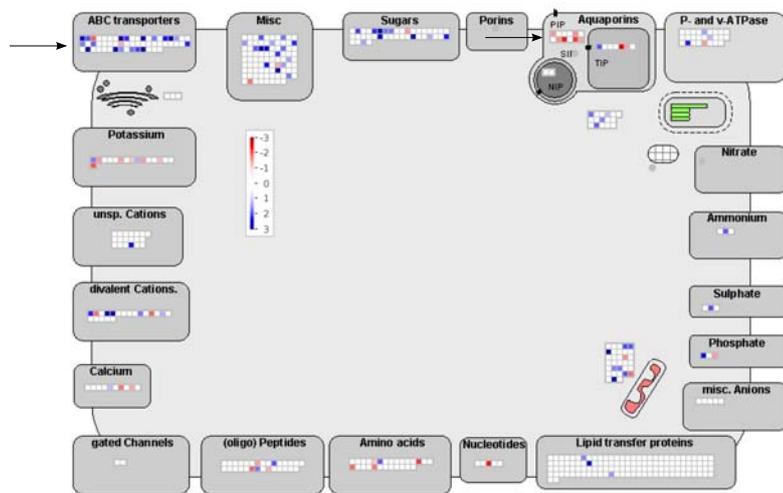
¹ HS16K05, HF03M15, HT10J22, HS03G04, HS05A18 ² HF14H10 ³ HT08A04, HF24J18, HS05D05, HF02B13 ⁴ HY08F18 ⁵ HA15M17, HB26N24 ⁶ HF19J23, HZ01B04, HV09E17, HA05B24 ⁷ HF24B01
⁸ HZ45F03 ⁹ HU04H16, HZ47I12, HB17I12 ¹⁰ HY03F19 HB10E11 HF17E15 HU04H16 HU03K16 HB17O03

Transport (Tag 7)
Übersicht

Secale cereale



Triticum aestivum



Hordeum vulgare

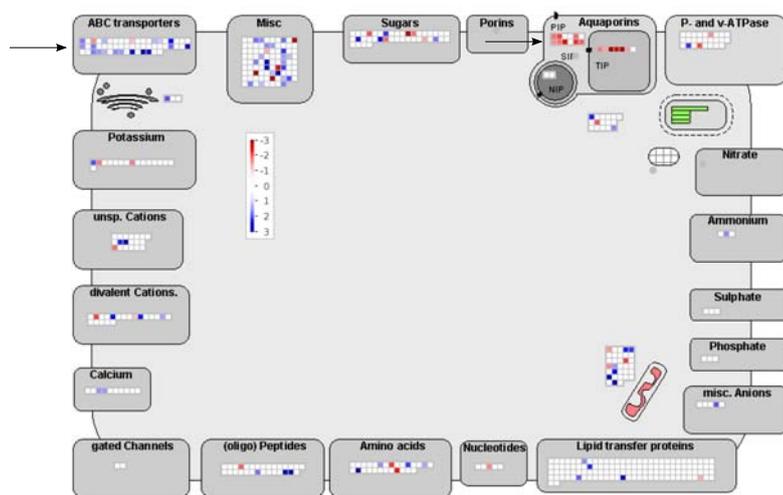


Abbildung 3.38 – Transport (Tag 7). Die signifikante Transportergruppe (Pfeile) bei den *Triticeae* sind ABC-Transporter (Induktion) und Aquaporine (Repression). Zusätzlich wird eine Vielzahl anderer Transportergene wie bspw. Zuckertransporter und Lipidtransfer-Proteine reguliert.

3.3.6.27. Unbekannt

Genotypen Der Fisher-Test zeigt eine deutliche Unterrepräsentation induzierter und reprimierter Gene bei der Mehrzahl aller Genotypen an verschiedenen Zeitpunkten (*Hv. cv. Rodnik* $P = 6 \times 10^{-05}$).

Spezies Die mit Abstand größte Gruppe von 4715 Einträgen umfasst Gene mit unbekannter Funktion oder solche, die zu keiner anderen funktionellen Einheit zugeordnet werden konnten. Wegen der stringenten Anwendung der Annotationsparameter wurden einige, für die Kälteakklimatisierung wichtige Gene in diesen BIN eingeordnet. Unter diesen Genen können wichtige, bisher noch wenig beachtete Faktoren wie etwa potentielle Hydrophiline sein. Insgesamt werden 315 Gene in allen *Triticeae* induziert (Score = ± 3 , Abb. 3.39), 84 davon sind als unbekannt annotiert (Tab. 3.3). Vier Gene kodieren für potentielle Hydrophiline¹. Bekannte Gene in dieser Auswahl sind einige wenige LEA bzw. Dehydrine² oder die zuvor beschriebenen WCOR-Proteine³, BLT14-Protein⁴ und Gene mit diversen Annotationen. Auch hier wird nur ein kleiner Teil der reprimierten Gene konserviert reguliert: bspw. ein Auxin-reprimiertes Protein ARP1⁵ und ein Zinkfinger-Protein⁶. Konserviert induziert bei *Secale cereale* und *Triticum aestivum* werden rund 18 Gene u.a. Dehydrin 12 und diverse uncharakterisierte Proteine. Zwischen *Triticum aestivum* und *Hordeum vulgare* wird ein umfangreiches Repertoire von Genen synchronisiert induziert wie z.B. ein Zinkfinger-Protein⁷ oder ein kältereguliertes Protein⁸. Artspezifisch wird neben diversen nicht annotierten Genen ein glycinreiches Zellwandprotein kontinuierlich in *Secale cereale* hochreguliert. Unter den nur in *Triticum aestivum* induzierten Genen sind u.a. ein MYB-28-Protein⁹ und ein Dehydrin 11¹⁰.

¹ HA02B14, HA21I14, HF24J18, HZ40H15 ² HF02B13, HS05A18, HF24J18 ³ HB28C03, HW01N21
⁴ HF24K13 ⁵ HU10D12 ⁶ HV08E02 ⁷ HS04E01 ⁸ HB19B20 ⁹ HF12L06 ¹⁰ HU03M22

3. ERGEBNISSE

Tabelle 3.3 – Gene, die in allen 18 Genotypen während der Kälteakklimatisierung induziert werden.

cDNA ID		MapMan Kategorie	BLAST-Hit
HZ65F24	20	stress	5e-82 Putative uncharacterized protein
HF04F06	10.1.1.01	cell wall	0 Putative uncharacterized protein
HF19D20	10.1.5	cell wall	0 UDP-D-glucuronate decarboxylase
HF09A05	11.10.02	lipid metabolism	0 Digalactosyldiacylglycerol synthase 1
HZ65F24	16.1	secondary metabolism	5e-82 Putative uncharacterized protein
HF11H21	2.2.1.05	major CHO metabolism	0 Saccharose synthase
HY05O13	2.2.1.05	major CHO metabolism	0 Saccharose synthase
HZ44H21	2.2.1.3.03	major CHO metabolism	0 Saccharose:sucrose 1-fructosyltransferase
HZ44H21	2.2.1.3.2	major CHO metabolism	0 Saccharose:sucrose 1-fructosyltransferase
HB14K14	21.2.2	redox	<none>
HF24G21	22.1.02	polyamine metabolism	1e-180 S-adenosylmethionine decarboxylase 2
HZ61H16	27.1.2	RNA	0 DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 30
HF25P01	29.1.04	protein	0 Os09g0503400 protein
HS03D17	29.8	protein	6e-69 Putative uncharacterized protein
HZ64G06	30.5	signalling	1e-113 Ras-related protein Rab-2-B
HB08B09	31.4	cell	0 Putative uncharacterized protein
HB10A04	33.99	development	0 Expressed protein (Os03g0254700 protein)
HZ44C05	33.99	development	0 NAC domain transcription factor
HA13K05	35.2	not assigned.unknown	0 Putative uncharacterized protein
HB11P11	35.2	not assigned.unknown	1e-44 Putative uncharacterized protein
HB13A13	35.2	not assigned.unknown	1e-116 Putative uncharacterized protein
HB24K01	35.2	not assigned.unknown	<none>
HB28C03	35.2	not assigned.unknown	1e-128 Cold acclimation protein WCOR410c
HF11L02	35.2	not assigned.unknown	0 Glycosyltransferase (Fragment)
HW01N21	35.2	not assigned.unknown	1e-128 Cold acclimation protein WCOR410c
HY01L11	35.2	not assigned.unknown	0 Saccharose:sucrose 1-fructosyltransferase
HZ36K12	35.2	not assigned.unknown	3e-20 Putative uncharacterized protein
HZ44D20	35.2	not assigned.unknown	6e-92 Expressed protein (Os03g0666700 protein)
HZ55K15	35.2	not assigned.unknown	9e-35 Putative uncharacterized protein
HZ60D19	35.2	not assigned.unknown	3e-06 Putative uncharacterized protein
HZ63J08	35.2	not assigned.unknown	5e-25 Putative uncharacterized protein

3.4. Identifizierung von Hydrophilinen in-silico

Von den 12086 cDNA-Proben des Makroarrays wurden 184 als potentielle Hydrophilinen klassifiziert. Als Identifizierungsmerkmal diente der Glycin-Anteil (> 6%) und der Hydrophobizitätsindex (> 1) (Garay-Arroyo *et al.*, 2000). Unter den identifizierten cDNA-Proben befinden sich eine Reihe von bereits bekannten Hydrophilinen wie Dehydrine oder LEA's (Abb. 3.4). Außerdem besitzt eine Vielzahl von Proteinen unbekannte Annotationen oder weist Ähnlichkeiten zu RNA-bindenden Enzymen auf.

Tabelle 3.4 – Auswahl von potentiellen Hydrophilinen. ID, cDNA Bezeichnung; KD Score, Kyte und Doolittle GRAVY Score.

cDNA ID	BLAST-Hit	KD Score	Glycin-Anteil
HA01H09	3e-46 Putative uncharacterized protein	1,212	0,092
HA02B14	1e-58 Dehydrin 13	2,206	0,131
HA04C16	3e-54 Putative uncharacterized protein	1,189	0,090
HA04F12	6e-44 Expressed protein	1,378	0,106
HA04P19	8e-41 Expressed protein	1,155	0,093
HA06C07	1e-25 Os01g0277900 protein	1,004	0,087
HA06F11	5e-52 RNA recognition motif family protein	2,270	0,093
HA16I20	4e-98 RNA-binding protein	1,414	0,222
HA25M17	1e-162 Putative nuclear RNA binding protein	1,164	0,151
HB32E15	1e-148 Putative uncharacterized protein	1,251	0,169
HF04N24	5e-71 Late embryogenesis abundant protein	1,479	0,203
HF09K06	2e-79 ABA-inducible protein WRAB1	1,025	0,092
HF13P18	1e-125 Late embryogenesis abundant protein	1,032	0,097
HF22C02	3e-99 Late embryogenesis abundant protein	1,036	0,085
HF24J18	1e-77 Dehydrin 1	1,151	0,226
HS01B06	3e-83 Late embryogenesis abundant protein	1,551	0,209
HS03H11	6e-07 BLT14.2 protein	1,286	1,101

3.5. Korrelation der differentiellen Genexpression mit experimentell bestimmter Frosttoleranz in Roggen, Weizen und Gerste

Die experimentelle Quantifizierung der Frosttoleranz unter kontrollierten Bedingungen ermöglicht es, die phänotypischen Merkmale und die Genexpression miteinander in Verbindung zu bringen. In einer Pilotstudie von Kocsy *et al.* (2010) konnten mehrere Gene (z.B. Saccharose-Synthasen) gefunden werden, deren Expression in Chromosomensubstitutionslinien von *Triticum aestivum* mit Frosttoleranz assoziiert ist. Die vorliegende Arbeit stellt das Nachfolgeprojekt dar. Die Fragestellung dieser Arbeit wurde erweitert, um die unterschiedliche Ausprägung der Frosttoleranz in drei Spezies und sechs Genotypen zu untersuchen. Zum Beurteilen der Güte der Assoziation wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. In einer nachgeschalteten Anreicherungsanalyse wurden nur Gene zugelassen, die einen Score von ± 3 (Berechnung s. 3.3.6) an mindestens einem Zeitpunkt aufwiesen. Eine pauschale Einteilung der Genotypen bei Weizen und Gerste in tolerant und sensitiv ist aufgrund der guten Separabilität der Frosttoleranzen besonders geeignet. In einer Separabilitätsberechnung (s. 2.21.4) wurden die Unterschiede zwischen toleranten und sensitiven Genotypen beurteilt und als ergänzende Analyse verwendet.

3.5.1. Hauptkomponentenanalyse

Eine Hauptkomponentenanalyse vereinfacht die Beschreibung einer Anzahl in Wechselbeziehung stehender Variablen. Bei der Hauptkomponentenanalyse werden die Variablen transformiert, damit eine höchstmögliche Varianz im Datensatz erhalten bleibt. Die neu berechneten Variablen nennt man Hauptkomponenten, die nach ihrer Varianz absteigend arrangiert sind. Die ersten beiden und damit wichtigsten Hauptkomponenten können in eine zweidimensionale Darstellung mit Hilfe von Biplots abgebildet werden. So können Gruppen von Beobachtungen oder auffälligen Expressionsmuster identifiziert werden (Abb. 3.40). Die Varianzen der nicht standardisierten Daten der ersten beiden Hauptkomponenten beträgt bei Roggen für induzierte und reprimierte Gene 71,0% bzw. 78,6%, bei Weizen 72,3% bzw. 79,7% und bei Gerste 71,7% bzw. 76,3% der Gesamtvarianz.

3.5.2. Anreicherungsanalyse funktioneller Gruppen

Der Fisher-Test kann Schlüsselereignisse in der Genregulation von Stoffwechselwegen detektieren, vorausgesetzt dass eine funktionellen Gruppe über genügend signifikante Korrelationen verfügt. Nach der FDR-Korrektur konnten nur wenige signifikante Ergebnisse erzielt werden. Die Gründe dafür liegen in der p-Wert Korrektur und der geringen Anzahl signifikanter Korrelationen. Deswegen werden, falls nicht anders erwähnt, die nicht korrigierten p-Werte angegeben.

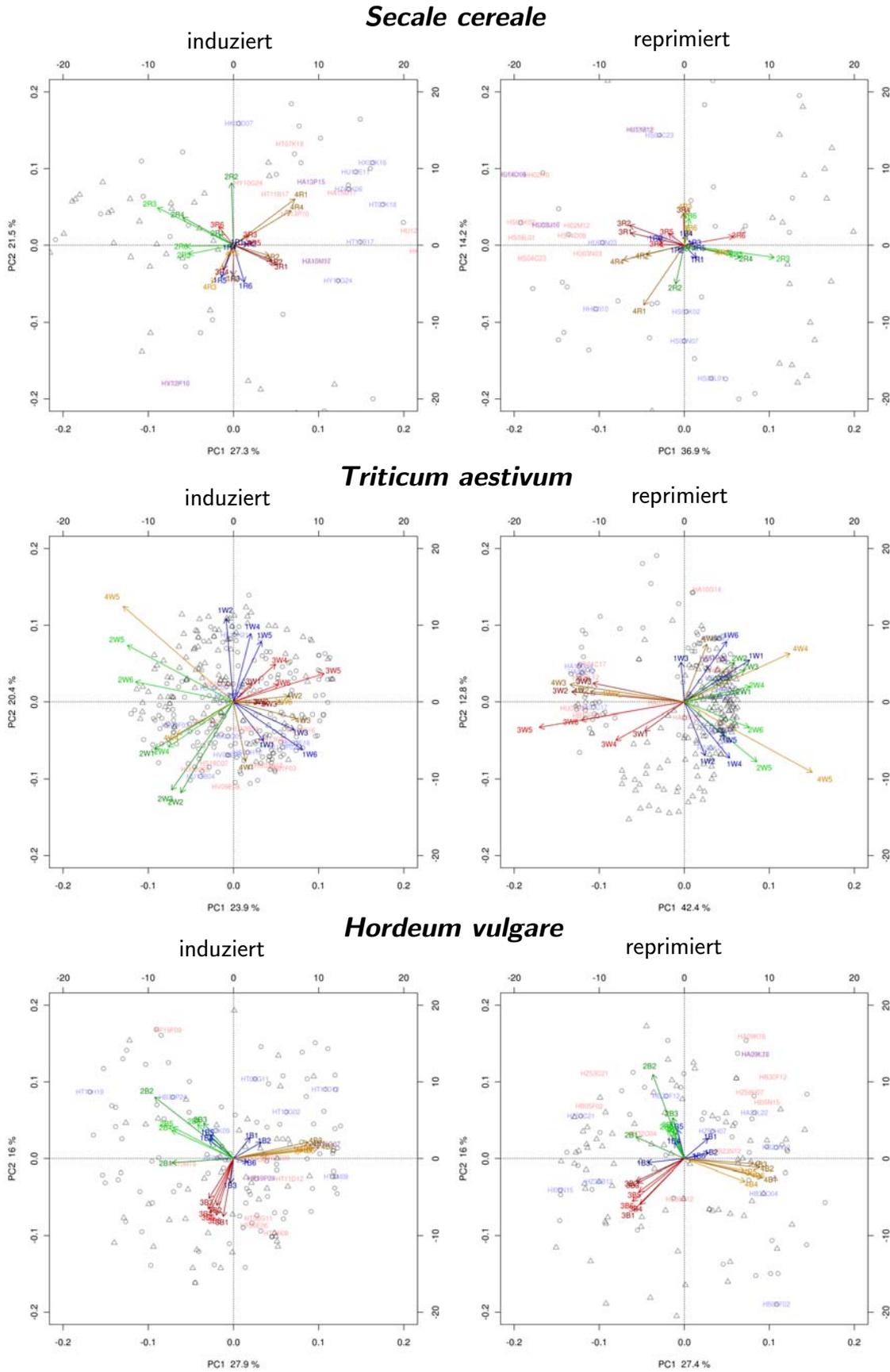


Abbildung 3.40 – Biplots der Hauptkomponentenanalyse mit signifikant ($\alpha = 0.05$) korrelierten Genen (induziert, Abb. links; reprimiert, Abb. rechts) bei Roggen, Weizen und Gerste. Eine prägnante Gruppierung der Variablen kann bei Gerste beobachtet werden. Bei den induzierten Genen ist Tag 1 der Zeitpunkt mit der höchsten Varianz, wie man anhand der Länge der Pfeile (Variablen) erkennen kann. Eine Aufteilung der toleranten und sensitiven Genotypen (dunklere bzw. hellere Farbtöne) kann erwartungsgemäß bei mehreren Variablen erfasst werden. Die jeweils zehn signifikantesten Korrelationen sind farblich als cDNA-ID's hervorgehoben. Positive Korrelationen, Kreise; Negative Korrelationen, Dreiecke. Benennungsschema der Variablen: 1-4, Tag 0-21; R, Roggen; W, Weizen; B, Gerste; 1-6, Genotypen (s. Tabelle 2.1)

Aus Tabelle A.5 im Anhang geht hervor, dass das Verhältnis induzierter Genexpression bei Weizen am Tag 7 stark zugunsten der positiv korrelierten Genen (+I) verschoben ist. So deutlich abweichende Verhältnisse werden in keiner anderen Spezies beobachtet (Tab. 3.5). Im nachfolgenden wird einfachheitshalber eine Symbolik für die möglichen Kombinationen von Korrelation und Art der differentiellen Genexpression verwendet:

1. positive Korrelation und induzierte Genexpression (+I)
2. negative Korrelation und induzierte Genexpression (-I)
3. positive Korrelation und reprimierte Genexpression (+R)
4. negative Korrelation und reprimierte Genexpression (-R)

Tabelle 3.5 – Gesamtanzahl der signifikanten Korrelationen ($p < 0.05$).

Art der Korrelation	Induziert		Reprimiert	
	+I	-I	+R	-R
Roggen	39	43	38	38
Weizen	247	109	97	203
Gerste	111	63	52	94

3.5.2.1. Roggen

Am Tag 1 befinden sich unter den signifikant bzw. nicht-signifikant korrelierten Transkriptabundanzen mit der Kodierung (+I) bekannte stressassoziierte Gene (Tab. 3.6). Die Gene werden z.T. bei den anderen *Triticeae* induziert, erreichen jedoch keine statistische Signifikanz. Signifikant (-I) korrelierte Transkriptmengen (25) kodieren für Proteine im Saccharose-Abbau und im Aminosäure-Transport. Bei den reprimierten Genen (+R) sind Transkripte der Cellulose-Synthese angereichert ($P = 4 \times 10^{-04}$). Die gruppenbasierte Analyse identifiziert eine Anreicherung der funktionellen Kategorie des LHC II ($P = 2 \times 10^{-15}$) bzw. die der Chlorophyll-A/B-Bindeproteine. Bei Tag 7 der Kälteakklimatisierung werden signifikante (+I)-Korrelationen u.a. im Polyamin-Metabolismus und in der Redoxregulation detektiert. Bei den (-I)-korrelierten Einträgen sind Transkripte des Protein-Metabolismus ($P = 0.001$) überrepräsentiert. Betrachtet man die Ergebnisse der Gruppenseparabilität, fällt auf, dass bei der sensitiven Gruppe die funktionelle Kategorie der Saccharose-Synthasen überrepräsentiert ist ($P = 6 \times 10^{-04}$). Ebenfalls vertreten ist in beiden Analysen u.a. die große Untereinheit von RuBisCO. Die Anzahl der signifikant korrelierten (+R) Transkriptabundanzen ist am Tag 7 gering. Der Fisher-Test der Gruppenseparabilität zeigt niedrige p-Werte bei Transkripten der ribosomalen

40S-Unterheit ($P = 0.001$) und bei Histonen ($P = 0.004$). Bei den Transkripten mit der Kodierung (-R) gibt es signifikante Korrelationen sowohl im Fettsäure-Metabolismus als auch bei den Histonen ($P = 0.001$ bzw. $P = 0.006$). Beide Kategorien sind auch in der Gruppenseparabilitäts-Analyse signifikant vertreten. Am Tag 21 sind (+I)-korrelierte Gene von diversen funktionellen Kategorien überrepräsentiert. Des Weiteren indiziert die Anreicherungsanalyse u.a. eine statistische Überrepräsentation von Transkripten im zentralen Aminosäure-Metabolismus (Alanin, $P = 1 \times 10^{-04}$), beim Transport von Metallen ($P = 4 \times 10^{-04}$), beim Protein-Abbau (Aspartatproteasen, $P = 8 \times 10^{-04}$) sowie bei Glucosidasen ($P = 0.003$). Wenige signifikante Einträge sind bei der (-I)-korrelierten Transkriptabundanz zu finden, z.B für Transkripte des TCA ($P = 9 \times 10^{-04}$). Die signifikanten (+R)-Korrelationen der funktionellen Kategorie „Sonstige“ reichern sich statistisch abgesichert an ($P = 7 \times 10^{-06}$). Weitere gute Korrelationen erreichen u.a. mehrere Aquaporine und Chlorophyll-A/B-Bindeproteine. Wird die Gruppenseparabilitäts-Analyse betrachtet, sind die Aquaporine am deutlichsten angereichert ($P = 3 \times 10^{-06}$). Die (-R)-korrelierten Gene verteilen sich in diverse funktionelle Kategorien mit relativ wenigen Einträgen.

3.5.2.2. Weizen

Anreicherungen bei Tag 1 umfassen mehrere funktionelle Kategorien: Die signifikanteste Anreicherung von (+I) korrelierten Genen (Tab. 3.7) ist bei den LEA-Proteinen zu finden ($P = 1 \times 10^{-05}$); sie bleibt über alle Zeitpunkte signifikant ($P = 4 \times 10^{-06}$). Es folgen dann die Kategorien für Saccharose-Abbau und Redoxregulation (beide $P = 0.007$). Wird die Gruppierung zwischen toleranten und sensitiven Genotypen verglichen, so werden vorherige Ergebnisse bestätigt, einige Kategorien sind zusätzlich angereichert: LEA ($P = 5 \times 10^{-06}$), Phenylpropanoide (Lignin-Synthese) sowie Fettsäure-Synthese und -Elongation und auch Calcium-Signaltransduktion. Gute Gruppenseparabilität ist z.B. bei einer Salzstress-induzierten Proteinkinase¹, eines ELIP Hv58² oder bei einem chloroplastidären LEA-Protein³ (ähnlich zu Cor14b), das gleichermaßen in Roggen reguliert wird, zu beobachten. Eine signifikante Überrepräsentation beim Gruppenvergleich wird bei der posttranslationalen Modifikation erreicht ($P = 9 \times 10^{-04}$). Transkriptabundanzen mit (+R)-Kodierung teilen sich ebenfalls bei der Korrelationsanalyse in diverse Kategorien wie Redox, Photosynthese oder Lipid-Metabolismus auf. Die Gruppenseparabilitäts-Analyse bestätigt, dass auffällig viele Gene mit unbekannt Funktionen weniger prägnant in den toleranten Genotypen reprimiert werden ($P = 0.001$). Transkripte mit (-R)-Korrelation verteilen sich überwiegend auf diverse funktionelle Kategorien mit wenigen Einträgen. Die Gruppenseparabilitätsanalyse indiziert eine Anreicherung von Transkripten, die in der Calcium-Signaltransduktion⁴ involviert sind. Am Tag 7 indiziert die Anreicherungsanalyse der (+I)-korrelierten Transkriptabundanz signifikante Überrepräsentationen der Saccharose-Synthasen ($P = 4 \times 10^{-06}$), des Polyamin-Metabolismus ($P = 0.001$), der Lignin-Biosynthese, der Glykolyse und der Gluthation-S-Transferasen. Bei dem Gruppenvergleich werden Überrepräsentationen von LEA's ($P = 5 \times 10^{-04}$), Pyruvat-Dehydrogenasen (TCA), SAMDC (Polyamin), bei Transkripten der Lignin-Biosynthese, der Glykolyse, der Redoxregulation und der Tocopherol-Biosynthese beobachtet. Die Fülle der angereicherten Kategorien verdeutlicht die dynamische Genexpression am Tag 7 bei Weizen und die damit einhergehenden Unterschieden zwischen toleranten und sensitiven Genotypen. Bei den

¹ HT11K07 ² HS14A21 ³ HS04D19 ⁴ HY06D15 HY03L23 HZ42P13

3. ERGEBNISSE

Tabelle 3.6 – Ergebnisse der Korrelation von Expressionswerten (Tag 1, 7, 21) und phänotypischen Daten von *Secale cereale* (Beispiele).

cDNA ID	BLAST-Hit	Tag	Art Korrelation	<i>r</i>	<i>P</i>
HF12G20	GAMYB-Protein	1	(+I)	0,886	*
HB01N04	β -Glucanase	1	(+I)	0,886	*
HT07K18	WCOR413	1	(+I)	0,886	*
HB08M17	Trockenstress-induzierten Protein (CDSP34)	1	(+I)	0,829	*
HB08K03	Gluthation-Peroxidase	1	(+I)	0,771	
HS03G04	LEA-Protein	1	(+I)	0,771	
HB23C03	Cystatin	1	(+I)	0,714	
HZ45F03	Prolin-Transporter	1	(-I)	-1,000	*
HF11H21	Saccharose-Synthase	1	(-I)	-0,829	*
HT10H13	Cellulose-Synthase	1	(+R)	0,886	*
HV02G08	Cellulose-Synthase	1	(+R)	0,886	*
HZ40F05	12-Oxophytodiensäure-Reduktase	1	(-R)	-0,943	*
HT10D21	SAMDC	7	(+I)	0,943	*
HZ40K06	Gluthation-S-Transferase	7	(+I)	0,886	*
HS08L23	ERD	7	(+I)	0,829	*
HF03M15	LEA-Protein	7	(-I)	-0,771	
HY08F18	MtN3-Protein	7	(-I)	-0,771	
HF11H21	Saccharose-Synthase	7	(-I)	-0,714	
HS16F18	Enolase 2	7	(+R)	1,000	*
HA04N08	Reaktionszentrum W-Protein PS II	7	(+R)	0,829	*
HA15M17	Zuckertransporter	21	(+I)	1,000	*
HA07O21	USP-Protein	21	(+I)	0,886	*
HB12M24	Stärkeverzweigungsenzym I	21	(+I)	0,829	*
HB14O13	Δ -1-Pyrroline-5-Carboxylate-Synthetase	21	(+I)	0,771	
HS03G04	LEA-Protein	21	(+I)	0,771	
HZ65B01	PrMC-Protein	21	(-I)	-0,829	*
HB23L09	SNF1-Kinase	21	(-I)	-0,771	
HA06N23	Glycosyltransferase	21	(+R)	0,829	*
HA11C14	Gluthion-S-Transferase	21	(+R)	0,829	*
HB03D05	delta-Aminolävulinsäure Dehydrase	21	(+R)	0,829	*
HV05M15	Aquaporin	21	(+R)	0,771	
HA25D23	Aquaporin	21	(+R)	0,714	
HS08K07	Aquaporin	21	(+R)	0,714	

stärker exprimierten Genen der sensitiven Genotypen (-I) werden Anreicherungen von RuBisCO-Transkripten ($P = 6 \times 10^{-05}$) und Phosphoglycerat-Mutasen der Glykolyse ($P = 2 \times 10^{-04}$) registriert. Die beste Separabilität wird bei LEA-Proteinen¹ und BLT14.2 verzeichnet. Bei der Untersuchung der (+R)-kodierte Transkriptabundanz ist die chloroplastidäre ribosomale Untereinheit 50S ($P = 0,003$) in beiden Analysen signifikant vertreten. Bei den (-R)-korrelierten Transkripten werden Überrepräsentationen von Histon- ($P = P \times 10^{-06}$), Lichtreaktions- (PS-II) und Subtilasen-mRNA's (beide $P = 0.003$) beobachtet. Auch die Gruppen-Anreicherungsanalyse verifiziert die Ergebnisse der vorherigen Analyse. In der Spätphase der Kälteakklimatisierung (Tag 21)

¹ HF14H10 HA02B14 HS16K05 HS01F03

erreichen (+I)-korrelierte Transkriptmengen der Kategorien LEA ($P = 7 \times 10^{-05}$) und Saccharose-Synthasen ($P = 3 \times 10^{-05}$) eine statistische Signifikanz, die an allen Zeitpunktkombinationen zu beobachten ist. Die Gruppenseparabilitäts-Analyse verifiziert ebenfalls eine Überrepräsentation bei den LEA-Proteinen ($P = 5 \times 10^{-06}$). Des Weiteren werden hochsignifikante Anreicherungen von Alkohol-Dehydrogenasen (Fermentation, $P = 2 \times 10^{-04}$) erfasst. Gute Separabilität weisen *cold shock domain protein*¹, LEA², Dehydrin³, Superoxid-Dismutase, Alkohol-Dehydrogenase und Saccharose-Synthase⁴ auf. Die Anreicherungsanalyse der (-I)-korrelierten Transkriptabundanz erfasst Überrepräsentationen beim Zucker-Transport ($P = 0.003$) und „Sonstige“ ($P = 0.006$). Bei der gruppenbasierten Analyse weisen die funktionellen Kategorien der Tocopherol-Biosynthese ($P = 0.002$), Saccharose-Invertase und -Synthese und „Sonstige“ mehr korrelierte Transkripte auf als zu erwarten wären. Gene mit hoher Separabilität sind z.B. Fructosyltransferase⁵, BLT14⁶, Dihydroflavonol-4-Reduktase⁷ oder das WCOR413-ähnliche Protein⁸. Die (+R)-Korrelationsanalyse zeigt einzelne Einträge in diversen funktionellen Kategorien. Unter den signifikante Kategorien bei den (-R)-korrelierten Transkriptmengen sind Histone ($P=2 \times 10^{-16}$), Aquaporine PIP ($P=2 \times 10^{-6}$), LHC II ($P = 1 \times 10^{-05}$), ribosomale Proteine und Transporter. Die Ergebnisse der vorherigen Korrelationen werden weitgehend auch von der Gruppenanalyse geteilt, bei der die Kategorie der Aquaporine ($P = 2 \times 10^{-05}$) ebenfalls hochsignifikant ist.

3.5.2.3. Gerste

Bei den wenigen (+I)-korrelierten Transkriptabundanzen am Tag 1 (Tab. 3.8) werden signifikante Anreicherungen beim Nukleotid-Metabolismus (Uridilat-Kinasen, $P = 0.003$), beim Kohlenhydrat-Stoffwechsel II (Inositol-Kinasen, $P = 0.004$), bei ribosomalen Proteinen (chloroplastidäre 50 S, $P = 0.004$), bei der Calcium-Signaltransduktion ($P = 0.02$) und beim abiotischem Stress (Hitze, $P = 0.01$) beobachtet. Bei der Gruppenseparabilität sind zusätzlich CONSTANS und NAC-Transkriptionsfaktoren ($P = 0.015$) vertreten. Bei den (-I)-korrelierten Transkripten werden Anreicherungen bei den ABC-Transportern ($P = 0.003$) beobachtet. Bei der Gruppenanalyse sind u.a. Cytochrom P450 ($P = 0.005$) und Fettsäure-Synthese bzw. -Elongation signifikant angereichert. Beide Analysen bestätigen bei der (-R)-korrelierten Transkriptabundanz signifikante Anreicherungen von Histon-Transkripten ($P = 0.003$ bzw. $P = 2 \times 10^{-06}$). Am Tag 7 indiziert die Anreicherungsanalyse der (+I)-korrelierten Genexpression Überrepräsentationen von Gluthation-S-Transferasen ($P = 3 \times 10^{-05}$) und „Sonstige“ ($P = 0.003$). Eine Separabilität zwischen toleranten und sensitiven Genotypen wird bei einer Hydroxycinnamoyl-Transferase⁹ (Phenylpropanoid-Metabolismus), bei einer Cellulose-Synthase¹⁰ oder bei einer β -Glucanase¹¹ beobachtet. Die Transkriptabundanz mit (-I)-Korrelation verteilt sich bei beiden Analysen auf verschiedenen Kategorien mit wenigen Einträgen. Bei den reprimierten Genen mit der Kodierung (+R) werden diverse funktionelle Kategorien mit wenigen Einträgen als signifikant ausgewiesen. Prägnante Anreicherungen funktioneller Gruppen sind bei (-R)-korrelierten Transkriptmengen zu beobachten. Bei der Korrelationsanalyse sind die Kategorien Zellwand-Abbau ($P = 2 \times 10^{-05}$) und -Modifikation ($P = 4 \times 10^{-05}$) und PIP-Aquaporine ($P = 2 \times 10^{-04}$) deutlich signifikant. Die signifikanteste Anreicherung bei der gruppenbasierten Analyse wird bei den Aquaporinen (PIP)¹² erfasst ($P = 3 \times 10^{-04}$). Am Tag 21 werden die meisten signifikanten Korrela-

¹ HV10G09 ² HS16K05 HT10J22 ³ HS05D05 ⁴ HT12J13 ⁵ HF11K03 ⁶ HY08C22 ⁷ HB28L02
⁸ HY07I23 ⁹ HT02E24 ¹⁰ HT10H13 ¹¹ HZ39E06 ¹² HA16G04 HA25D23

3. ERGEBNISSE

Tabelle 3.7 – Ergebnisse der Korrelation von Expressionswerten (Tag 1, 7, 21) und phänotypischen Daten von *Triticum aestivum* (Beispiele).

cDNA ID	BLAST-Hit	Tag	Art der Korrelation	<i>r</i>	<i>P</i>
HS16K05	LEA	1	(+I)	0.943	*
HY05O13	Saccharose-Synthase	1	(+I)	0.943	*
HT12H02	Superoxid-Dismutase	1	(+I)	0.943	*
HF03M15	LEA	1	(+I)	0.943	*
HB27P22	Protein-Phosphatase 2C	1	(+I)	0.886	*
HZ44B09	Saccharose-Fructan 6-Fructosyltransferase	1	(+I)	0.829	*
HA21G13	Glutaredoxin	1	(+I)	0.829	*
HF24J18	Dehydrin 1	1	(+I)	0.771	
HA02B14	Dehydrin 13	1	(+I)	0.771	
HS05D05	Dehydrin DHN2	1	(+I)	0.771	
HT10J22	LEA	1	(+I)	0.771	
HT13P04	Dehydrin 11	1	(+I)	0.771	
HA14P07	Untereinheit des PS-II Reaktionszentrum	1	(-I)	-1.000	*
HF18M03	Eis-Rekristallisierung-Inhibierungsproteine	1	(-I)	-0.943	*
HY08F18	MtN3-ähnliches Protein	1	(-I)	-0.943	*
HB23J18	LEA 3	1	(-I)	-0.829	*
HA03D02	Peroxidase	1	(+R)	0.829	*
HA25B19	Untereinheit PS-I	1	(+R)	0.829	*
HT08A04	Dehydrin 12	7	(+I)	0.943	*
HS03H11	BLT14	7	(+I)	0.943	*
HA07O21	USP-Protein	7	(+I)	0.943	*
HZ59C18	hydrophobes Protein OSR8	7	(+I)	0.886	*
HF24J18	Dehydrin 1	7	(+I)	0.829	*
HF14H10	Dehydrin	7	(+I)	0.771	
HB08B02	stressinduziertem ST11-Protein	7	(-I)	-0.943	*
HS14K04	Gluthation-S-Transferase	21	(+I)	1.000	*
HT01P18	Superoxid-Dismutase	21	(+I)	0.943	*
HB23L09	SNF1-Kinase	21	(+I)	0.829	*
HB17M02	Peroxidase	21	(-I)	-1.000	*
HZ01H05	Zuckertransporter	21	(-I)	-1.000	*
HY08C22	BLT14-Protein	21	(-I)	-0.886	*
HA07C17	Chlorophyll-A/B-Protein	21	(+R)	0.886	*
HA30G01	Prolin-Dehydrogenase	21	(+R)	0.886	*

tionen bei den Gerstegenotypen beobachtet. Die Untersuchung der (+I)-korrelierten Gene zeigt eine signifikante Anreicherung von induzierten Genen des abiotischem Stress (Licht, $P = 7 \times 10^{-05}$), der Glykolyse ($P = 0.003$), des Ascorbat-Gluthation-Systems, der Lipidtransfer-Proteine, der Oxidasen (Redox) oder der Protein-Ubiquitinylierung. Die Ergebnisse der Quantifizierung der Gruppenseparabilität weisen 99 Einträge auf. Anreicherungen sind bei einer Vielzahl von Kategorien anzutreffen, wie z.B. beim Calcium-Transport ($P = 0.003$), von Hämoxxygenasen (Tetrapyrrolsynthese) und bei einigen Genen mit unbekannter Funktion ($P = 0.03$). Gene mit höherem Transkriptions-

Tabelle 3.8 – Ergebnisse der Korrelation von Expressionswerten (Tag 1, 7, 21) und phänotypischen Daten von *Hordeum vulgare* (Beispiele).

cDNA ID	BLAST-Hit	Tag	Art der Korrelation	r	P
HB19B20	cold-regulated protein 2	1	(+I)	0,886	*
HB25K03	PS II 44 kDA Protein	1	(+I)	0,829	*
HB16D18	NAC-TF (OsNAC6)	1	(+I)	0,771	
HB25B07	apoplastische Invertase I	1	(+I)	0,771	
HY01G14	Große Untereinheit von RuBisCO	1	(+I)	0,771	
HF24J18	Dehydrin 1	1	(+I)	0,714	
HF12F17	Oleosin	1	(-I)	-1,000	*
HA15M17	Zuckertransporter	1	(-I)	-0,943	*
HB06G09	beta-Glucanase	1	(-I)	-0,886	*
HZ56P10	GDP-Mannose 3,5-Epimerase	1	(+R)	0,771	
HA04N08	PS-II Reaktionszentrums Protein W	1	(-R)	-0,943	*
HR01E04	Expansin	1	(-R)	-0,829	*
HB19B20	cold regulated protein 2	7	(+I)	0,943	*
HT02F22	Thaumatococcus-ähnliches Protein	7	(+I)	0,943	*
HZ39H07	EF-Hand Ca-Bindeprotein	7	(+I)	0,943	*
HF18M03	Eisrekrystallisierungsinhibierungsprotein 2	7	(+I)	0,771	
HV12O24	12-Oxophytodienoat Reductase 1	7	(+R)	1,000	*
HA15A19	Peroxidase	7	(-R)	-0,943	*
HZ42I19	beta-Expansin	7	(-R)	-0,943	*
HA24A13	ribosomales Protein	7	(-R)	-0,829	*
HF04O13	Glutamin-Synthasen	7	(-R)	-0,829	*
HA16G07	putatives stressinduziertes Protein	21	(+I)	0,829	*
HF22E20	putativer Hexosetransporter	21	(+I)	0,829	*

niveau sind z.B. PDX1¹, Gluthation-S-Transferase², Lipidtransfer-Protein³, MtN3⁴ oder NAC⁵. Die signifikanten (-I)-kodierte Transkripte verteilen sich auf viele verschiedene Funktionen mit wenigen Einträgen in beiden Analysen. Bei den reprimierten und positiv korrelierten Genen (+R) kommt es zu hochsignifikanten Anreicherungen von Bestandteilen des Zellwand-Abbaus ($P = 4 \times 10^{-04}$), von Zellwand-Proteinen ($P = 0.001$) oder Zellwand-Vorstufen. Bei der Analyse der Gruppenseparabilität sind Bestandteile des PS II hochsignifikant angereichert ($P = 8 \times 10^{-07}$), vor allem Chlorophyll-A/B-Bindeproteine. Bei den (-R)-korrelierten Genen sind in beiden Analysen die signifikantesten Einträge die der Histone, die eine gute Auftrennung zwischen sensitiven und toleranten Genotypen aufweisen ($P = 0.001$ bzw. $P = 0.004$).

¹ HT09B05 ² HU01G03 ³ HT12K04 HT12M05 HZ38P01 ⁴ HS03O18 ⁵ HA24L10

4 Diskussion

Diese Arbeit untersucht die molekularen Grundlagen der Kälteakklimatisierung von Winterkultivaren bei Roggen, Weizen und Gerste. Die Genexpression während der Akklimatisierung wird dabei als Maß für die Ausprägung ihrer relativen Frosttoleranzen genutzt. Generell können differentiell exprimierte Gene während des kumulativen Prozesses der Kälteakklimatisierung Hinweise auf Kandidatengene für Frosttoleranz geben. Dass ein Transkript bzw. Protein als Antwort auf Temperaturänderungen akkumuliert, muss nicht auf einen biologisch relevanten Vorgang zur Erhöhung der Frosttoleranz hindeuten. Vielmehr können Gene auch andere Funktionen aufweisen als die, die aus der funktionellen Annotation abgeleitet wurden. Die vorliegenden Genexpressionsdaten weisen auf physiologische Veränderungen hin und sind Ansatzpunkte für weiterführende, experimentelle Untersuchungen. Zum Beispiel können auffällig kälteregulierte Gene unter Zuhilfenahme von qRT-PCR, Western-Blotting, Fluoreszenzmikroskopie oder auch durch transgene Ansätze funktionell charakterisiert werden.

Die Ausbildung der Frosttoleranz ist ein komplexes Phänomen, bei der Pflanzen massive physiologische Änderungen vollziehen. Die Kälteakklimatisierung ist die wichtigste Phase für die Ausbildung der maximal erreichbaren Frosttoleranz von temperenten Pflanzen. Infolge der Temperaturabsenkung wird die Kinetik der (tausenden) metabolischen Reaktionen einer Zelle thermodynamisch reduziert. Sie müssen auf die veränderten Umweltbedingungen angepasst werden. Darüber hinaus wird die Stabilität von Proteinen reduziert, so dass metabolische Prozesse aus dem Reaktionsgleichgewicht gebracht werden. Die erhöhte Rigidität von Membranen führt zu einer Beeinträchtigung aller membranassoziierten Prozesse. Aufgrund der reduzierten Kinetik der detoxifizierenden Enzyme entstehen vermehrt reaktive Sauerstoffverbindungen, die zu Membranschäden führen können. Zusätzlich werden die sich im Chloroplasten befindlichen Elektronentransportketten stärker reduziert, so dass auch hier reaktive Sauerstoffverbindungen gebildet werden. Die vermehrte Ausbildung von Sekundärstrukturen bei RNA-Molekülen beeinflusst die Expression von Genen und Proteinen. Die Bildung von Eiskristallen bei Frost führt zur Zelledehydrierung und dadurch zu einem geringen Zellvolumen. Letztlich können Eiskristalle im Symplast auftreten und zu letalen Schäden an intrazellulären Strukturen führen. Dies erleichtert die Ausbreitung von Pathogenen, die zu Schädigungen des Organismus führen. Neben diesen Aspekten können Eiseinschluss und Überflutung zu Sauerstoffmangel (Hypoxia bzw. Anoxia) führen.

4.1. Genregulation während der Kälteakklimatisierung

Insgesamt konnten 31 Gene identifiziert werden, die in allen 18 Genotypen induziert werden. Von diesen 31 sind 12 als unbekannt annotiert worden. Sie könnten für solche Aspekte der Frosttoleranz der *Triticeae* von Bedeutung sein, die bisher noch keine Beachtung fanden. Erweitert man die Auswahl der Gene, die einen Score von 3 aufweisen, steigt die Zahl auf 84 unbekannte Faktoren an. Aufgrund der z.T. fehlenden Homologien erweist sich die Aufklärung der Funktion als arbeitsintensiv und möglicherweise wenig erfolgsversprechend. Methoden der reversen Genetik wie gerichtete Mutagenese oder RNA-Interferenz können jedoch wertvolle Informationen über ihre funktionelle Rolle geben.

Studien belegen, dass tolerante Arten eine größere Respirationshomeoöstate besitzen, um ein Wachstum bei ungünstigen Bedingungen zu gewährleisten (Kurimoto *et al.*, 2004; Yamori *et al.*, 2009). Diese Beobachtung wird von der Tatsache gestützt, dass tolerante Arten bzw. Genotypen eine höhere Induktionstemperatur für die Kälteakklimatisierung besitzen und damit auch schneller akklimatisieren können. Die vorliegende Transkriptomanalyse bestätigt diesen Sachverhalt dadurch, dass bei Gerste eine bis in die Spätphase andauernde Genregulation zu beobachten ist. Einige charakteristische Genregulationen bei Gerste könnten sich nachteilig auf die Frosttoleranz auswirken. Die Aufhebung der Repression von Histongenen kann bspw. als eine fehlregulierte Replikation während der Kälteakklimatisierung interpretiert werden. Die Repression von Expansin- und Tetrapyrrol-Transkripten und eine verstärkte Ubiquitynylierung in der Spätphase gehören zu den Mechanismen, die sich im gleichen Sinne als suboptimal interpretieren lassen. Hingegen werden einige Transkripte, die in Zusammenhang mit Frosttoleranz stehen, bei den toleranteren Arten stärker bzw. kontinuierlich induziert. Am deutlichsten drückt sich dieses bei LEA-ähnlichen Proteinen aus. Die Komponenten der Redoxregulation bei Roggen werden bereits in der Frühphase transient aktiviert. Auffallend sind auch die selektive Induzierung von Glutamin-Synthasen und Glutamat-Dehydrogenasen im Stickstoffmetabolismus und einige charakteristische Veränderungen im Aminosäurestoffwechsel. Bei Roggen wird eine verstärkte Induzierung von Effektoren gegen Pathogenbefall beobachtet. Eine auffallend starke Transkription von Dissimilation-, Redoxregulation- und Tocopherolsynthese-mRNA's wird bei Weizen erfasst. Insbesondere zeigen calciumbindende Proteine in der Signaltransduktion von abiotischem Stress divergente Expressionsprofile zwischen den Spezies auf. Möglicherweise wird dadurch eine funktionelle Redundanz durch die Regulation isoformer Mitglieder mehrerer Genfamilien zwischen den Spezies erzeugt. Andererseits ist aufgrund von Polyploidie-Ereignissen während der Evolution der *Triticeae* anzunehmen, dass Gene eine Neofunktionalisierung bzw. Subfunktionalisierung erfahren haben und die Pflanzen somit ihre Anpassungsfähigkeit an ihre Umwelt erhöhen konnten (Wendel, 2000). Eine weitere denkbare Anpassung an extreme Habitats ist die Induzierung von kälteadaptierten Enzymen, wie sie bereits bei Mikroorganismen nachgewiesen wurde (Siddiqui und Cavicchioli, 2006).

Roggen stellt ein Modell für die Resistenz gegen abiotischen Stress dar. Daher sind Gene, die nur in Roggen induziert werden, attraktive Ziele zur Verbesserung der Toleranz. Wie schwierig jedoch die Übertragung der Frosttoleranz selbst innerhalb der *Triticeae* ist, zeigten bereits Dvorak und Fowler (1978) anhand von oktaploider *Triticale*, die nur die Frosttoleranz des parentalen Weizens erreichte. Dass die Frosttoleranz nicht höher ist, könnte die Konsequenz in dem eingangs vorgestellten Konzept der Physiotypen

sein: die Spezies könnten demnach unterschiedliche Mechanismen während der Evolution entwickelt haben, um sich gegen widrige Umwelteinflüsse schützen zu können. Auch anatomische Vorteile zur Stressvermeidung (z.B. ausgeprägtes Wurzelsystem des Roggens) ermöglichten erst die Kolonisierung schwieriger Standorte.

4.1.1. Photoakklimatisierung: Interaktion von Photosynthese (PS) und Kohlenhydrat-Metabolismus (CHO)

Im Gegensatz zu perennierenden Pflanzen kommt es bei den winteranuellen *Triticeae* nach einer vorläufigen Einstellung der Entwicklung zu einem primären Wachstum und einem Bedarf von Photoassimilaten (Savitch *et al.*, 2002; Leonardos *et al.*, 2003). Bei Roggen, Weizen und Gerste wurde genotypunabhängig eine starke Repression der Photosynthesegene – vor allem die des PS II und später beim PS I – beobachtet. Nach der Repression kommt es bei den *Triticeae* zu einer Steigerung der Transkriptabundanz von Photosynthesegenen in der Spätphase der Kälteakklimatisierung. Dies ist ein bekannter Prozess und wird als Photoakklimatisierung bezeichnet. Die Suppression der Photosynthese ist notwendig, um die sogenannte Photostasis, der Energiefluss zwischen photophysikalischen und photochemischen Prozessen, aufrechtzuerhalten (Ensminger *et al.*, 2006). Um eine Photoinhibition zu vermeiden, muss das Gleichgewicht zwischen den photophysikalischen Prozessen und den langsamer ablaufenden photochemischen, temperaturabhängigen Reaktionen (Calvin-Zyklus) angepasst werden. Die Mechanismen, die zur Photoakklimatisierung führen, umfassen u.a. Modifikationen der Thylakoidmembran (Elektronentransport), posttranskriptionale Aktivierung und vermehrte Expression von Saccharose-Biosyntheseenzymen sowie eine veränderte Expression von Enzymen des Calvin-Zyklus (Huner *et al.*, 1998, 2003; Stitt und Hurry, 2002). Die schnelle Inhibierung (innerhalb von Minuten) der Saccharose-Synthese hat zur Folge, dass eine erhöhte Phosphorylierung von Intermediaten des Calvin-Zyklus vorliegt, und damit die Bildung von ATP aus ADP durch den Mangel an inorganischem Phosphor und durch die Anreicherung von Glycerat-3-Phosphat verhindert wird (Stitt und Hurry, 2002). Nachhaltige Veränderungen umfassen die Induktion der Saccharose-Synthese sowie den Schutz vor Photoinhibition durch einen erhöhten Elektronentransport (Strand *et al.*, 1999; Hurry *et al.*, 2000). Bei einem physiologischen Vergleichsexperiment bei Roggen und Weizen, konnte bei Ersterem die höchste Photosyntheserate bei Lichtsättigung gemessen werden. In der selben Studie wurde eine positive Korrelation zwischen Frosttoleranz und Erholung der Photosynthese bei Sommer- und Wintertypen beobachtet (Oquist *et al.*, 1993).

Die Daten der vorliegenden Analyse bestätigen die o.g. Beobachtungen der Literatur: bei den Roggenlinien kommt es zu wenigen signifikanten Anreicherungen von PS- und CHO-Transkripten über den gesamten Zeitraum. Bei den Weizenkultivaren kommt es zu einer nachhaltigen Suppression der Photosynthese-Transkripte und einer gleichzeitigen Induktion des Kohlenhydratstoffwechsels bei den toleranten Genotypen. Die umfangreiche Aktivierung des Kohlenhydratstoffwechsels unterstützt damit die Reaktivierung der Photosynthese in der Früh- bis Mittelphase durch die Bereitstellung von Phosphat. Weiterhin bekannt bei Weizen ist, dass entwicklungsbiologische und physiologische Prozesse zu einer modifizierten Photoakklimatisierung in der Spätphase der Kälteakklimatisierung führen (Ensminger *et al.*, 2006). Denkbar wäre auch, dass durch die stärkere Induktion der Respiration (Glykolyse) vorläufig Energie aus Speichermolekülen wie Stärke bereitgestellt wird, um die Entstehung von ROS durch die

Photosynthese zu vermeiden. Bei den Gerstekultivaren kommt es bereits in der Frühphase zu hochsignifikanten Anreicherungen reprimierter PS-Transkripte. Anders als bei den Weizenkultivaren tritt die Induktion des Kohlenhydratstoffwechsels und die der Respiration erst in der Mittel- bis Spätphase ein, so dass hier ein deutlicher temporaler Unterschied zwischen den Arten besteht. Kältetolerante Arten und Ökotypen besitzen neben der höheren Photosyntheserate auch ein niedrigeres Temperaturoptimum für die Photosynthese (Sage, 2002). Die Photosyntheserate wird limitiert durch die Carboxylierung von Ribose-1,5-Biphosphat und dessen Regeneration im Calvin-Zyklus (Farquhar *et al.*, 1980). In einer Untersuchung zwischen toleranten und sensitiven Arten wurde festgestellt, dass tolerante Arten eine höhere Temperatur-Homöostase (bei Photosynthese und Respiration) aufweisen (Yamori *et al.*, 2009). Der Vorteil einer höheren Temperatur-Homeoöstase liegt darin begründet, dass in den natürlichen Habitaten der kältetoleranten Arten höhere tägliche und saisonale Temperaturfluktuationen auftreten und sie daher weniger ihre Wachstumsraten an die Umgebungstemperaturen anpassen müssen (Yamori *et al.*, 2009). Dass *Secale cereale* langsamer auf Temperatursenkungen anspricht geht auch aus der genotypischen Analyse hervor. In der Studie von Yamori *et al.* (2009) wurde die RuBisCO-Aktivität bei toleranten und sensitiven Arten untersucht. Dabei konnten sowohl vorteilhafte Unterschiede in der Kinetik von RuBisCO als auch quantitative Unterschiede für die toleranten Arten gefunden werden. Bei Weizen kommt es zu einer massiven Induktion von RuBisCO-Transkripten in der mittleren Phase der Kälteakklimatisierung. Die geringere Induktion von RuBisCO bei Roggen könnte darauf hinweisen, dass bereits eine ausreichende Quantität an RuBisCO *per se* verfügbar ist, die unter optimalen Wachstumsbedingungen gebildet worden ist. Parry *et al.* (2008) diskutieren die inhibitorische Rolle von ROS für RuBisCO, bei der es zur Oxidation bestimmter Residuen von RuBisCO kommt und damit das Protein für die Degradation markiert. *Secale cereale* könnte weniger unter oxidativen Stress leiden als Weizen und Gerste und damit weniger Energie in die Biosynthese von RuBisCO investieren. Bei allen *Triticeae* tritt eine frühe, transiente Repression von Chlorophyll-A/B-Bindeproteinen (*chlorophyll-A/B-binding protein*, CAB oder *Lhcb*) im LHC II auf, die sich in der Spätphase auflöst. Der mögliche Grund kann die langfristige Reorganisation des LHC II sein. Die Größe des LHC II wird durch die transkriptionale und translationale Regulation reduziert, um die Wahrscheinlichkeit zu verringern, dass Licht überhaupt absorbiert wird. Um genügend ATP bilden zu können, wird das PS I weniger stark bei Weizen und Gerste inhibiert, um so den zyklischen Elektronentransport aufrechterhalten zu können. Dieser Vorgang wurde bereits in *Pinus* beobachtet (Ivanov *et al.*, 2001). Dieser Sachverhalt könnte auch erklären, warum die toleranten Genotypen des Weizens über eine verlängerte Suppressionsphase von CAB-Transkripten verfügen. Die signifikanten Anreicherungen der Untereinheiten des Reaktionszentrum des PS I könnten auf eine bisher nicht beachtete Reorganisation in der Spätphase hindeuten.

4.1.2. Die Aktivierung des CHO-Metabolismus ist entscheidend für die Ausprägung der Frosttoleranz

Pflanzen benötigen Energie, um die physiologischen Änderungen während der Kälteakklimatisierung zu bewältigen. Neben Substrat für die Glykolyse sind lösliche Zucker, speziell Saccharose, wichtige Signalmoleküle in der Regulation der Kälteakklimatisierung. Sie beteiligen sich an der Regulation des Kohlenhydratmetabolismus, der Steuerung von Entwicklungsprozessen, der Verteilung von Assimilaten, der Expression von Genen

oder bei der Interaktion mit Sensormolekülen (Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Gibson, 2000; Rolland *et al.*, 2006; Gonzali *et al.*, 2006). So konnten Uemura und Steponkus (2003) nachweisen, dass exogen verabreichte Saccharose bei *Arabidopsis* die Frosttoleranz erhöht. Die Autoren vermuten, dass die Ausbildung der Toleranz auf zwei verschiedenen Mechanismen beruht. Saccharose kann sowohl als Substrat für den Metabolismus, als auch cryoprotektiv wirken. In einem Experiment von Rekart-Cowie *et al.* (2008) konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von COR78 (LEA) bei *Arabidopsis* direkt von Saccharose beeinflusst wird. Neben den kurzfristigen Schutzmechanismen kommt es zu einer langfristigen Umsetzung von Stärke zu Saccharose und anderen freien Zuckern. Unter natürlichen Bedingungen vollzieht sich dieser Prozess im Herbst und die Konversion zu Stärke im Frühling (Siminovitch *et al.*, 1953; Kaplan *et al.*, 2006).

Erwartungsgemäß sind die Transkripte für die Synthese von löslichen Kohlenhydrate wegen ihrer wichtigen regulatorischen Funktionen bei allen *Triticeae* hochsignifikant induziert (Saccharose-Synthasen bzw. Invertasen). Ebenfalls von Bedeutung ist die Aktivierung von β -Amylasen, die konserviert induziert werden. β -Amylasen metabolisieren Stärke zu Maltose und werden bei niedrigen Temperaturen in *Arabidopsis* akkumuliert. Die protektiven Eigenschaften von Maltose und Glucose bzw. Fructose als kompatible Solute (Osmolyte) im Chloroplasten (Elektronentransportkette und PS II) sind in der Literatur beschrieben (Kaplan und Guy, 2004, 2005). Eine spezifische Genregulation von β -Amylasen wurde bei *Arabidopsis* bei Kaplan und Guy (2004) und in der vorliegenden Studie beobachtet: unterschiedliche Isoformen von β -Amylasen antworten spezifisch auf Kälte. In dieser Studie wurden auch α -Amylasen aktiviert und so verdeutlicht die Studie damit die umfassende Stärkehydrolyse bei den *Triticeae*. Bei *Triticum aestivum* wird zusätzlich eine *glucan water dikinase* (GWD, HA21G09) induziert, die Stärke an der C6-Position phosphoryliert und den Abbau durch β -Amylasen beschleunigen kann (Lloyd *et al.*, 2005; Ritte *et al.*, 2006; Edner *et al.*, 2007). So kann auch die vermehrte und starke Induktion des Kohlenhydratmetabolismus und der Dissimilation des Weizen erklärt werden, indem GWD den Abbau der Reservestärke unterstützt und schneller verfügbar macht. Eine konservierte Antwort auf Kältestress in den *Triticeae* bildet die Induktion einer Glykogensynthase Kinase (GSK, HY06K05), die eine wichtige Verbindung zwischen der Stress-Signaltransduktion und dem Kohlenhydrat-Metabolismus darstellt (Kempa *et al.*, 2007). In *Medicago sativa* konnten bei osmotischen Stressexperimenten mit einer transgenen Linie, die eine Glykogensynthase Kinase (*MsGSK4*) überexprimiert, ein veränderter Kohlenhydrat-Metabolismus, eine vermehrte Stärkeeinlagerung und eine erhöhte Stresstoleranz nachgewiesen werden. Die erhöhte Stresstoleranz wird den höheren Osmoprotektant-Konzentrationen von Raffinose und Galactinol zugeschrieben. Die Daten sprechen dafür, dass dieser Mechanismus ebenfalls unter Kältestress aktiviert wird und damit auch für die gute Frosttoleranz der *Triticeae* verantwortlich sein könnte. Die konservierte Aktivierung der Transkription von Inositol-Polyphosphat-Kinasen (IPK1, IPK2) und anderen Inositol-modifizierenden Enzymen verdeutlicht die herausragende Rolle von Inositol-Polyphosphaten in der Signaltransduktion von Kältestress. Inositol-Kinasen sind an der Plasmamembran lokalisiert und regulieren diverse zelluläre Funktionen in Pflanzen (Lemtiri-Chlieh *et al.*, 2003).

Das kodierende Gen für die Raffinose-Synthase ist für die Synthese des bekannten Osmoprotektant Raffinose unabdingbar. Eine Induktion wird aber nur in Weizen und Gerste (zusätzlich auch Galactinol-Synthase) unter den beschriebenen Analysebedingungen nachgewiesen. Die von Zuther *et al.* (2004) durchgeführte Studie bei *Arabidopsis* „Knock-Out“-Mutanten für die Raffinose-Synthase zeigte, dass Raffinose nicht unbedingt

notwendig für die Entwicklung der Frosttoleranz ist. Ähnlich könnte sich diese Sachlage auch bei den anderen löslichen Kohlenhydraten aus der Raffinose-Familie (Raffinose, Stachyose), bei Trehalose und Galactinol darstellen, da die Induzierung der Transkripte für ihre Biosynthese in Roggen nicht beobachtet wird. Trehalose-6-Phosphat Synthase/Phosphatase ist in der Synthese von Trehalose aus Saccharose involviert und als Osmoprotektant bekannt. Bei mehreren transgenen Überexpressionsexperimenten zeigte sich, dass der Gehalt von Trehalose nur wenig mit der Toleranz korreliert, aber indirekt die Genexpression von bekannten kälteinduzierten Genen positiv beeinflusst (Bae *et al.*, 2005; Iordachescu und Imai, 2008). In einer weiteren Studie mit einer transgenen *Arabidopsis*-Linie, die verstärkt Galactinol und Raffinose synthetisiert, konnten antioxidative Funktionen nachgewiesen werden (Nishizawa *et al.*, 2008). Wie im vorherigen Abschnitt ausgeführt wurde, besitzen kältetolerante Arten eine *per se* höhere Photosynthesekapazität bedingt durch eine verstärkte RuBisCO-Aktivität. Pellny *et al.* (2004) konnten mit überexprimierenden Trehalose-Biosynthese Genen (Trehalose-Phosphat-Synthase, T6P) bei *Arabidopsis* zeigen, dass dadurch die Photosynthesekapazität erhöht werden kann. Weizen könnte durch Induktion dieser Transkripte die geringere Photosynthesekapazität – im Vergleich zu Roggen – kompensieren. Welcher Mechanismus zur Erhöhung der Photosynthesekapazität durch T6P führt, ist bisher nicht bekannt. Er wird im Bereich der Feedback-Kontrolle der Photosynthese und Kohlenhydratregulation vermutet.

4.1.3. Zellwandmodifikationen sind charakteristisch für die Kälteakklimatisierung

Die Zellwand ist – neben dem Schutz gegenüber Pathogenen – eine Barriere für die Ausbreitung von Eiskristallen, die sich in der extrazellulären Matrix bilden können. Die Eisbildung hat zur Folge, dass Wasser aus dem Cytoplasma aufgrund des niedrigeren Wasserpotentials des Eises diffundiert und so zur Dehydratation der Zelle führt. Die Änderung des Zellvolumens kann soweit führen, dass die Zellwand mit dem Protoplasma kollabieren kann (Pearce, 1999). Daher ist es für die Pflanze notwendig, die Flexibilität der Zellwände und Plasmamembranen zu gewährleisten. Bei allen *Triticeae* werden Transkripte für die Biosynthese von Zellwänden reguliert. Saccharose-Synthasen sind funktionell mit der Zellwandsynthese verbunden (Koch, 2004).

Neben den diversen Transkripten für die Synthese von Zellwandvorstufen (bspw. Rhamnose) werden auch Cellulose-Synthasen bei den *Triticeae* induziert. Die potentielle Funktion der Cellulose-Synthasen könnte darin liegen, die Zellwand aufgrund der mechanischen Beanspruchung zu verstärken, wie Nogueira *et al.* (2003) bei *Saccharum* sp. postuliert haben. Die konservierte Induktion von Cellulose-Synthasen in allen *Triticeae* in der mittleren Phase der Kälteakklimatisierung deutet auf eine stresspezifische Funktion hin. Eine entwicklungsbedingte Genregulation (z.B. durch Wachstum) kann hier nicht vollständig ausgeschlossen werden. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass eine entwicklungsbedingte (graduelle) Genregulation erst in der Spätphase der Akklimatisierung erfassbar ist.

Bei *Hordeum vulgare* ist eine signifikante Repression der gesamten funktionellen Gruppe „Zellwandmodifikation“ – insbesondere die der Expansine in der Spätphase – zu beobachten. Expansine sind an der pH-abhängigen Druckentspannung bei der Entwicklung und beim Wachstum von Pflanzen beteiligt (Cosgrove, 1997, 2000). Daneben sind Expansine an der Bewältigung von abiotischen Stressbedingungen beteiligt, wie

unter Trockenstressbedingungen bei Weizen festgestellt wurde (Zhao *et al.*, 2011). Die Induktion von Expansinen lässt Zellwände dehnbarer und erweiterbarer werden (Wu und Cosgrove, 2000). Eine weitere Erklärung für die Repression der Expansine bei Gerste könnte das reduzierte Wachstum sein, wie es bereits bei *Arabidopsis* und α -Expansinen beobachtet wurde (Lee *et al.*, 2005). Der positive Effekt von Expansinen unter abiotischen Stressbedingungen wurde vielfach belegt (Provart *et al.*, 2003; Walia *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2008; Geilfus *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011). Dass es sich bei den Expansinen um eine funktionell heterogene Genfamilie handelt wird dadurch deutlich, dass bei Gerste das Expansin-ähnliche Protein (HS18A12) permanent in den sensitiven Genotypen induziert wird.

4.1.4. Die abiotische Stressantwort beinhaltet eine biotische Komponente

Die funktionelle Gruppe stressinduzierter Transkripte deckt ein breites Repertoire funktioneller Effektoren gegen abiotische und biotische Einflüsse ab. Wie schwierig die Trennung zwischen einer abiotischen und biotischen Stressantwort ist, verdeutlichen einige PR-Proteine (*pathogenesis related*) bei Roggen, die Toleranz gegen Pathogene vermitteln oder auch Funktionen in der abiotischen Stressantwort einnehmen. Alle *Triticeae* induzieren – hauptsächlich in der Spätphase – eine Reihe von Genen, die im Zusammenhang mit biotischem Stress stehen und potentielle Effektoren gegen Pathogene darstellen. Die späte Induktion von Verteidigungstranskripten wurden bereits in einer Transkriptomanalyse von Gaudet *et al.* (2011) bei Weizen bestätigt. Sie stehen in Relation mit einer gesteigerter Toleranz gegenüber Pathogenen nach 21-42 Tagen Kälteakklimatisierung. Besonders am Winterende, wenn Pflanzen ihre Energiereserven aufgezehrt haben und Frostschäden aufweisen, kommt es zu Befall von psychrophilen Pathogenen wie *Typhula incarnata*, *Sclerotinia borealis* und *Microdochium nivale* unter der schützenden Schneedecke (Jamalain, 1974). Homologe Mitglieder der Genfamilie der Hordothionine, die in Gerste antifugale Eigenschaften aufweisen, liegen bei Roggen und Weizen induziert vor. Andere antifugale PR-Proteine wie Glucanasen, Thaumatin-ähnliche Proteine (TLP) und Chitinasen sind gleichermaßen bei allen *Triticeae* induziert.

Eine vermehrte Induzierung wird bei Roggen beobachtet, so dass eine statistische Anreicherung auftritt. Roggen wird neben Weizen und Gerste in größerem Maße in den nördlichen Breitengraden angebaut, wo im Winter mit einer permanenten Schneedecke zu rechnen ist. Wie wichtig die Resistenz gegen fungale Pathogene ist, zeigt die hohe genotypische Korrelation zwischen Frosttoleranz und Pathogenresistenz bei der Poaceae *Dactylis glomerata* (Tronsmo, 1993). Die Expression von PR-Proteinen kann als eine regionale Adaption der Frosttoleranz angesehen werden. Regionale Adaptionen konnten bei verschiedenen *Triticeae*-Varietäten bei diversen Feldversuchen in Kanada und Finnland nachgewiesen werden (Andrews *et al.*, 1986; Hommo und Pulli, 1993). Frostschäden können auf biotische (z.B. Schneeschimmel) und abiotische Stressoren (Frost bzw. Kahlfröste, Bodenhebung, Dehydrierung, Eiseinschluss, Überflutung, UV) zurückgeführt werden und können regional unterschiedlich ausgeprägt sein. Mehrere Winterroggen induzieren Endo- β -1,3-Glucanasen, Endochitinasen und TLP's, die auch eine inhibitorische Aktivität von Eiskristallbildung zeigen (Hon *et al.*, 1995; Griffith und Yaish, 2004). Welche Unterschiede zwischen PR-Proteinen mit Eiskristallinhibierungsaktivität und gewöhnlichen PR-Proteinen bestehen, ist bisher unbekannt. Vermutlich können andere Faktoren wie Ca^{2+} die Funktion modifizieren (Stressmann *et al.*, 2004). Die mutmaßlichen biotischen Effektoren könnten damit auch an der Bewältigung abiotischen Stresses

beteiligt sein und somit die Frosttoleranz von Roggen maßgeblich verbessern. Sie sind ein vortreffliches Beispiel, wie orthologe Gene unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen können.

Unter den konservierten Reaktionen der *Triticeae* ist die Expression von Hitzeschock-Proteinen (HSP) von Bedeutung. HSPs sind molekulare Chaperone und umfassen mehrere konservierte Proteinfamilien mit unterschiedlichen Funktionsmechanismen. Die Mitglieder der Genfamilie von HSP-70 werden bei verschiedenen Stimuli unterschiedlich reguliert. HSP-70 wird in *Arabidopsis* bei Kälte induziert und dient als molekulares Chaperon im Cytoplasma und Mitochondrium (Sung *et al.*, 2001). Andere HSP-Genfamilienmitglieder werden v.a. in Weizen und Gerste früh induziert (z.B. HSP-17.4). Die unterschiedlichen funktionellen Rollen der HSP könnten daher bei den *Triticeae* zusätzliche protektive Eigenschaften zeigen. Eine Bestätigung für die wichtige Funktion der kleineren HSP's wurde im Zusammenhang mit Trockenstress bei Gerste gefunden (Guo *et al.*, 2009). Ein positiver Effekt auf die Kältetoleranz bei Tomaten konnte mit einer transgenen Linie, die ein kleines HSP überexprimiert, in einer Studie nachgewiesen werden (Wang *et al.*, 2005). Auch bei der Phänotyp-Genotyp Korrelationsanalyse sind bei allen *Triticeae* HSP's unter den positiv-korrelierten und induzierten Transkripten (+I) vertreten.

Die Rolle der WCOR410-Genfamilie bei Ausbildung der Frosttoleranz wurde bereits von Danyluk *et al.* (1994) untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass ausschließlich die frosttoleranten Spezies Roggen, Weizen und Gerste im Unterschied zu den sensitiven Kulturpflanzen wie Hafer, Mais, Reis und Raps Proteine der WCOR410-Familie akkumulieren. Die WCOR-410 Genfamilie gehört zu den D-11 LEA-Proteinen und unterscheidet sich von Dehydrinen durch ihre Azidität. Einige Isoformen sind an der Plasmamembran von vaskulären Zellen lokalisiert (Danyluk *et al.*, 1998). Die Beobachtung, dass WCOR410 ihre cryoprotektiven Aktivitäten in unterschiedlichen Kompartimenten entfalten, erklärt auch die unterschiedliche Expression zwischen den *Triticeae*: Roggen und Weizen akkumulieren isoforme Proteine deutlich länger als Gerste. WCOR410-Gene kommen daher als potentielle Kandidatengene für die Verbesserung der Frosttoleranz bei Gerste durch gentechnische Ansätze in Frage, indem sie sensitivere Gewebe vor Dehydrationschäden schützen könnten. Borovskii *et al.* (2002) konnten in Roggen und Weizen Dehydrin-ähnliche Proteine identifizieren, die spezifisch im Mitochondrium akkumulieren. Zeitliche und quantitative Unterschiede in der Expression von WCOR410 in meristematischen Sprossspitzen (*crown tissue*) und Blättern von Weizengenotypen konnten Ganeshan *et al.* (2008) feststellen, die ebenfalls eine starke Anreicherung von Transkripten in einem toleranten Genotyp nachgewiesen haben.

4.1.5. Hydrophiline werden verstärkt in Roggen und Weizen induziert

Hydrophiline sind Gly-reiche (6%) hydrophile Moleküle (Hydrophilitätsindex > 1) und werden als Proteine der „Späten Embryogenese“ (*late embryogenesis abundant proteins*, LEA) bezeichnet. Eine der am besten charakterisierten Untergruppen der LEA-Proteine sind Dehydrine (Gruppe 2 LEA, oder „D-11“). Als gemeinsames Merkmal besitzen sie ein konserviertes und lysinreiches K-Segment mit der Aminosäuresequenz EKKGIMDKI-KEKLPG, das in mehren Kopien in einem Polypeptid vorkommen kann (Close *et al.*, 1989). Sie entfalten ihre protektiven Eigenschaften im Cytoplasma und im Nukleus. LEA-Proteinen werden im Allgemeinen protektive Eigenschaften unter abiotischem Stress, wie Wassermangel, zugeschrieben, wobei die Funktionsmechanismen bisher noch nicht

aufgeklärt wurden (Hundertmark und Hinch, 2008). Es gibt Hinweise darauf, dass LEA-Proteine enzymatische Reaktionen unter ungünstigen Bedingungen aufrechterhalten können (Reyes *et al.*, 2005). Wie die artspezifische Anreicherungsanalyse bestätigt, wird bei Roggen und Weizen eine signifikante Anreicherung induzierter LEA-Gene über den gesamten Zeitraum hinweg detektiert. Diese Beobachtung wird unterstützt durch mehrere Publikationen, die die cryoprotektiven Eigenschaften von LEA-Proteinen für die Verbesserung der Kältetoleranz bei mehreren Spezies belegen (Danyluk *et al.*, 1994; Ismail *et al.*, 1999a,b; Puhakainen *et al.*, 2004). Dass LEA-Proteine auch interspezifische Stressresistenz verleihen können, konnte in einem Überexpressionsexperiment von *HVA1* und *WCOR410* bei *Oryza sativa* bzw. *Fragaria × anassassa* gezeigt werden (Xu *et al.*, 1996; Houde *et al.*, 2004). Ein LEA mit Homologie zu WSI18 wird nur bei Roggen induziert. Das Protein steht bei *Arabidopsis* unter der Kontrolle von *ABF3*, einem Transkriptionsfaktor, der ABA-Gene induziert (Kang *et al.*, 2002). In einer Studie bei *Oryza sativa* konnte durch eine vorherige Trockenstressbehandlung die Kältetoleranz eines sensitiven Kultivars erhöht werden (Takahashi *et al.*, 1994). Dass WSI18 bei Trockenheit in *Oryza sativa* exprimiert wird, könnte darauf hinweisen, dass Roggen über effektivere Mechanismen zur Bewältigung des assoziierten Trockenstresses bei Frost verfügt. Einen weiteren Hinweis auf den positiven Effekt von WSI18 bei Trockenstress liefern die Ergebnisse von Oh *et al.* (2005) mit transgenem *Oryza sativa*.

4.1.6. Histone zeigen eine speziesabhängige Genregulation in der Spätphase

Histone sind hochkonservierte Bestandteile von Nukleosomen, die für die strukturelle Integrität der DNA essentiell sind. Modifikationen wie Acetylierung oder Methylierung haben einen maßgeblichen Einfluss auf die Expression von Genen. Die Repression der Histongene mit einem Minimum am Tag 7 und dem nachfolgenden graduellen Anstieg ihrer Transkriptabundanz wurde in einer anderen Transkriptomanalyse bei Gerste ebenfalls beobachtet (Janská *et al.*, 2011). Dabei wurde die Repression von H2A und HTA11 Histon-Typen mit einem Nukleosom-Remodelling während der Kälteakklimatisierung in Zusammenhang gebracht. Wie eingangs erläutert, zeigen diese Histone (H2A.Z, HTA11) eine temperaturabhängige Zunahme der Affinität zur DNA bei niedrigen Temperaturen (Kumar und Wigge, 2010). Die Autoren vermuten, dass die Repression mit der transienten Regulation eines „Kälte-Transkriptoms“ korreliert und durch eine umfangreiche Genregulation charakterisiert wird. Diese Beobachtung konnte auch in dieser Analyse besonders bei Histonen des H2A-Typus bestätigt werden. Das reduzierte Wachstum während der Kälteakklimatisierung ist ein weiterer entwicklungsbedingter Vorgang, der zur Absenkung der Transkriptabundanz von Histogenen führt. Jedoch zeigt sich bei Roggen und Weizen eine umfassende Repression bis in die Spätphase hinein. Die toleranten Spezies verfügen möglicherweise über einen Mechanismus, der für eine längere Transkription des „Kälte-Transkriptoms“ verantwortlich ist. Dieser Mechanismus kann eine weitere Komponente sein, die zu einer besseren Ausprägung der Frosttoleranz von Roggen und Weizen führt. Dass die Adaptivität bzw. Widerstandsfähigkeit von Organismen durch Regulierung der transkriptionellen Aktivität an mehreren Ansatzstellen erhöht wird, zeigten Tsankov *et al.* (2006) in einer systembiologischen Meta-Analyse. Wie sich solch ein Mechanismus im einzelnen darstellt, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Denkbar wären Chromatin-Immunopräzipitations-Experimente (ChIP), welche Proteine (Repressoren, Transkriptionsfaktoren usw.) identifizieren können, die mit dem Chromatin in Wechselwirkung treten könnten. Eine Möglichkeit zur weiteren ex-

perimentellen Validierung wäre die Überprüfung der Frosttoleranz von transgenen Linien mit einem bzw. mehreren bestimmten Histongen(en), die unter Kontrolle eines kälteinduzierten Promotors stehen und die kälteregulierte Repression kompensieren können.

4.2. Korrelation der differentiellen Genexpression mit Frosttoleranz in Roggen, Weizen und Gerste

Die Analyse umfasst die Berechnung von phänotypischen Korrelationskoeffizienten, um Genexpressionsunterschiede zwischen toleranten und sensitiven Genotypen zu identifizieren. Die wichtigsten Anpassungen werden zu Beginn der Kälteakklimatisierung initiiert (Fowler, 2008). Erwartungsgemäß zeigen die beiden ersten Zeitpunkte (Tag 1 und 7, induzierte Genexpression) die höchsten Varianzen bei der Hauptkomponentenanalyse. Die zahlreichen signifikanten Korrelationen bei Weizen könnten darauf zurückzuführen sein, dass die Kälteakklimatisierungsbedingungen für Weizen optimal sind. Beispielsweise könnten die Akklimatisierungstemperatur oder die Zeitpunkte der Probenentnahme für Roggen und Gerste variiert werden, um mehr signifikante Korrelationen zu erfassen. Um in dieser Analyse jedoch die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, ist es eminent wichtig, identische Bedingungen zu wählen. Unter den Kandidatengenomen befinden sich zahlreiche bekannte stressinduzierte Gene. Für die Aussagekraft der Analyse spricht weiterhin, dass unter den Kandidaten etliche LEA-Proteine zu finden sind.

4.2.1. Roggen

Dass bei den sensitiven Genotypen die funktionelle Kategorie LHC II stärker reprimiert wird, stützt die These, dass tolerante Genotypen eine höhere Photosynthesekapazität aufweisen. Hochsignifikant mit Frosttoleranz korreliert sind S-Adenosylmethionin Decarboxylasen (SAMDC), die bei der Synthese von Polyaminen involviert sind. Polyamine zeigen antioxidative Eigenschaften und stabilisieren Membranen und Zellwände unter Kältestress (Gill und Tuteja, 2010). Transformierte Pflanzen mit Biosynthesegenen für Polyamine (wie SAMDC) sind unter diversen abiotischen Stressbedingungen toleranter als der Wildtyp (Ji-Hong *et al.*, 2007). In der späteren Phase werden ebenfalls interessante Kandidaten zur Verbesserung der Frosttoleranz identifiziert: bspw. stehen *universal stress proteins* (USP) im Zusammenhang mit osmotischem Stress und reagieren auf diverse Umweltveränderungen (Walia *et al.*, 2005; Isokpehi *et al.*, 2011).

Aquaporine sind stressregulierte Wassertransporter (Tyerman *et al.*, 2002; Nogueira *et al.*, 2003; Aroca *et al.*, 2005) und werden in allen drei Spezies reprimiert, da extrazelluläres Wasser durch Eisbildung die Zelle stark dehydrieren kann (Peng *et al.*, 2008). Bei Roggen weisen jedoch die toleranten Linien eine weniger starke Suppression des Wassertransportes auf. Aquaporine sind für den passiven Zell-Zell Transport von Wassermolekülen verantwortlich. Bei Kälte wird die Wasseradsorption der Wurzeln schnell reduziert (*hydraulic water conductance*). Kältetolerante Spezies können während der Kälteakklimatisierung die Wasseradsorption erhöhen, um die osmotische Homöostase aufrechtzuerhalten (Fennell und Markhart, 1998). Dass tolerante Genotypen die Wasseradsorption während der Kälteakklimatisierung erhöhen, konnten bereits Aroca *et al.* (2001) bei *Zea mays* feststellen.

Eine weitere interessante Beobachtung ist, dass TIP-Aquaporine bei Roggen generell bis in Spätphase suprimiert bleiben. Die Aktivität der Aquaporine kann durch Phosphorylierung erhöht werden, um damit die verminderte Transkription während der Kälteakklimatisierung zu kompensieren. Wie wichtig die Regulation des aquaporinvermittelten Wassertransportes ist, konnten Herman *et al.* (2006) bei Weizen zeigen. Nach einer zusätzlich Unternullakklimatisierung wurde eine gesteigerte Frosttoleranz beobachtet. Der Grund hierfür war die Induzierung von PIP-Aquaporinen und des damit aktivierten Wassertransportes vom intrazellulären in den extrazellulären Raum und die Steigerung der Konzentration von löslichen Stoffen im Cytoplasma. Des Weiteren postulierten die Autoren aufgrund widersprüchlichen Aquaporin-Genexpressionen bei verschiedenen Arten, dass der Zell-Zell Wassertransport unterschiedliche Ausprägungen in verschiedenen Spezies hat. Darüber hinaus kann der Transport von toxischen Stoffen bei Salzstress (Ionen) durch den Abbruch des Transpirationsstroms und dem Schließen der Stomata reduziert werden (Veselov *et al.*, 2008). Bei osmotischem Stress konnte gezeigt werden, dass tolerante Gersteökotypen eine reduzierte Transpiration aufweisen (Vysotskaya *et al.*, 2010). Welche Rolle die Repression der Aquaporine bei der Ausbildung der Frosttoleranz bei Roggen spielt, müssen weitere Untersuchungen eruieren. Dass sich unter den nicht-signifikanten Korrelationen auch Kandidaten für Frosttoleranz befinden, zeigt z.B. die Induzierung von Cystatin. Phytocystatine sind Inhibitoren für Cysteinproteasen und spielen in vielen unterschiedlichen physiologischen Reaktionen eine Rolle, unter anderem auch zur Bewältigung von (a)biotischem Stress (Christova *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008).

4.2.2. Weizen

Bei Weizen wird eine signifikante Induktion von Tocopherolbiosynthese-Transkripten beobachtet. Sie zeigt gleichzeitig ein Charakteristikum für Weizen bei der Kälteakklimatisierung. Tocopherol (Vitamin E) wird in Pflanzen im Plastid unter Kältestress akkumuliert und soll den Photosyntheseapparat vor oxidativen Schäden schützen (Bergmüller *et al.*, 2003). Der Mechanismus liegt offenbar in der Vermeidung der Photoinhibition des PS II und im Schutz der Thylakoidmembranlipide vor Photooxidation durch ROS-Quenching (Havaux *et al.*, 2005). Einen noch bedeutsameren Mechanismus konnten Maeda *et al.* (2006) im Verlauf der Kälteakklimatisierung bei *Arabidopsis* Tocopherol-Nullmutanten *vte2* (*vitamin-E2*) feststellen. Die Mutante ist defizitär für die Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität in der Vitamin-E-Biosynthese und weist daher keine Tocopherole und deren Intermediate auf. Unter Kälteeinfluss zeigte sich dabei, dass Tocopherol, neben dem Schutz vor Lipidoxidation, eine entscheidende Rolle bei dem Export von Photoassimilaten einnimmt. Bei den Nullmutanten wurde eine Calloseablagerung bei Transferzellen des Phloems beobachtet. Die Mutanten weisen zudem einen verminderten Photoassimilatexport sowie eine vermehrte Akkumulation von löslichen Zuckern auf. Untersuchungen an RNAi-Linien von Mais und Kartoffel (*sdx1* bzw. *VTE-1*), die defizitär für die Tocopherol-Cyclase-Aktivität sind, bestätigen die Wechselwirkung vom Kohlenhydrat-Metabolismus und der Tocopherol-Biosynthese (Russin *et al.*, 1996; Hofius *et al.*, 2004). Daher ist es plausibel, dass die intensive Dissimilation des Weizens parallel mit einer verstärkten Synthese von Tocopherolen einhergeht.

SNF1-ähnliche Protein-Kinasen werden in Folge von diversen Stressbedingungen aktiviert und sind mit calciumabhängigen Protein-Kinasen (CDPK) verwandt. Sie verfügen über mediatorische Eigenschaften zwischen Signaltransduktion und Energie-

Metabolismus durch die Modulation von Genexpression und Enzymaktivität (Halford, 2005). Überexpression von SNF1-ähnlichen Proteinen hat eine verbesserte Toleranz gegenüber abiotischem Stress zur Folge (Mao *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). Eine differentielle Expression dieses Gens wird in Gerste nicht detektiert und könnte für die herausragende Toleranz von Roggen und Weizen gegenüber Frost mitverantwortlich sein. Transkripte, die im Zusammenhang mit der Ca^{2+} -Signaltransduktion stehen, sind insbesondere bei Weizen und Gerste differentiell exprimiert. Darüber hinaus ist bei der Separabilitätsanalyse die Kategorie „ Ca^{2+} -Signaltransduktion“ signifikant bei den positiv korrelierten Transkripten angereichert. Transkripte dieser Kategorie (Calmoduline, Calcineurin B-like, CDPK) werden u.a. bei abiotischem Stress reguliert und fungieren als Ca^{2+} -Sensoren (Luan *et al.*, 2002). Nach der Signalperzeption wird Ca^{2+} ins Cytosol ausgeschüttet (Knight *et al.*, 1996). Es bindet an Ca^{2+} -Sensoren, die daraufhin eine Konformationsänderung vollziehen und die Aktivität der Zielproteine durch Bindung beeinflussen. Die Zielproteine können Protein-Kinasen, metabolische Enzyme, Cytoskelett-assoziierte Proteine u.ä. sein, die zelluläre Mechanismen regulieren. Auch Transkriptionsfaktoren können entweder direkt oder indirekt durch Protein-Kinasen/Phosphatasen aktiviert werden. Wie bedeutsam Calmodulin für die Regulation der Kälteakklimatisierung ist, wurde bei CAMTA-Proteinen (*calmodulin binding transcription activator*) und in *Arabidopsis* gezeigt: Calmodulin interagiert mit CAMTA-Proteinen, die ihrerseits an *cis*-Elementen von CBF2-Promotoren binden und somit die Expression verändern können (Doherty *et al.*, 2009). Aufgrund ihrer Rolle in der Signaltransduktion von abiotischem Stress stellen Ca^{2+} -Sensoren wichtige Faktoren für die Beeinflussung der Frosttoleranz bei Pflanzen dar. Die unterschiedliche Genexpression verschiedener Ca^{2+} -Sensoren könnte ein wesentlicher Grund für abweichenden Akklimatisierungsmechanismen bei den untersuchten *Triticeae* sein. Die divergente Expression der Ca^{2+} -Sensoren kann darauf beruhen, dass sie in verschiedenen Geweben oder subzellulären Kompartimenten reguliert werden oder grundlegend auf andere Zielproteine ausgerichtet sind. Daher wäre es besonders interessant, die Ziele in den verschiedenen Arten mittels Yeast-Two-Hybrid-System zu identifizieren, wie es beispielsweise bei Halfter *et al.* (2000) beschrieben wurde.

4.2.3. Gerste

Positive korrelierte und induzierte Transkripte der Ubiquitylierung reichern sich in der Spätphase signifikant an ($P = 0.025$). Ubiquitylierung ist ein Prozess, bei dem Proteine für ihren Abbau durch das 26S Proteasom vorbereitet werden. Dabei wird Ubiquitin kovalent an das Protein gebunden und durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) und andere Faktoren (E2, E3) zu dem Proteasom geleitet. Dass etwa E3 Ubiquitin-Ligasen die Thermotoleranz von *Arabidopsis* beeinflussen, konnten Yan *et al.* (2003a) mit überexprimierenden Linien belegen. Der Nutzen der Ubiquitylierung unter abiotischen Bedingungen ist der Abbau von geschädigten Proteinen, die Regulation der Proteinabundanz (z.B. Transkriptionsfaktoren) sowie die N-Wiederverwertung (Belknap und Garbarino, 1996). Die Relevanz der Ubiquitylierung in der Regulation der Kälteakklimatisierung verdeutlicht *HOS1*, das eine E3-Ubiquitin-Ligase kodiert und einen negativen Regulator für die Kälteakklimatisierung darstellt (Ishitani *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2001). Die verlängerte Ubiquitylierungsphase bei den Gerstegenotypen ist möglicherweise ein weiterer Hinweis auf den erhöhten Stress der Gerste infolge der schlechteren Anpassungsmechanismen.

4.3. Variabilität der kälteinduzierten Genexpression

Eine Transkriptomanalyse mit neun Ökotypen von *Arabidopsis* bestätigte eine beträchtliche Variabilität in der Genexpression während der Kälteakklimatisierung (Hannah *et al.*, 2006). Vergleicht man die Analyse mit der vorliegenden Arbeit, werden ähnliche Muster zwischen *Arabidopsis* und den *Triticeae* erkennbar: So ist bspw. die Repression der Photosynthese konserviert. Zu einer konservierten Induktion kommt es beim Kohlenhydrat-Stoffwechsel, bei der Glykolyse, beim Sek. Metabolismus, beim Stress, bei der Redoxregulation, beim Polyamin-Metabolismus und beim Transport. Diese Übereinstimmungen verdeutlichen, dass die vorliegende Analyse wichtige Anpassungen des Metabolismus mit hoher Zuverlässigkeit erfassen kann. In der Anfangsphase der Akklimatisierung vollziehen sich gravierende Änderungen der Frosttoleranz (ausgedrückt als LT₅₀) (Fowler *et al.*, 1999). Dabei führt die frühe Anpassung des Metabolismus zu zwei verschiedenen Wirkungen: Zum einen muss die Pflanze ihre Frosttoleranz erhöhen, zum anderen aber auch das Wachstum und die Entwicklung bei ungünstigen Umweltbedingungen gewährleisten (Korn *et al.*, 2008). Deshalb kann es, in Bezug auf Frosttoleranz, schwierig sein, Ursache und Wirkung von Temperaturänderungen auf den Metabolismus auseinanderzuhalten und zu interpretieren.

Eine genotypabhängige Genregulation konnte bei diversen Arten nachgewiesen werden (Dunn *et al.*, 1994; Murelli *et al.*, 1995; Grossi *et al.*, 1998; Mastrangelo *et al.*, 2000; Baldi *et al.*, 2001; Ivashuta *et al.*, 2002; Rizza *et al.*, 2005; Pedron *et al.*, 2009; Hanslin und Hoglind, 2009). Wie aus Studien bei der Modellspezies *Arabidopsis* bekannt wurde, sind genotypische Effekte der Frosttoleranz stark ausgeprägt. Die wohl bekanntesten und intensiv untersuchtesten Regulatoren der Kälteakklimatisierung sind die AP2-Transkriptionsfaktoren CBF. Die CBF-Transkriptionsfaktoren (TF) induzieren COR-Gene (*cold-regulated*) und sind bei vielen verschiedenen Spezies (selbst in den sensitiven Spezies *Lycopersicon esculentum*, *Eucalyptus gunnii*, *Vitis vinifera*) konserviert. Die Regulons, die von den CBF's reguliert werden, können sich in Quantität und Qualität zwischen verschiedenen Arten unterscheiden (Zhang *et al.*, 2004). Eine genotypabhängige Expression wurde sowohl bei den CBF's (*HvCBF2*, *HvCBF9*, *HvCBF4*) von *Hv* cv. Dicktoo (fakultativer Wintertyp) als auch bei Morex (Sommertyp) nachgewiesen und ist abhängig von den Allelen *Fr-H1* (*VRN-H1*) und *Fr-H2* (Stockinger *et al.*, 2006, 2007; Campoli *et al.*, 2009). Deutliche Unterschiede in den Expressionsniveaus der CBF's konnte bei vergleichenden Expressionsanalysen von Roggen (Campoli *et al.*, 2009), Gerste (Stockinger *et al.*, 2007) und Weizen (Vágújfalvi *et al.*, 2005) nur zwischen den Winterformen, Sommerformen und den Spezies gefunden werden. Bei einer Expressionsstudie mit *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass bei mehreren Ökotypen zeitliche und quantitative Unterschiede in der Expression der CBF's vorkommen (McKhann *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009). Obwohl genetische Untersuchungen die wichtige Rolle von CBF's unterstreichen, konnte nur in wenigen Fällen eine Korrelation zwischen Frosttoleranz und Expression von CBF1/2 gefunden werden (Hannah *et al.*, 2006). Walia *et al.* (2005) zeigten, dass eine hohe Divergenz im Transkriptom innerhalb der *Poaceae* (Reis, Gerste, Weizen) durch Salzstress beobachtet werden kann. Bei einer Studie mit kältesensitiven Mutanten von *Arabidopsis* konnten Provart *et al.* (2003) typische „Expressionsphänotypen“ identifizieren, die aus temporalen und quantitativen Unterschieden bestehen. Die zuvor aufgeführten Punkte führen daher zu einer ähnlich stark genotypgeprägten kälteinduzierten Genexpression innerhalb bzw. zwischen den *Triticeae*. In den bisher publizierten Transkriptomanalysen (Tab. 4.1) diverser *Triticeae* wurden nur wenige Genotypen und Zeitpunkte untersucht,

so dass die gegenwärtige Analyse eine wertvolle Ressource für das kältere regulierte Transkriptom darstellt. Eine Transkriptomanalyse von Roggen wurde bisher in keiner öffentlich zugänglichen Datenbank hinterlegt.

Tabelle 4.1 – Veröffentlichte Transkriptomanalysen von *Triticeae* während der Kälteakklimatisierung bzw. Vernalisierung.

Spezies	Genotypen	Design	Autor
Hv	Luxor	Zeitverlauf	Janská et al. (2011)
Hv	Sonja	Kontrollen	Greenup et al. (2011)
Ta	Norstar, CI 14106 and PI181268	Zeitverlauf	Gaudet et al. (2011)
Ta	Paragon, Hamesk, Solstice	Kontrolle	Winfield et al. (2010)
Ta	Chinese Spring, CS(Tsp5A), CS(CH5A)	Zeitverlauf	Kocsy et al. (2010)
Hv	Morex	Zeitverlauf	Tommasini et al. (2008)
Hv	Dicktoo, Keunal	Kontrolle	Koo et al. (2008)
Hv	Bonus, <i>alb-e</i> ¹⁶ , <i>alb-f</i> ¹⁷ , <i>xan-s</i> ⁴⁶ , <i>xan-b</i> ¹²	Kontrolle	Svensson et al. (2006)
Ta	CDC Clair, Quantum	Zeitverlauf	Monroy et al. (2007)
Ta	Glenlea, Norstar	Zeitverlauf	Gulick et al. (2005)

Aus der genotypischen bzw. speziesspezifischen Analyse lassen sich jedoch folgende Aussagen bezüglich den *Triticeae* verallgemeinern: bereits nach einem Tag kommt es zu einer dynamischen Genregulation, die ihren Höhepunkt bei Tag 7 erreicht und die bei Tag 21 nachlässt. Ein ähnliches Bild manifestiert sich bei der speziesspezifischen Analyse: es handelt sich um eine konservierte Regulation, die ebenfalls bei *Arabidopsis* zu beobachten ist (Hannah et al., 2005). Auch die überschaubare Anzahl von Genen, die an allen Zeitpunkten in den *Triticeae* reguliert werden, sind zwischen *Arabidopsis* und *Triticeae* konserviert. Bei den *Triticeae* wird eine vergleichbare Anzahl von induzierten Genen reprimiert. Sie verdeutlicht damit die Wichtigkeit der Genrepression während der Kälteakklimatisierung.

Über die Anzahl kältere regulierter Gene gibt es unterschiedliche Schätzungen, die nach experimentellen Bedingungen und statistischer Analyse stark variieren können. In einer Meta-Transkriptomanalyse von *Arabidopsis* (Hannah et al., 2005) detektieren 45% der Mikroarrays-Targets eine differentielle Expression. Die hohe Anzahl von regulierten Genen verdeutlicht die komplexen Mechanismen der Kälteakklimatisierung. Ein Faktor für die Schwierigkeiten bei der Definition von kältere regulierten Genen konnten Bieniawska et al. (2008) in einer Meta-Transkriptomanalyse bei *Arabidopsis* identifizieren. Durchschnittlich 50% der differentiell exprimierten Gene unterschieden sich zwischen den Experimenten. Verantwortlich dafür waren in erster Linie tageszyklisch- und circadianregulierte Gene, die während einer eintägigen Kältephase dereguliert wurden. Möglicherweise sind die hohen Varianzen am Tag 1 bei der Hauptkomponentenanalyse in der vorliegenden Arbeit auch eine Folge der deregulierten Genexpression. Darüber hinaus stellten die Autoren fest, dass Kontrollen ohne Kältebehandlung diesen Prozess nicht korrigieren können. Deshalb stellt das Fehlen von Kontrollen in der vorliegenden Arbeit keinen größeren Nachteil in der Genauigkeit der Analysen dar. Eine stark abweichende Anzahl differentiell regulierter Gene ist zwischen den toleranten Arten Roggen und Weizen und der sensitiven Gerste bei Tag 21 zu beobachten. Ein möglicher Grund dafür sind die weniger effizient angepassten Akklimatisierungsmechanismen, die bei Gerste für eine langsamere metabolische Adaption verantwortlich sind. Die schnelle-

ren Reaktionen des Roggens und des Weizens verlängern die Akklimatisierungsphase, um auf extreme oder plötzlich auftretende Fröste rasch reagieren zu können (Fowler *et al.*, 1996; Fowler, 2008). Unterstützt wird diese These durch eine Beobachtung bei Weizen, bei dem eine signifikante Erhöhung der Frosttoleranz bereits nach sieben Tagen Kälteakklimatisierung auftritt (Kobayashi *et al.*, 2004).

4.4. Phytotronexperimente (Phänotypisierung)

Die Einführung von standardisierten Phytotronexperimenten war notwendig, da die vielen unterschiedlichen experimentellen Bedingungen zur Evaluierung der Frosttoleranz zu wenig vergleichbaren Ergebnissen führten (Sutka, 1981). Phytotronexperimente sollten es daher erlauben, unter einheitlichen und wiederholbaren Umweltbedingungen, klimatische Anpassungsreaktionen bei Pflanzen reproduzieren zu können. Die schlechte Differenzierbarkeit der Frosttoleranz unter Feldbedingungen war ein weiterer Grund, dass Phytotronexperimente mit spezifischen Unternulltemperaturen durchgeführt wurden (Gusta und Fowler, 1979). Phytotronexperimente erlaubten es erstmalig, präzise genetische Studien unter kontrollierten Bedingungen durchzuführen. Ein Nachteil von Phytotronexperimenten ist die Simplifizierung der simulierten klimatischen Bedingungen. Dass eine Pflanze eine Temperatursenkung innerhalb einer sehr kurzen Zeit von 20°C auf 4°C erfährt, kommt in der Natur eher selten vor.

Unter artifiziellen Bedingungen treten daher in den ersten 24-48 Stunden Dehydrierungssymptome auf, die u.U. nicht auf die Kälteakklimatisierung zurückzuführen sind (Trischuk *et al.*, 2006). Um diesen ungewollten Effekt abzumildern, wurde bei der Kälteakklimatisierung ein hydroponisches Medium verwendet. Auch die Tatsache, dass Pflanzen über einen präzisen Mechanismus zur Temperaturbeobachtung verfügen, macht es besonders notwendig, bei Expressionsstudien die Temperatur exakt zu kontrollieren. Dass bereits geringfügige Temperaturänderungen im physiologischen Optimum zu großen Expressionsänderungen führen, konnten Kumar und Wigge (2010) bei *Arabidopsis* zeigen.

Geeignete Phänotypisierungsmethoden der Frosttoleranz sind Messung des Elektrolytverlustes (*electrolyte leakage*) oder Fluoreszenzmessungen des Photosystems II. Diese Methoden wurden bereits 1975 für die Messung von Frostschäden bei Pflanzen eingeführt (Butler und Kitajima, 1975; Sutka, 1981; King *et al.*, 1982) und stellen etablierte und zuverlässige Techniken zur Quantifizierung von Frostschäden dar. Die Quantifizierung der Frosttoleranz durch Feldversuche, kontrollierte Frostsimulation und Fluoreszenzmessung wurde bei Francia *et al.* (2004) bei einer QTL-Analyse als vergleichbar angesehen.

Bei Phytotronexperimenten wird nach einer optimalen Kultivierungsphase (18-20°C) die Temperatur für die Kälteakklimatisierung auf 2-6°C gesenkt. Allgemein wird eine Temperatur unter 10°C als Schwellenwert für die Initialisierung der Kälteakklimatisierung angegeben (Olien, 1967; Alden und Hermann, 1971). In einer umfassenden Studie zu Induktionstemperaturen¹ bei *Triticeae* hat Fowler (2008) wichtige Eigenschaften der Kälteakklimatisierung untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass es eine hohe Variabilität von Induktionstemperaturen sowohl innerhalb einer Spezies als auch zwischen verschiedenen Spezies gibt. Beispielsweise liegt die Induktionstemperatur bei einer

¹ Induktionstemperatur ist hier definiert als wärmste Temperatur, bei der 50% (LT₅₀) der Population bei -3°C überleben.

Akklimatisierung bei 6°C und sieben Tagen von *Secale cereale cv. Puma* bei 19.6°C, die von *Hordeum vulgare cv. Kold* bei 12.5°C. Der Vorteil der höheren Induktionstemperaturen liegt dabei in der längeren Zeitperiode für die Vorbereitung für extreme Winter sowie in der besseren Ausgangsposition für plötzlich auftretende Fröste während der Vegetationsperiode. Aufgrund der hohen signifikanten Unterschiede zwischen den Induktionstemperaturen postuliert der Autor, dass die untersuchten Genotypen eine hohe Variabilität bei den Mechanismen zur Überwachung von Temperaturunterschieden besitzen.

Im Falle der Weizen- und Gerstegenotypen lagen Langzeiterfahrungen hinsichtlich der Frosttoleranz seitens der Forschungskooperationspartner vor, so dass hier eine Selektion von eingängig charakterisierten Genotypen vorgenommen werden konnte und durch artifizielle Frostsimulationen unter Phytotronbedingungen getestet wurde. Bei den Roggeninzuchtlinien wurde die Auslese aufgrund von Feldversuchen (Ural, Russland) durchgeführt, so dass eine begrenzte Erfahrung hinsichtlich der Frosttoleranz vorlag. Die Verteilung der Frosttoleranzen ist daher weniger dichotom. Die statistische Analyse der randomisierten Simulationen wurden mit Hilfe einer Varianzanalyse durchgeführt um Gruppenunterschiede zu verifizieren. Eine weitere zweifaktorielle ANOVA zeigte ebenfalls Unterschiede zwischen Genotypen und spezifischen Unternulltemperaturen. Die Frosttoleranz wurde nach einer zweiwöchigen Regenerationsphase anhand der Schädigung vom meristematischen Gewebe des Wurzelsprosses evaluiert. Die gewählten speziesspezifischen Tiefsttemperaturen für Weizen und Gerste lieferten eine zuverlässige Aufteilung der Genotypen. Frostsimulationen bei noch tieferen Temperaturen, die maximal bei akklimatisierten Roggen bis zu -34°C, bei Weizen bis zu -25°C und bei Gerste bis -19°C betragen, könnten optimierte Frosttoleranzwerte liefern. Eine weitere interessante Fragestellung wäre die Aufklärung, wie der Heterosiseffekt bei Hybridroggen die Stresstoleranz beeinflusst. Dass Heterosis die Genexpression beeinflusst (bis zu 10%) konnten Swanson-Wagner *et al.* (2006) mittels Transkriptomstudie bei *Zea mays* nachweisen. Die Roggenhybride zeigten auch bei den Frostsimulationen eine höhere Stresstoleranz als die hier verwendeten Inzuchtlinien (unveröffentlichte Daten). Die Inzuchtlinien selber bewältigen aber auch ohne Heterosis Temperaturen von -21°C, bei der letale Schäden bei Weizen und Gerste eintreten würden.. Auch technisch wären Tiefsttemperaturen von -34°C in einem Phytotron nur schwer umzusetzen.

4.5. Evaluierung der Datenqualität mittels qRT-PCR

Der Vergleich zwischen beiden technischen Plattformen zeigt gute Korrelationen zwischen Array- und qRT-PCR-Expressionswerten und bestätigt die Detektion differentieller Genexpression auch bei Verwendung von heterologen Sonden. Die cDNA-Proben der Makroarrays können hinsichtlich Klonidentität und chimären Sequenzen fehlerhaft sein (Halgren *et al.*, 2001). Bei der Resequenzierung konnten bei 2 von 15 cDNA-Proben solche Unstimmigkeiten nachgewiesen werden. Um die Klonidentität von cDNA-Bibliotheken zu überprüfen, wurden bei der Herstellung des Makroarrays Proben aus den Bibliotheken resequenziert. Die Beobachtung, dass Arrays im Vergleich zur qRT-PCR den FC-Wert oft unterschätzen, wurde von Yuen *et al.* (2002) publiziert. Die Autoren empfehlen deshalb eine Art Kalibrierung der Arraydaten durchzuführen, um die Genauigkeit der Berechnung von FC-Werten zu erhöhen. Den Grund für die Überschätzung nicht-induzierter Transkripte sehen die Verfasser in unspezifischen Hybridisierungen und in

der Sättigung des Signals. Diese Gründe haben dazu beitragen, dass nur wenige signifikante Korrelationen berechnet werden konnten. Gleichwohl zeigen die Ergebnisse bei Gerste hohe Korrelationskoeffizienten und machen deutlich, dass eine Transkriptomanalyse ein probates Mittel für die Identifizierung von Kandidatengenomen darstellt. Dass einige Gene zu widersprüchlichen Ergebnissen zwischen beiden technischen Plattformen führen, ist ein weithin bekanntes Problem. Die Gründe sind vielfältig und resultieren aus spezifischen, methodischen Defiziten der Plattformen (Morey *et al.*, 2006). Neben technischen Ursachen sind auch die Normalisierungsstrategien zwischen Makroarrays und qRT-PCR unterschiedlich und können daher zu abweichenden Ergebnissen führen.

4.6. Bemerkungen zur Datenanalyse

Die vorliegende Studie wurde während einer Phase geplant und durchgeführt, bei der technische Neuentwicklungen in der funktionellen Genomik noch nicht verfügbar waren. Oligonukleotid-Mikroarrays für Weizen oder Roggen waren zu dieser Zeit ebenfalls nicht erhältlich. Aus heutiger Sicht ist die direkte RNA-Sequenzierung (Wang *et al.*, 2009) die Methode der Wahl, um quantitative Transkriptomvergleiche zwischen Spezies zu realisieren. Vorteile der RNA-Sequenzierung gegenüber hybridisierungsbasierten Methoden sind:

- Verzicht auf Hybridisierungen
- keine vorherigen Kenntnisse der Genomsequenz
- komplette Genomabdeckung des Transkriptoms
- Identifizierung und Quantifizierung seltener Transkripte
- zusätzliche Informationen über Spleißvarianten und Sequenzvariationen (Metzker, 2010).

Die hohe Sequenzidentität der *Triticeae* erlaubt es, heterologe Hybridisierungssysteme zu nutzen. Beispielsweise unterschreitet die Sequenzkonservierung zwischen Weizen und Gerste selten 85% (Mayer *et al.*, 2009). Bei einem Vergleich von Hybridisierungsergebnissen mit RNA von *Solanum tuberosum* (Kartoffel) und *Lycopersicon esculentum* (Tomate) mit einem Kartoffel cDNA-Makroarray konnten Korrelationskoeffizienten von $r = 0.88$ bzw. $r = 0.89$ berechnet werden (Bar-Or *et al.*, 2006). Aufgrund der längeren (Vollängen)-cDNAs wirken sich kleinere interspezifische Unterschiede weniger stark auf die Analyse aus als bei Oligo-Mikroarrays (Renn *et al.*, 2004; Bar-Or *et al.*, 2007). Um etwaige Sequenzunterschiede zu kompensieren, sind die Hybridisierungsbedingungen weniger stringent gewählt worden. Kocsy *et al.* (2010) konnten mit identischen Hybridisierungsparametern zuverlässig stressinduzierte Transkripte in Weizen durch einen Gerste cDNA-Makroarray identifizieren. Die weniger stringenten Hybridisierungsbedingungen haben den Effekt, die Effizienz der Hybridisierung mit heterologen Sonden zu erhöhen. Sie erleichtern damit auch die Detektion reprimierter Gene. Einer Reduzierung der Signalintensitäten, die oft bei CSH (*cross-species hybridisation*) auftreten, wird entgegengewirkt: die Signalintensitäten der heterologen Hybridisierung sind vergleichbar mit denen der homologen Experimente. Eine zunehmende Detektion von Signalintensitäten oberhalb der Sättigungsgrenze konnte bei den heterologen Hybridisierungen nicht beobachtet werden.

4.6.1. Detektion differentieller Genexpression

Die Gegenüberstellung der $\text{Signal}/\text{Hintergrund}$ Verhältnisse zeigt nur in den unteren Signalbereichen abweichende Hybridisierungseigenschaften bei den heterologen Hybridisierungen. Die Ursache ist sowohl eine verstärkte Kreuzhybridisierung, als auch unspezifische Hybridisierungen aufgrund der verringerten Hybridisierungsstringenz. Diese Signale wurden durch ein Filterkriterium ($\text{Signal}/\text{Hintergrund} > 2$) aus der Analyse ausgeschlossen. Bei den heterologen Hybridisierungen konnte eine ähnliche Anzahl von Transkripten detektiert werden, die den Qualitätsmerkmalen entsprach. Ein weiteres Filterkriterium ist die Begrenzung der Anzahl auf 2000 differentiell exprimierte Gene, die als Grundlage für die genotypische Analyse dienen. Bei der speziesspezifischen Analyse sind nur jene Gene als kältereguliert definiert, die bei mindestens drei Genotypen eine differentielle Expression aufweisen. Die hohen Konkordanzkoeffizienten bei Tag 0 verdeutlichen die hohe Korrelation der nicht-akklimatisierten Transkriptome zwischen den Spezies. Der FC (meistens 1,8 - 3,0) wurde als einfache *ad hoc* Methode zur Feststellung differentieller Expression genutzt und diente als erstes Kriterium für die Detektion differentiell regulierter Gene in Mikroarray-Experimenten (Schena *et al.*, 1995, 1996). Aus statistischen Gründen dominieren falsch-positive Fehler in den Genlisten. In einer Studie von Lee *et al.* (2000) konnte die Zahl der falsch klassifizierten Gene durch Replikation von maximal 9% auf 0,7% gesenkt werden. Tendenziell werden bei der Detektion regulierter Gene durch das FC-Kriterium schwächer exprimierte bzw. weniger hochabundante Gene selektiert (Mutch *et al.*, 2002). Bei einem Vergleich von elf Selektionsmethoden zeigten Genlisten, die mittels dem FC-Kriterium ermittelt worden sind, die größten Übereinstimmungen mit jenen, die durch Rangprodukte und BGA (*Between Group Analysis*) erstellt worden sind (Jeffery *et al.*, 2006).

Generell können Hybridisierungsartefakte bei heterologen Hybridisierungen vorkommen und sich unterschiedlich auswirken. Wegen fehlender Sequenzkonservierung könnten Transkripte nicht detektiert werden oder es kommt zu einer Reduzierung bei der Anzahl von differentiell exprimierten Genen (Bar-Or *et al.*, 2006). Als weiteres Problem gelten Kreuzhybridisierungen, die von Mitgliedern hochkonservierter Genfamilien begünstigt werden. Der Vorteil von cDNA-Makroarrays bezüglich Kreuzhybridisierungen ist, dass die längeren Sonden eine höhere Spezifität erreichen (Kane *et al.*, 2000). Ein weiterer kritischer Punkt bei der Detektion einer differentiellen Genexpression besteht bei sogenannten Sequenzdeletionen (*gaps*), die die Hybridisierungseffizienz reduzieren können. Durch die zufällige Anlagerung der Primer-Nonamere während der cDNA-Markierungsreaktion (*random priming*) werden jedoch von der selben cDNA unterschiedliche Sonden synthetisiert. Zu beachten bleibt, dass bei einer geschätzten Genomgröße von 38.000-48.000 Genen bei Gerste (Mayer *et al.*, 2009) und dem 12.000 Uni-genen umfassenden Makroarray kalteinduzierte Genregulationen nicht erfasst werden können.

4.6.2. Normalisierung und funktionelle Annotation

Die Gründe für die Notwendigkeit einer Normalisierung sind bspw. verschiedene RNA-Quantitäten, Varianz beim Spotting, Unterschiede bei der Markierungsreaktion sowie unspezifische Hybridisierungen. Die hier verwendete Quantilnormalisierung kann im Gegensatz zu Skalierungsmethoden (Medianzentrierung) die Varianz zwischen den Arrays reduzieren (Abs. 3.3.1) (Bolstad *et al.*, 2003). Die Datensätze wurden separat nach

Spezies normalisiert, um mögliche Artefakte der heterologen Hybridisierungen nicht auf andere Teildatensätze zu übertragen. Die hierarchische Clusteranalyse mit allen 12.086 Genen resultierte in weitgehend homogenen Gruppen von Zeitpunkten bei allen Spezies. Dies zeigt, dass auch die heterologen Hybridisierungen konsistente Datensätze liefern und aussagekräftige Interpretationen zulassen. Die wenigen heterogenen Cluster können auf verschiedene Akklimatisierungsraten bzw. Entwicklungsvorgänge in den Genotypen zurückgeführt werden (Fowler und Limin, 2004).

Um biologische Fragestellungen mittels Transkriptomanalysen interpretieren zu können, ist es hilfreich, Gene im biologischen Zusammenhang zu analysieren. So kann eine funktionelle Redundanz von Genen besser interpretiert werden. Die MapMan-Ontologie ist für *Arabidopsis* annotiert worden. Sie ist hierarchisch aufgebaut, d.h. die 34 funktionellen Kategorien besitzen spezifischere Unterkategorien. Für alle drei Arten wurde dasselbe Annotationsmodell genutzt, um eine Vergleichbarkeit herstellen zu können. Die für die Annotation genutzten Contigs stammen aus der HarvEST-Datenbank (Close *et al.*, 2007) und umfassen etwa 500.000 EST-Sequenzen für Gerste. Die Verteilung der funktionellen Kategorien ähnelt der für *Arabidopsis* (Urbanczyk-Wochniak *et al.*, 2006). Rund 600 cDNA-Klone wurden in mehr als eine Kategorie eingeteilt. Gründe hierfür können chimäre cDNA-Klone oder multifunktionale Proteine sein. Überdurchschnittlich viele Sequenzen wurden in die Kategorie „Unbekannt“ eingeteilt. Gründe hierfür liegen in den stringenten Annotationsparametern von „Mercator“ und in der Tatsache, dass die Annotation auf der dikotylen Spezies *Arabidopsis* basiert. Sato *et al.* (2009) analysierten 5006 Vollängen-cDNAs und identifizierten etwa 11% als gerstespezifisch. Bei einer funktionellen Annotation des selben Makroarrays konnten ebenfalls mehr als 5000 Gene keiner Kategorie zugeordnet werden (Sreenivasulu *et al.*, 2006).

4.7. Ausblick

Die Resultate stellen einen relevanten Beitrag für ein besseres Verständnis der Kälteakklimatisierung verschiedener *Triticeae*-Spezies dar. Zum einen repräsentieren die Ergebnisse einen Consens von Genen, der für die Kälteakklimatisierung funktionell von Bedeutung ist. Zum anderen können aus den vorliegenden Daten funktionelle Marker für Frosttoleranz entwickelt werden. Mit der Entwicklung der neueren RNA-Seq Technologie können die Resultate auf der Gesamtebene des Transkriptoms noch gezielter untersucht werden. Es wäre interessant, die Fragestellung dieser Arbeit dahingehend zu erweitern, inwiefern die Analyse verschiedener Gewebearten genauere Informationen über die Rolle orthologer Gene aufzeigt. Mit Hinsicht auf mögliche klimatischen Veränderungen, z.B. durch die Erderwärmung werden neue Eigenschaften von Kulturpflanzen benötigt. Mittels transgener Ansätze können die hier identifizierten Kandidatengene in sensitivere Arten transformiert werden, um Linien zu erzeugen, die gegen klimatische Einflüsse besser gewappnet sind. So stehen Vernalisierung und biotischer Stress im Fokus der zukünftigen Erforschung der Kälteakklimatisierung. Ein wichtiger Aspekt wird auch der Prozess der Deakklimatisierung sein, bei der die Pflanze ihre Frosttoleranz durch plötzlich auftretende Wärmeperioden im Winter verlieren können.

Literaturverzeichnis

- Abdrakhamanova A, Wang QY, Khokhlova L, und Nick P** (2003). Is microtubule disassembly a trigger for cold acclimation? *Plant Cell Physiol.*, 44:676–686.
- Agarwal M, Hao Y, Kapoor A, Dong CH, Fujii H, Zheng X, und Zhu JK** (2006). A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. *J. Biol. Chem.*, 281(49):37636–37645.
- Alden J und Hermann RK** (1971). Aspects of the cold hardiness mechanism in plants. *Bot. Rev.*, 37(1):37–142.
- Aloni R und Griffith M** (1991). Functional xylem anatomy in root-shoot junctions of six cereal species. *Planta*, 184:123–129.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, und Lipman DJ** (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215(3):403–410.
- Andrews C, Pomeroy M, und Seaman W** (1986). The response of fall-sown cereals to winter stresses in eastern Ontario. *Can. J. Plant Sci.*, 66(1):25–37.
- Arenas-Huertero F, Arroyo A, Zhou L, Sheen J, und Leon P** (2000). Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes Dev.*, 14(16):2085–2096.
- Aroca R, Amodeo G, Fernández-Illescas S, Herman EM, Chaumont F, und Chrispeels MJ** (2005). The role of aquaporins and membrane damage in chilling and hydrogen peroxide induced changes in the hydraulic conductance of maize roots. *Plant Physiol.*, 137(1):341–353.
- Aroca R, Irigoyen JJ, und Sanchez-Daz M** (2001). Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against oxidative stress during chilling and subsequent recovery in two maize varieties differing in chilling sensitivity. *Plant Sci.*, 161(4):719–726.
- Badawi M, Danyluk J, Boucho B, Houde M, und Sarhan F** (2007). The CBF gene family in hexaploid wheat and its relationship to the phylogenetic complexity of cereal CBFs. *Mol. Genet. Genomics*, 277(5):533–554.
- Badr A, Müller K, Schäfer-Pregel R, Rabey H, Effgen S, Ibrahim H, Pozzi C, Rhode W, und Salamini F** (2000). On the origin and domestication history of barley (*Hordeum vulgare*). *Mol. Biol. Evol.*, 17(4):499–510.
- Bae H, Herman E, Bailey B, Bae H, und Sicher R** (2005). Exogenous trehalose alters Arabidopsis transcripts involved in cell wall modification, abiotic stress, nitrogen metabolism, and plant defense. *Physiol. Plant.*, 125(1):114–126.
- Baga M, Chodaparambil SV, Limin AE, Pecar M, Fowler DB, und Chibbar RN** (2007). Identification of quantitative trait loci and associated candidate genes for low-temperature tolerance in cold-hardy winter wheat. *Funct. Integr. Genomics*, 7(1):53–68.
- Baldi P, Valè G, Mazzucotelli E, Govoni C, Faccioli P, Michele Stanca A, und Cattivelli L** (2001). The transcripts of several components of the protein synthesis machinery

- are cold-regulated in a chloroplast-dependent manner in barley and wheat. *J. Plant Physiol.*, 158(12):1541–1546.
- Bar-Or C, Bar-Eyal M, Gal TZ, Kapulnik Y, Czosnek H, und Koltai H** (2006). Derivation of species-specific hybridization-like knowledge out of cross-species hybridization results. *BMC Genomics*, 7:110.
- Bar-Or C, Czosnek H, und Koltai H** (2007). Cross-species microarray hybridizations: a developing tool for studying species diversity. *Trends Genet.*, 23(4):200–207.
- Becker H** (2011). *Pflanzenzüchtung*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Belknap WR und Garbarino JE** (1996). The role of ubiquitin in plant senescence and stress responses. *Trends Plant Sci.*, 1(10):331–335.
- Benjamini Y und Hochberg Y** (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol*, 57(1):300, 289.
- Bergmüller E, Porfirova S, und Dörmann P** (2003). Characterization of an Arabidopsis mutant deficient in gamma-tocopherol methyltransferase. *Plant Mol. Biol.*, 52(6):1181–1190.
- Bieniawska Z, Espinoza C, Schlereth A, Sulpice R, Hinch DK, und Hannah MA** (2008). Disruption of the Arabidopsis circadian clock is responsible for extensive variation in the cold-responsive transcriptome. *Plant Physiol.*, 147:263–279.
- Bolstad B, Irizarry R, Astrand M, und Speed T** (2003). A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, 19:185–193.
- Borovskii GB, Stupnikova IV, Antipina AI, Vladimirova SV, und Voinikov VK** (2002). Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment. *BMC Plant Biol.*, 2:5.
- Bridger G, Yang W, Falk D, und McKersie B** (1994). Cold acclimation increases tolerance of activated oxygen in winter cereals. *J. Plant Physiol.*, 144:235–240.
- Butler WL und Kitajima M** (1975). Fluorescence quenching in photosystem II of chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 376(1):116–125.
- Campoli C, Matus-Cadiz MA, Pozniak CJ, Cattivelli L, und Fowler DB** (2009). Comparative expression of Cbf genes in the Triticeae under different acclimation induction temperatures. *Mol. Genet. Genomics*, 282(2):141–152.
- Chen W und Li P** (2002). Attenuation of reactive oxygen production during chilling in ABA-treated maize cultured cells. In: *Plant Cold Hardiness*. Kluwer Academic Publishers.
- Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee B, Hong X, Agarwal M, und Zhu J** (2003). ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. *Genes Dev.*, 17:1043–1054.
- Chinnusamy V, Zhu J, und Sunkar R** (2010). Gene regulation during cold stress acclimation in plants. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 639:39–55.
- Chinnusamy V, Zhu J, und Zhu J** (2007). Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci.*, 12:444–451.
- Choi CS und Sano H** (2007). Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. *Mol Genet Genomics*, 277(5):589–600.

- Choi D, Rodriguez EM, und Close TJ** (2002). Barley Cbf3 gene identification, expression pattern, and map location. *Plant Physiol.*, 129:1781–1787.
- Christova PK, Christov NK, und Imai R** (2006). A cold inducible multidomain cystatin from winter wheat inhibits growth of the snow mold fungus, *Microdochium nivale*. *Planta*, 223:1207–1218.
- Church GM und Gilbert W** (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 81(7):1991–1995.
- Close TJ, Kortt AA, und Chandler PM** (1989). A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant Mol. Biol.*, 13(1):95–108.
- Close TJ, Wanamaker S, Roose ML, und Lyon M** (2007). HarvEST. *Methods Mol. Biol.*, 406:161–178.
- Cockram J, Chiapparino E, Taylor SA, Stamati K, Donini P, Laurie DA, und O’Sullivan DM** (2007). Haplotype analysis of vernalization loci in european barley germplasm reveals novel VRN-H1 alleles and a predominant winter VRN-H1/VRN-H2 multi-locus haplotype. *Theor. Appl. Genet.*, 115(7):993–1001.
- Cosgrove DJ** (1997). Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell*, 9(7):1031–1041.
- Cosgrove DJ** (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 407(6802):321–326.
- Danyluk, Perron, Houde, Limin, Fowler, Benhamou, und Sarhan** (1998). Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell*, 10:623–638.
- Danyluk J, Houde M, Rassart E, und Sarhan F** (1994). Differential expression of a gene encoding an acidic dehydrin in chilling sensitive and freezing tolerant Gramineae species. *FEBS Letters*, 344(1):20–24.
- De Palma M, Grillo S, Massarelli I, Costa A, Balogh G, Vigh L, und Leone A** (2008). Regulation of desaturase gene expression, changes in membrane lipid composition and freezing tolerance in potato plants. *Mol. Breed.*, 21:15–26.
- Dennis ES und Peacock WJ** (2007). Epigenetic regulation of flowering. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 10:520–527.
- Dhillon T, Pearce SP, Stockinger EJ, Distelfeld A, Li C, Knox AK, Vashegyi I, Vágújfalvi A, Galiba G, und Dubcovsky J** (2010). Regulation of freezing tolerance and flowering in temperate cereals: the VRN-1 connection. *Plant Physiol.*, 153(4):1846–1858.
- Diamond J** (2010). *Arm und Reich*. Fischer Taschenbuch Verlag.
- Distelfeld A, Li C, und Dubcovsky J** (2009). Regulation of flowering in temperate cereals. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 12:178–184.
- Doherty CJ, Buskirk HAV, Myers SJ, und Thomashow MF** (2009). Roles for Arabidopsis CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance. *Plant Cell*, 21(3):972–84.
- Dong C, Agarwal M, Zhang Y, Xie Q, und Zhu J** (2006a). The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103:8281–8286.

- Dong CH, Hu X, Tang W, Zheng X, Kim YS, ha Lee B, und Zhu JK** (2006b). A putative Arabidopsis nucleoporin, AtNUP160, is critical for RNA export and required for plant tolerance to cold stress. *Mol. Cell. Biol.*, 26(24):9533–9543.
- Doyle J und Doyle J** (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 19:11–15.
- Dubcovsky J, Chen C, und Yan L** (2005). Molecular characterization of the allelic variation at the VRN-H2 vernalization locus in barley. *Mol. Breed.*, 15(4):395–407.
- Dunn MA, Goddard NJ, Zhang L, Pearce RS, und Hughes MA** (1994). Low-temperature-responsive barley genes have different control mechanisms. *Plant Mol. Biol.*, 24:879–888.
- Dvorak J und Fowler DB** (1978). Cold hardiness potential of Triticale and tetraploid rye. *Crop Sci*, 18(3):477–478.
- Edner C, Li J, Albrecht T, Mahlow S, Hejazi M, Hussain H, Kaplan F, Guy C, Smith SM, Steup M, und Ritte G** (2007). Glucan, water dikinase activity stimulates breakdown of starch granules by plastidial beta-amylases. *Plant Physiol.*, 145(1):17–28.
- Ensminger I, Busch F, und Huner NPA** (2006). Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis. *Physiol. Plant.*, 126:28–44.
- Farquhar GD, Caemmerer S, und Berry JA** (1980). A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta*, 149:78–90.
- Fennell A und Markhart AH** (1998). Rapid acclimation of root hydraulic conductivity to low temperature. *J. Exp. Bot.*, 49(322):879–884.
- Feuillet C, Langridge P, und Waugh R** (2008). Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends Genet.*, 24(1):24–32.
- Flodd RG und Halloran GM** (1984). The nature and duration of gene action for vernalization response in wheat. *Ann Bot (Lond)*, 53(3):363–368.
- Fowler D, Dvorak J, und Gusta L** (1977). Comparative cold hardiness of several Triticum species and Secale cereale L. *Crop Sci*, 17:941–943.
- Fowler D, Limin A, und Ritchie J** (1999). Low temperature tolerance in cereals: Model and genetic interpretation. *Crop Sci*, 39(3):626–633.
- Fowler DB** (2008). Cold acclimation threshold induction temperatures in cereals. *Crop Sci*, 48:1147–1154.
- Fowler DB und Carles RJ** (1979). Growth, development, and cold tolerance of fall-acclimated cereal grains. *Crop Sci*, 19:915–922.
- Fowler DB, Chauvin LP, Limin AE, und Sarhan F** (1996). The regulatory role of vernalization in the expression of low-temperature-induced genes in wheat and rye. *Theor. Appl. Genet.*, 93(4):554–559.
- Fowler DB und Limin AE** (2004). Interactions among factors regulating phenological development and acclimation rate determine low-temperature tolerance in wheat. *Ann Bot*, 94(5):717–724.
- Fowler S und Thomashow MF** (2002). Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell*, 14:1675–1690.
- Francia E, Barabaschi D, Tondelli A, Laido G, Rizza F, Stanca AM, Busconi M, Fogher C, Stockinger EJ, und Pecchioni N** (2007). Fine mapping of a HvCBF gene cluster at the frost resistance locus Fr-H2 in barley. *Theor. Appl. Genet.*, 115(8):1083–1091.

- Francia E, Rizza F, Cattivelli L, Stanca AM, Galiba G, Toth B, Hayes PM, Skinner JS, und Pecchioni N** (2004). Two loci on chromosome 5H determine low-temperature tolerance in a 'Nure' (winter) x 'Tremois' (spring) barley map. *Theor. Appl. Genet.*, 108(4):670–680.
- Fricano A, Rizza F, Faccioli P, Pagani D, Pavan P, Stella A, Rossini L, Piffanelli P, und Cattivelli L** (2009). Genetic variants of HvCbf14 are statistically associated with frost tolerance in a European germplasm collection of *Hordeum vulgare*. *Theor. Appl. Genet.*, 119:1335–1348.
- Fu D, Szűcs P, Yan L, Helguera M, Skinner JS, von Zitzewitz J, Hayes PM, und Dubcovsky J** (2005). Large deletions within the first intron in VRN-1 are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Mol. Genet. Genomics*, 273(1):54–65.
- Galiba G, Kerepesi I, Vágújfalvi A, Kocsy G, Cattivelli L, Dubcovsky J, Snape JW, und Sutka J** (2001). Mapping of genes involved in glutathione, carbohydrate and COR14b cold induced protein accumulation during cold hardening in wheat. *Euphytica*, 119(1):173–177.
- Galiba G, Quarrie SA, Sutka J, Morgounov A, und Snape JW** (1995). RFLP mapping of the vernalization (Vrn1) and frost resistance (Fr1) genes on chromosome 5A of wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 90:1174–1179.
- Galiba G, Vágújfalvi A, Li C, Soltész A, und Dubcovsky J** (2009). Regulatory genes involved in the determination of frost tolerance in temperate cereals. *Plant Sci.*, 176(1):12–19.
- Ganeshan S, Vitamvas P, Fowler DB, und Chibbar RN** (2008). Quantitative expression analysis of selected COR genes reveals their differential expression in leaf and crown tissues of wheat (*Triticum aestivum* L.) during an extended low temperature acclimation regimen. *J. Exp. Bot.*, 59(9):2393–2402.
- Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores JM, Garcíarrubio A, und Covarrubias AA** (2000). Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J. Biol. Chem.*, 275(8):5668–5674.
- Gaudet DA, Wang Y, Frick M, Puchalski B, Penniket C, Ouellet T, Robert L, Singh J, und Laroche A** (2011). Low temperature induced defence gene expression in winter wheat in relation to resistance to snow moulds and other wheat diseases. *Plant Sci.*, 180(1):99–110.
- Geilfus C, Zörb C, und Mühling KH** (2010). Salt stress differentially affects growth-mediating beta-expansins in resistant and sensitive maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiol. Biochem.*, 48(12):993–998.
- Gentleman R** (2005). *Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor*. Springer.
- Gibson SI** (2000). Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. *Plant Physiol.*, 124(4):1532–1539.
- Gill SS und Tuteja N** (2010). Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signal Behav*, 5(1):26–33.
- Gonzali S, Loreti E, Solfanelli C, Novi G, Alpi A, und Perata P** (2006). Identification of sugar-modulated genes and evidence for in vivo sugar sensing in *Arabidopsis*. *J. Plant Res.*, 119(2):115–123.

- Griffith M, Huner NPA, Espelie KE, und Kolattukudy PE** (1985). Lipid polymers accumulate in the epidermis and mesophyll cell walls during low temperature development of winter rye leaves. *Protoplasma*, 125(1-2):53–64.
- Griffith M, Lumb C, Wiseman SB, Wisniewski M, Johnson RW, und Marangoni AG** (2005). Antifreeze proteins modify the freezing process in plants. *Plant Physiol.*, 138(1):330–340.
- Griffith M und Yaish MWF** (2004). Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends Plant Sci.*, 9(8):399–405.
- Grossi M, Giorni E, Rizza F, Stanca AM, und Cattivelli L** (1998). Wild and cultivated barleys show differences in the expression pattern of a cold-regulated gene family under different light and temperature conditions. *Plant Mol. Biol.*, 38(6):1061–1069.
- Gulick PJ, Drouin S, Yu Z, Danyluk J, Poisson G, Monroy AF, und Sarhan F** (2005). Transcriptome comparison of winter and spring wheat responding to low temperature. *Genome*, 48(5):913–923.
- Guo P, Baum M, Grando S, Ceccarelli S, Bai G, Li R, von Korff M, Varshney RK, Graner A, und Valkoun J** (2009). Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. *J. Exp. Bot.*, 60(12):3531–3544.
- Gusta L und Fowler DB** (1979). Cold resistance and injury in winter cereals. In *Stress Physiology in Crop Plants*, Seiten 159–178. John Wiley and Sons.
- Haake V, Cook D, Riechmann JL, Pineda O, Thomashow MF, und Zhang JZ** (2002). Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 130(2):639–648.
- Halford NG** (2005). Regulation of carbon and amino acid metabolism: Roles of sucrose nonfermenting-1-related protein kinase-1 and general control nonderepressible-2-related protein kinase. In *Incorporating Advances in Plant Pathology*, Advances in Botanical Research, Seiten 93–142. Academic Press.
- Halfter U, Ishitani M, und Zhu JK** (2000). The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97(7):3735–3740.
- Halgren RG, Fielden MR, Fong CJ, und Zacharewski TR** (2001). Assessment of clone identity and sequence fidelity for 1189 IMAGE cDNA clones. *Nucleic Acids Res.*, 29(2):582–588.
- Hannah M, Wiese D, Freund S, Fiehn O, Heyer A, und Hinch D** (2006). Natural genetic variation of freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 142:98–112.
- Hannah MA, Heyer AG, und Hinch DK** (2005). A global survey of gene regulation during cold acclimation in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genetics*, 1:e26.
- Hanslin H und Hoglind M** (2009). Differences in winter-hardening between phenotypes of *Lolium perenne* with contrasting water-soluble carbohydrate concentrations. *Grass and Forage Science*, 64:187–195.
- Haseneyer G, Schmutzer T, Seidel M, Zhou R, Mascher M, Schon CC, Taudien S, Scholz U, Stein N, Mayer K, und Bauer E** (2011). From RNA-seq to large-scale genotyping - genomics resources for rye (*Secale cereale* L.). *BMC Plant Biol.*, 11(1):131.
- Havaux M, Eymery F, Porfirova S, Rey P, und Dörmann P** (2005). Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, 17(12):3451–3469.

- Herman EM, Rotter K, Premakumar R, Elwinger G, Bae H, Bae R, Ehler-King L, Chen S, und Livingston DP** (2006). Additional freeze hardiness in wheat acquired by exposure to -3 C is associated with extensive physiological, morphological, and molecular changes. *J. Exp. Bot.*, 57:3601–3618.
- Heun M, Schäfer-Pregl R, Klawan D, Castagna R, Accerbi M, Borghi B, und Salamini F** (1997). Site of Einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. *Science*, 278(5341):1312–1314.
- Hiilovaara-Teijo, Hannukkala, Griffith, Yu, und Pihakaski-Maunsbach** (1999). Snow-mold-induced apoplastic proteins in winter rye leaves lack antifreeze activity. *Plant Physiol.*, 121(2):665–674.
- Hofius D, Hajirezaei MR, Geiger M, Tschiersch H, Melzer M, und Sonnewald U** (2004). RNAi-mediated tocopherol deficiency impairs photoassimilate export in transgenic potato plants. *Plant Physiol.*, 135(3):1256–1268.
- Hommo L und Pulli S** (1993). Winterhardiness of some winter wheat (*Triticum aestivum*), rye (*Secale cereale*), triticale (*Triticosecale*) and winter barley (*Hordeum vulgare*) cultivars tested at 6 locations in Finland. *Agricultural Science in Finland*, 2(4):311–327.
- Hon WC, Griffith M, Mlynarz A, Kwok YC, und Yang DS** (1995). Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol.*, 109:879–889.
- Houde M, Dallaire S, N'Dong D, und Sarhan F** (2004). Overexpression of the acidic dehydrin wcor410 improves freezing tolerance in transgenic strawberry leaves. *Plant Biotechnol. J.*, 2(5):381–387.
- Hundertmark M und Hinch DK** (2008). LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 9:118.
- Huner N, Oquist G, und Melis A** (2003). *Photostasis in plants, green algae and cyanobacteria: the role of light harvesting antenna complexes*. Kluwer Academic Publishers. In: *Advances in Photosynthesis and Respiration Light Harvesting Antennas in Photosynthesis*.
- Huner NPA, Oquist G, und Sarhan F** (1998). Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends Plant Sci.*, 3(6):224 – 230.
- Hurry V, Strand A, Furbank R, und Stitt M** (2000). The role of inorganic phosphate in the development of freezing tolerance and the acclimatization of photosynthesis to low temperature is revealed by the pho mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 24(3):383–396.
- Iordachescu M und Imai R** (2008). Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses. *J Integr Plant Biol*, 50(10):1223–1229.
- Iseli C, Jongeneel CV, und Bucher P** (1999). ESTScan: a program for detecting, evaluating, and reconstructing potential coding regions in EST sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, Seiten 138–148.
- Ishitani M, Xiong L, Lee H, Stevenson B, und Zhu JK** (1998). HOS1, a genetic locus involved in cold-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10:1151–1161.
- Ismail AM, Hall AE, und Close TJ** (1999a). Allelic variation of a dehydrin gene cosegregates with chilling tolerance during seedling emergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96(23):13566–13570.
- Ismail AM, Hall AE, und Close TJ** (1999b). Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergence of cowpea. *Plant Physiol.*, 120(1):237–244.

- Isokpehi RD, Simmons SS, Cohly HH, Ekunwe SI, Begonia GB, und Ayensu WK** (2011). Identification of drought-responsive universal stress proteins in Viridiplantae. 5:41–58.
- Ivanov AG, Sane PV, Zeinalov Y, Malmberg G, Gardeström P, Huner NP, und Oquist G** (2001). Photosynthetic electron transport adjustments in overwintering Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Planta*, 213(4):575–585.
- Ivashuta S, Naumkina M, Gau M, Uchiyama K, Isobe S, Mizukami Y, und Shimamoto Y** (2002). Genotype-dependent transcriptional activation of novel repetitive elements during cold acclimation of alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant J.*, 31:615–627.
- Jaglo KR, Kleff S, Amundsen KL, Zhang X, Haake V, Zhang JZ, Deits T, und Thomashow MF** (2001). Components of the Arabidopsis C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant Physiol.*, 127:910–7.
- Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, Schabenberger O, und Thomashow MF** (1998). Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science*, 280:104–106.
- Jamalainien EA** (1974). Resistance in winter cereals and grasses to low temperature parasitic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 12(1):281–302.
- Janská A, Aprile A, Zámečník J, Cattivelli L, und Ovesná J** (2011). Transcriptional responses of winter barley to cold indicate nucleosome remodelling as a specific feature of crown tissues. *Funct Integr Genomics*, 11(2):307–325.
- Janská A, Marsík P, Zelenková S, und Ovesná J** (2010). Cold stress and acclimation - what is important for metabolic adjustment? *Plant Biol (Stuttg)*, 12(3):395–405.
- Jeffery IB, Higgins DG, und Culhane AC** (2006). Comparison and evaluation of methods for generating differentially expressed gene lists from microarray data. *BMC Bioinformatics*, 7:359.
- Ji-Hong LIU, Hiroyasu K, Jing W, Yusuke BAN, und Takaya M** (2007). Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant biotechnology*, 24(1):117–126.
- Kane MD, Jatko TA, Stumpf CR, Lu J, Thomas JD, und Madore SJ** (2000). Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. *Nucleic Acids Res.*, 28(22):4552–4557.
- Kang J, Choi H, Im M, und Kim S** (2002). Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 14(2):343–357.
- Kaplan F und Guy CL** (2004). beta-amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiol.*, 135(3):1674–1684.
- Kaplan F und Guy CL** (2005). RNA interference of Arabidopsis beta-Amylase prevents maltose accumulation upon cold shock and increases sensitivity of PSII photochemical efficiency to freezing stress. *Plant J.*, 44(5):730–743.
- Kaplan F, Sung DY, und Guy CL** (2006). Roles of beta-amylase and starch breakdown during temperatures stress. *Physiol. Plant.*, 126(1):120–128.
- Karsai I, Mészáros K, Láng L, Hayes PM, und Bedő Z** (2001). Multivariate analysis of traits determining adaptation in cultivated barley. *Plant Breed.*, 120(3):217–222.
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, und Shinozaki K** (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat. Biotechnol.*, 17:287–291.

- Kempa S, Rozhon W, Samaj J, Erban A, Baluska F, Becker T, Haselmayer J, Schleiff E, Kopka J, Hirt H, und Jonak C** (2007). A plastid-localized glycogen synthase kinase 3 modulates stress tolerance and carbohydrate metabolism. *Plant J.*, 49(6):1076–1090.
- King AI, Reid MS, und Patterson BD** (1982). Diurnal changes in the chilling sensitivity of seedlings. *Plant Physiol.*, 70(1):211–214.
- Knight H, Trewavas AJ, und Knight MR** (1996). Cold calcium signaling in Arabidopsis involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell*, 8(3):489–503.
- Knight MR** (2002). Signal transduction leading to low-temperature tolerance in Arabidopsis thaliana. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, 357:871–875.
- Knight MR, Campbell AK, Smith SM, und Trewavas AJ** (1991). Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature*, 352(6335):524–526.
- Kobayashi F, Takumi S, Nakata M, Ohno R, Nakamura T, und Nakamura C** (2004). Comparative study of the expression profiles of the Cor/Lea gene family in two wheat cultivars with contrasting levels of freezing tolerance. *Physiol. Plant.*, 120(4):585–594.
- Koch K** (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7:235–246.
- Kocsy G, Athmer B, Perovic D, Himmelbach A, Szűcs A, Vashegyi I, Schweizer P, Galiba G, und Stein N** (2010). Regulation of gene expression by chromosome 5a during cold hardening in wheat. *Mol Genet Genomics*, 283(4):351–363.
- Korn M, Peterek S, Mock H, Heyer AG, und Hinch DK** (2008). Heterosis in the freezing tolerance, and sugar and flavonoid contents of crosses between Arabidopsis thaliana accessions of widely varying freezing tolerance. *Plant Cell Environ*, 31:813–827.
- Kovacs D, Kalmar E, Torok Z, und Tompa P** (2008). Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins. *Plant Physiol.*, 147(1):381–390.
- Kumar SV und Wigge PA** (2010). H2A.Z-Containing nucleosomes mediate the thermosensory response in Arabidopsis. *Cell*, 140:136–147.
- Kurimoto K, Day DA, Lambers H, und Noguchi K** (2004). Effect of respiratory homeostasis on plant growth in cultivars of wheat and rice. *Plant Cell Environ*, 27(7):853–862.
- Lee B, Henderson DA, und Zhu J** (2005). The Arabidopsis cold responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *Plant Cell*, 17(11):3155–3175.
- Lee B, Lee H, Xiong L, und Zhu JK** (2002). A mitochondrial complex I defect impairs cold-regulated nuclear gene expression. *Plant Cell*, 14(6):1235–1251.
- Lee H, Xiong L, Gong Z, Ishitani M, Stevenson B, und Zhu JK** (2001). The Arabidopsis HOS1 gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleo–cytoplasmic partitioning. *Genes Dev.*, 15:912–924.
- Lee ML, Kuo FC, Whitmore GA, und Sklar J** (2000). Importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97(18):9834–9839.
- Lee YP, Fleming AJ, Körner C, und Meins F** (2009). Differential expression of the CBF pathway and cell cycle-related genes in Arabidopsis accessions in response to chronic low-temperature exposure. *Plant Biol (Stuttg)*, 11:273–283.

- Lelley T, Feuillet C, Dolezel J, Bartos J, Paux E, Kofler R, Havrankova M, Kopecky D, Suchánková P, Safar J, Simkova H, und Town CD** (2008). A first survey of the rye (*Secale cereale*) genome composition through BAC end sequencing of the short arm of chromosome 1R. *BMC Plant Biol.*, 8:95.
- Lemtiri-Chlieh F, MacRobbie EAC, Webb AAR, Manison NE, Brownlee C, Skepper JN, Chen J, Prestwich GD, und Brearley CA** (2003). Inositol hexakisphosphate mobilizes an endomembrane store of calcium in guard cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100(17):10091–10095.
- Leonardos ED, Savitch LV, Huner NPA, Oquist G, und Grodzinski B** (2003). Daily photosynthetic and C-export patterns in winter wheat leaves during cold stress and acclimation. *Physiol. Plant.*, 117(4):521–531.
- Levitt J** (1980). *Responses of plants to environmental stresses. Volume II. Water, radiation, salt, and other stresses.* Academic Press.
- Li F, Xing S, Guo Q, Zhao M, Zhang J, Gao Q, Wang G, und Wang W** (2011). Drought tolerance through over-expression of the expansin gene TaEXPB23 in transgenic tobacco. *J. Plant Physiol.*, 168(9):960–966.
- Limin AE und Fowler DB** (2002). Developmental traits affecting low-temperature tolerance response in near-isogenic lines for the vernalization locus *Vrn-A1* in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Ann Bot.*, 89:579–585.
- Limin AE und Fowler DB** (2006). Low-temperature tolerance and genetic potential in wheat (*Triticum aestivum* L.): response to photoperiod, vernalization, and plant development. *Planta*, 224:360–366.
- Lin LI** (1989). A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics*, 45:255–268.
- Livingston DP, Premakumar R, und Tallury SP** (2006). Carbohydrate partitioning between upper and lower regions of the crown in oat and rye during cold acclimation and freezing. *Cryobiology*, 52(2):200–208.
- Llorente F, Oliveros JC, Martínez-Zapater JM, und Salinas J** (2000). A freezing-sensitive mutant of *Arabidopsis*, *frs1*, is a new *aba3* allele. *Planta*, 211(5):648–655.
- Lloyd JR, Kossmann J, und Ritte G** (2005). Leaf starch degradation comes out of the shadows. *Trends Plant Sci.*, 10(3):130–137.
- Luan S, Kudla J, Rodriguez-Concepcion M, Yalovsky S, und Grisse W** (2002). Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell*, 14:389–400.
- Maeda H, Song W, Sage TL, und DellaPenna D** (2006). Tocopherols play a crucial role in low temperature adaptation and phloem loading in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 18(10):2710–2732.
- Mao X, Zhang H, Tian S, Chang X, und Jing R** (2010). TaSnRK2.4, an SNF1-type serine/threonine protein kinase of wheat (*Triticum aestivum* L.), confers enhanced multistress tolerance in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.*, 61(3):683–696.
- Mastrangelo A, Baldi P, Mare C, Terzi V, Galiba G, Cattivelli L, und Fonzo ND** (2000). The cold dependent accumulation of COR TMC-AP3 in cereals with contrasting, frost tolerance is regulated by different mRNA expression and protein turnover. *Plant Sci.*, 156:47–54.

- Mastrangelo AM, Belloni S, Barilli S, Ruperti B, Fonzo ND, Stanca AM, und Cattivelli L** (2005). Low temperature promotes intron retention in two e-cor genes of durum wheat. *Planta*, 221:705–715.
- Mayer KFX, Taudien S, Martis M, Simková H, Suchánková P, Gundlach H, Wicker T, Petzold A, Felder M, Steuernagel B, Scholz U, Graner A, Platzer M, Dolezel J, und Stein N** (2009). Gene content and virtual gene order of barley chromosome 1H. *Plant Physiol.*, 151(2):496–505.
- McKhann HI, Gery C, Bérard A, Lévêque S, Zuther E, Hinch DK, Mita SD, Brunel D, und Téoulé E** (2008). Natural variation in CBF gene sequence, gene expression and freezing tolerance in the Versailles core collection of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.*, 8:105.
- Medina J, Bargues M, Terol J, Perez-Alonso M, und Salinas J** (1999). The *Arabidopsis* CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiol.*, 119(2):463–470.
- Mészáros K, Karsai I, Kuti C, Banyai J, Láng L, und Bedő Z** (2007). Efficiency of different marker systems for genotype fingerprinting and for genetic diversity studies in barley (*Hordeum vulgare* L.). *S. Afr. J. Bot.*, 73:43–48.
- Metzker ML** (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Rev. Genet.*, 11(1):31–46.
- Miller AK, Galiba G, und Dubcovsky J** (2006). A cluster of 11 CBF transcription factors is located at the frost tolerance locus Fr-Am2 in *Triticum monococcum*. *Mol. Genet. Genomics*, 275:193–203.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, und Breusegem FV** (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.*, 9(10):490–498.
- Miura K, Jin JB, Lee J, Yoo CY, Stirm V, Miura T, Ashworth EN, Bressan RA, Yun D, und Hasegawa PM** (2007). SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19:1403–1414.
- Mogk A, Schlieker C, Friedrich KL, Schönfeld HJ, Vierling E, und Bukau B** (2003). Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. *J. Biol. Chem.*, 278(33):31033–31042.
- Monroy AF, Dryanova A, Malette B, Oren DH, Ridha Farajalla M, Liu W, Danyluk J, Ubayasena LWC, Kane K, Scoles GJ, Sarhan F, und Gulick PJ** (2007). Regulatory gene candidates and gene expression analysis of cold acclimation in winter and spring wheat. *Plant Mol. Biol.*, 64(4):409–423.
- Morey JS, Ryan JC, und Dolah FM** (2006). Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced Online*, 8(1):175–193.
- Mouillon JM, Gustafsson P, und Harryson P** (2006). Structural investigation of disordered stress proteins. Comparison of full-length dehydrins with isolated peptides of their conserved segments. *Plant Physiol.*, 141(2):638–650.
- Murata N und Los D** (2006). Histidine kinase Hik33 is an important participant in cold-signal transduction in cyanobacteria. *Physiol. Plant.*, 126:17–27.
- Murata N und Los DA** (1997). Membrane fluidity and temperature perception. *Plant Physiol.*, 115(3):875–879.

- Murelli C, Rizza F, Albini F, Dulio A, Terzi V, und Cattivelli L** (1995). Metabolic changes associated with cold-acclimation in contrasting cultivars of barley. *Physiol. Plant.*, 94(1):87–93.
- Mutch D, Berger A, Mansourian R, Rytz A, und Roberts M** (2002). The limit fold change model: A practical approach for selecting differentially expressed genes from microarray data. *BMC Bioinformatics*, 3(1):17.
- Nishizawa A, Yabuta Y, und Shigeoka S** (2008). Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol.*, 147(3):1251–1263.
- Nogueira FT, De Rosa VE, Menossi M, Ulian EC, und Arruda P** (2003). RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. *Plant Physiol.*, 132(4):1811–1824.
- Nordin K, Vahala T, und Palva ET** (1993). Differential expression of two related, low-temperature-induced genes in *Arabidopsis thaliana* (L.). *Plant Mol. Biol.*, 21:641–653.
- Novillo F, Alonso JM, Ecker JR, und Salinas J** (2004). CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101:3985–3990.
- Novillo F, Medina J, und Salinas J** (2007). *Arabidopsis* CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104:21002–21007.
- Oh S, Song SI, Kim YS, Jang H, Kim SY, Kim M, Kim Y, Nahm BH, und Kim J** (2005). *Arabidopsis* CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiol.*, 138(1):341–351.
- Olien CR** (1967). Freezing stresses and survival. *Annu Rev Plant Physiol*, 18(1):387–408.
- Oquist G, Hurry VM, und Huner N** (1993). Low-Temperature effects on photosynthesis and correlation with freezing tolerance in spring and winter cultivars of wheat and rye. *Plant Physiol.*, 101:245–250.
- Orvar BL, Sangwan V, Omann F, und Dhindsa RS** (2000). Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J.*, 23(6):785–794.
- Parry MAJ, Keys AJ, Madgwick PJ, Carmo-Silva AE, und Andralojc PJ** (2008). Rubisco regulation: a role for inhibitors. *J. Exp. Bot.*, 59(7):1569–1580.
- Patterson FL, Shaner GE, Ohm HW, und Foster JE** (1990). A historical perspective for the establishment of research goals for wheat improvement. *Journal of Production Agriculture*, 3(1):30–38.
- Pearce, Houlston, Atherton, Rixon, Harrison, Hughes, und M AD** (1998). Localization of expression of three cold-induced genes, *blt101*, *blt4. 9*, and *blt14*, in different tissues of the crown and developing leaves of cold-acclimated cultivated barley. *Plant Physiol.*, 117:787–795.
- Pearce R** (2001). Plant freezing and damage. *Ann Bot*, 87:417–424.
- Pearce RS** (1999). Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant Growth Regul.*, 29:47–76.
- Pearce RS und Fuller MP** (2001). Freezing of barley studied by infrared video thermography. *Plant Physiol.*, 125:227–240.
- Pedron L, Baldi P, Hietala AM, und Porta NL** (2009). Genotype-specific regulation of cold-responsive genes in cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *Gene*, 437:45–53.

- Pellny TK, Ghannoum O, Conroy JP, Schluempmann H, Smeekens S, Andralojc J, Krause KP, Goddijn O, und Paul MJ (2004). Genetic modification of photosynthesis with *E. coli* genes for trehalose synthesis. *Plant Biotechnol. J.*, 2(1):71–82.
- Peng Y, Arora R, Li G, Wang X, und Fessehaie A (2008). Rhododendron catawbiense plasma membrane intrinsic proteins are aquaporins, and their over-expression compromises constitutive freezing tolerance and cold acclimation ability of transgenic Arabidopsis plants. *Plant Cell Environ*, 31(9):1275–1289.
- Poree F, Fernie AR, Stitt M, Usadel B, Nagel A, Steinhäuser D, Gibon Y, Bläsing OE, Redestig H, Sreenivasulu N, Krall L, und Hannah MA (2006). PageMan: an interactive ontology tool to generate, display, and annotate overview graphs for profiling experiments. *BMC Bioinformatics*, 7:535.
- Prasad TK, Anderson MD, Martin BA, und Stewart CR (1994). Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell*, 6(1):65–74.
- Provart NJ, Gil P, Chen W, Han B, Chang H, Wang X, und Zhu T (2003). Gene expression phenotypes of Arabidopsis associated with sensitivity to low temperatures. *Plant Physiol.*, 132(2):893–906.
- Puhakainen T, Hess MW, Mäkelä P, Svensson J, Heino P, und Palva ET (2004). Over-expression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.*, 54(5):743–753.
- Qin D, Wu H, Peng H, Yao Y, Ni Z, Li Z, Zhou C, und Sun Q (2008). Heat stress-responsive transcriptome analysis in heat susceptible and tolerant wheat (*Triticum aestivum* L.) by using wheat genome array. *BMC Genomics*, 9:432.
- R Development Core Team (2011). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rekarte-Cowie I, Ebshish OS, Mohamed KS, und Pearce RS (2008). Sucrose helps regulate cold acclimation of Arabidopsis thaliana. *J. Exp. Bot.*, 59(15):4205–4217.
- Renaut J, Hausman J, und Wisniewski M (2006). Proteomics and low-temperature studies: bridging the gap between gene expression and metabolism. *Physiol. Plant.*, 126:97–109.
- Renn S, Aubin-Horth N, und Hofmann H (2004). Biologically meaningful expression profiling across species using heterologous hybridization to a cDNA microarray. *BMC Genomics*, 5.
- Reyes JL, Rodrigo M, Colmenero-Flores JM, Gil J, Garay-Arroyo A, Campos F, Salami F, Bartels D, und Covarrubias AA (2005). Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant Cell Environ*, 28(6):709–718.
- Ritte G, Heydenreich M, Mahlow S, Haebel S, Kotting O, und Steup M (2006). Phosphorylation of C6- and C3-positions of glucosyl residues in starch is catalysed by distinct dikinases. *FEBS Letters*, 580(20):4872–4876.
- Rizza F, Cattivelli L, und Pagani D (2005). Photosynthetic acclimation to cold hardening in barley genotypes contrasting for frost tolerance. *Acta Physiol. Plant.*, 27:84–84.
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, und Sheen J (2006). Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57(1):675–709.

- Russin WA, Evert RF, Vanderveer PJ, Sharkey TD, und Briggs SP** (1996). Modification of a specific class of plasmodesmata and loss of sucrose export ability in the sucrose export defective1 maize mutant. *Plant Cell*, 8(4):645–658.
- Sage RF** (2002). Variation in the kcat of Rubisco in C3 and C4 plants and some implications for photosynthetic performance at high and low temperature. *J. Exp. Bot.*, 53(369):609–620.
- Sambrook J und Russel D** (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sato K, Shin-I T, Seki M, Shinozaki K, Yoshida H, Takeda K, Yamazaki Y, Conte M, und Kohara Y** (2009). Development of 5006 full-length cDNAs in barley: a tool for accessing cereal genomics resources. *DNA Research*, 16(2):81–89.
- Savitch LV, Leonardos ED, Krol M, Jansson S, Grodzinski B, Huner NPA, und Oquist G** (2002). Two different strategies for light utilization in photosynthesis in relation to growth and cold acclimation. *Plant Cell Environ*, 25(6):761–771.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, und Brown PO** (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270(5235):467–470.
- Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, und Davis RW** (1996). Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93(20):10614–10619.
- Sheen J** (1996). Ca²⁺-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science*, 274(5294):1900–1902.
- Sherman JD, Yan L, Talbert L, und Dubcovsky J** (2004). A PCR marker for growth habit in common wheat based on allelic variation at the VRN-A1 gene. *Crop Sci*, 44:1832–1838.
- Siddiqui KS und Cavicchioli R** (2006). Cold-adapted enzymes. *Annu. Rev. Biochem.*, 75(1):403–433.
- Siminovitch D, Wilson CM, und Briggs DR** (1953). Studies on the chemistry of the living bark of the Black Locust in relation to its frost hardiness. V. Seasonal transformations and variations in the carbohydrates: Starch-Sucrose interconversions. *Plant Physiol.*, 28(3):383–400.
- Skinner JS, von Zitzewitz J, Szűcs P, Marquez-Cedillo L, Filichkin T, Amundsen K, Stockinger EJ, Thomashow ME, Chen THH, und Hayes PM** (2005a). Structural, functional, and phylogenetic characterization of a large CBF gene family in barley. *Plant Mol. Biol.*, 59(4):533–551.
- Skinner JS, Zitzewitz Jv, Szűcs P, Dubcovsky J, Yan L, Francia E, Pecchioni N, Casas A, Chen THH, und Hayes PM** (2005b). Molecular and structural characterization of barley vernalization genes. *Plant Mol. Biol.*, 59(3):449–467.
- Snape JW, Semikhodskii A, Fish L, Sarma RN, Quarrie S, Galiba G, und Sutka J** (1997). Mapping frost tolerance loci in wheat and comparative mapping with other cereals. *Acta Agronomica Hungarica*, Seiten 265–270.
- Sreenivasulu N, Radchuk V, Strickert M, Miersch O, Weschke W, und Wobus U** (2006). Gene expression patterns reveal tissue-specific signaling networks controlling programmed cell death and ABA-regulated maturation in developing barley seeds. *Plant J.*, 47:310–327.

- Steinhäuser D, Scheible W, Gibon Y, Morcuende R, Weicht D, Meyer S, Stitt M, Usadel B, Nagel A, Thimm O, Redestig H, Bläsing OE, Palacios-Rojas N, Selbig J, Hannemann J, und Piques MC** (2005). Extension of the visualization tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of coresponding genes, and comparison with known responses. *Plant Physiol.*, 138(3):1195–1204.
- Steponkus PL** (1984). Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annu Rev Plant Physiol*, 35(1):543–584.
- Steponkus PL, Uemura M, Balsamo RA, Arvinte T, und Lynch DV** (1988). Transformation of the cryobehavior of rye protoplasts by modification of the plasma membrane lipid composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85(23):9026–9030.
- Stitt M und Hurry V** (2002). A plant for all seasons: alterations in photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in Arabidopsis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5:199–206.
- Stockinger E, Cheng H, und Skinner J** (2006). *Structural organization of barley CBF genes coincident with QTLs for cold hardiness. In Cold Hardiness in Plants: Molecular Genetics, Cell Biology and Physiology.* CABI Publishing, Oxford.
- Stockinger EJ, Gilmour SJ, und Thomashow MF** (1997). Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94:1035–1040.
- Stockinger EJ, Mao Y, Regier MK, Triezenberg SJ, und Thomashow MF** (2001). Transcriptional adaptor and histone acetyltransferase proteins in Arabidopsis and their interactions with CBF1, a transcriptional activator involved in cold-regulated gene expression. *Nucleic Acids Res.*, 29(7):1524–1533.
- Stockinger EJ, Skinner JS, Gardner KG, Francia E, und Pecchioni N** (2007). Expression levels of barley Cbf genes at the frost resistance-H2 locus are dependent upon alleles at Fr-H1 and Fr-H2. *Plant J.*, 51:308–321.
- Stout DG, Majak W, und Reaney M** (1980). In vivo detection of membrane injury at freezing temperatures. *Plant Physiol.*, 66(1):74–77.
- Strand A, Hurry V, Henkes S, Huner N, Gustafsson P, Gardeström P, und Stitt M** (1999). Acclimation of Arabidopsis leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin Cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway. *Plant Physiol.*, 119(4):1387–1398.
- Stressmann M, Kitao S, Griffith M, Moresoli C, Bravo LA, und Marangoni AG** (2004). Calcium interacts with antifreeze proteins and chitinase from cold acclimated winter rye. *Plant Physiol.*, 135(1):364–376.
- Sung DY, Vierling E, und Guy CL** (2001). Comprehensive expression profile analysis of the Arabidopsis Hsp70 gene family. *Plant Physiol.*, 126(2):789–800.
- Sutka J** (1981). Genetic studies of frost resistance in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 59:145–152.
- Sutka J, Galiba G, Vágújfalvi A, Gill BS, und Snape JW** (1999). Physical mapping of the Vrn-A1 and Fr1 genes on chromosome 5A of wheat using deletion lines. *Theor. Appl. Genet.*, 99:199–202.
- Sutka J und Snape JW** (1989). Location of a gene for frost resistance on chromosome 5A of wheat. *Euphytica*, 42:41–44.
- Suzuki R und Shimodaira H** (2006). Pvclust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics*, 22(12):1540–1542.

- Swanson-Wagner RA, Jia Y, DeCook R, Borsuk LA, Nettleton D, und Schnable PS** (2006). All possible modes of gene action are observed in a global comparison of gene expression in a maize F1 hybrid and its inbred parents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103(18):6805–6810.
- Takahashi R, Joshee N, und Kitagawa Y** (1994). Induction of chilling resistance by water stress, and cDNA sequence analysis and expression of water stress-regulated genes in rice. *Plant Mol. Biol.*, 26(1):339–352.
- Takahashi R und Yasuda S** (1971). Genetics of earliness and growth habit in barley. Proceedings of Second International Barley Genetics Symposium, Seiten 388–408. Washington State University Press, Pullman, Washington.
- Tanino KK und McKersie BD** (1985). Injury within the crown of winter wheat seedlings after freezing and icing stress. *Can. J. Bot.*, 63(3):432–436.
- Teige M, Scheikl E, Eulgem T, Dóczi R, Ichimura K, Shinozaki K, Dangl JL, und Hirt H** (2004). The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. *Mol. Cell*, 15(1):141–152.
- Thimm O, Bläsing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Krueger P, Selbig J, Müller LA, Rhee SY, und Stitt M** (2004). MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J.*, 37(6):914–939.
- Thomashow MF, Gilmour SJ, Stockinger EJ, Jaglo-Ottosen KR, und Zarka DG** (2001). Role of the Arabidopsis CBF transcriptional activators in cold acclimation. *Physiol. Plant.*, 112:171–175.
- Tischner T, Koszegi B, und Veisz O** (1997). Climatic programmes used in the Martonvasar phytotron most frequently in recent years. *Acta Agronomica Hungarica*, 45:85–104.
- Tommasini L, Svensson JT, Rodriguez EM, Wahid A, Malatrasi M, Kato K, Wanamaker S, Resnik J, und Close TJ** (2008). Dehydrin gene expression provides an indicator of low temperature and drought stress: Transcriptome-based analysis of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Funct. Integr. Genomics*, 8:387–405.
- Tondelli A, Francia E, Barabaschi D, Aprile A, Skinner JS, Stockinger EJ, Stanca AM, und Pecchioni N** (2006). Mapping regulatory genes as candidates for cold and drought stress tolerance in barley. *Theor. Appl. Genet.*, 112:445–454.
- Trevaskis B, Hemming MN, Dennis ES, und Peacock WJ** (2007). The molecular basis of vernalization-induced flowering in cereals. *Trends Plant Sci.*, 12:352–357.
- Trevaskis B, Hemming MN, Peacock WJ, und Dennis ES** (2006). HvVRN2 responds to daylength, whereas HvVRN1 is regulated by vernalization and developmental status. *Plant Physiol.*, 140:1397–1405.
- Trischuk R, Schilling B, Wisniewski M, und Gusta L** (2006). Freezing stress: Systems biology to study cold tolerance. In *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*, Seiten 131–155. Springer.
- Tronsmo AM** (1993). Resistance to winter stress factors in half sib families of *Dactylis glomerata*, tested in a controlled environment. *Acta agriculturae Scandinavica*, 43(2):89.
- Tsankov AM, Brown CR, Yu MC, Win MZ, Silver PA, und Casolari JM** (2006). Communication between levels of transcriptional control improves robustness and adaptivity. *Mol. Syst. Biol.*, 2:65.
- Tyerman SD, Niemietz CM, und Bramley H** (2002). Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Environ.*, 25(2):173–194.

- Uemura M und Steponkus PL** (2003). Modification of the intracellular sugar content alters the incidence of freeze-induced membrane lesions of protoplasts isolated from *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Cell Environ*, 26(7):1083–1096.
- Uemura M, Tominaga Y, Nakagawara C, Shigematsu S, Minami A, und Kawamura Y** (2006). Responses of the plasma membrane to low temperatures. *Physiol. Plant.*, 126:81–89.
- Urbanczyk-Wochniak E, Usadel B, Thimm O, Nunes-Nesi A, Carrari F, Davy M, Bläsing O, Kowalczyk M, Weicht D, Polinceusz A, Meyer S, Stitt M, und Fernie AR** (2006). Conversion of MapMan to allow the analysis of transcript data from solanaceous species: effects of genetic and environmental alterations in energy metabolism in the leaf. *Plant Mol. Biol.*, 60:773–792.
- Usadel B, Poree F, Nagel A, Lohse M, Czedik-Eysenberg A, und Stitt M** (2009). A guide to using MAPMAN to visualize and compare omics data in plants: a case study in the crop species, maize. *Plant Cell Environ*.
- Vágújfalvi A, Aprile A, Miller A, Dubcovsky J, Delugu G, Galiba G, und Cattivelli L** (2005). The expression of several Cbf genes at the Fr-A2 locus is linked to frost resistance in wheat. *Mol. Genet. Genomics*, 274(5):506–514.
- Vágújfalvi A, Galiba G, Cattivelli L, und Dubcovsky J** (2003). The cold-regulated transcriptional activator Cbf3 is linked to the frost-tolerance locus Fr-A2 on wheat chromosome 5A. *Mol. Genet. Genomics*, 269(1):60–67.
- van der Laan MJ und Pollard KS** (2003). A new algorithm for hybrid hierarchical clustering with visualization and the bootstrap. *J Stat Plan Inference*, 117:275–303.
- Vandesompele J, Preter KD, Pattyn F, Poppe B, Roy NV, Paepe AD, und Speleman F** (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, 3(7):research0034.1–research0034.11.
- Vaultier MN, Cantrel C, Vergnolle C, Justin AM, Demandre C, Benhassaine-Kesri G, Çiçek D, Zachowski A, und Ruelland E** (2006). Desaturase mutants reveal that membrane rigidification acts as a cold perception mechanism upstream of the diacylglycerol kinase pathway in *Arabidopsis* cells. *FEBS Lett.*, 580(17):4218–4223.
- Vergnolle C, Vaultier MN, Taconnat L, Renou JP, Kader JC, Zachowski A, und Ruelland E** (2005). The cold-induced early activation of phospholipase C and D pathways determines the response of two distinct clusters of genes in *Arabidopsis* cell suspensions. *Plant Physiol.*, 139(3):1217–1233.
- Veselov DS, Sharipova GV, Veselov SU, und Kudoyarova GR** (2008). The effects of NaCl treatment on water relations, growth, and ABA content in barley cultivars differing in drought tolerance. *J. Plant Growth Regul.*, 27(4):380–386.
- Vogel JT, Zarka DG, Buskirk HAV, Fowler SG, und Thomashow MF** (2005). Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *Plant J.*, 41:195–211.
- von Zitzewitz J, Szűcs P, Dubcovsky J, Yan L, Francia E, Pecchioni N, Casas A, Chen THH, Hayes PM, und Skinner JS** (2005). Molecular and structural characterization of barley vernalization genes. *Plant Mol. Biol.*, 59:449–467.
- Vysotskaya L, Hedley PE, Sharipova G, Veselov D, Kudoyarova G, Morris J, und Jones HG** (2010). Effect of salinity on water relations of wild barley plants differing in salt tolerance. *AoB Plants*, 2010(2010):1–8.

- Walia H, Wilson C, Condamine P, Liu X, Ismail AM, Zeng L, Wanamaker SI, Mandal J, Xu J, Cui X, und Close TJ** (2005). Comparative transcriptional profiling of two contrasting rice genotypes under salinity stress during the vegetative growth stage. *Plant Physiol.*, 139(2):822–835.
- Wang L, Zhao CM, Wang YJ, und Liu J** (2005). Overexpression of chloroplast-localized small molecular heat-shock protein enhances chilling tolerance in tomato plant. *Molecular Plant*, 31(2):167–174.
- Wang Z, Gerstein M, und Snyder M** (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.*, 10(1):57–63.
- Wendel JF** (2000). Genome evolution in polyploids. *Plant Mol. Biol.*, 42(1):225–249.
- Worrall D, Elias L, Ashford D, Smallwood M, Sidebottom C, Lillford P, Telford J, Holt C, und Bowles D** (1998). A carrot leucine-rich-repeat protein that inhibits ice recrystallization. *Science*, 282(5386):115–117.
- Wu Y und Cosgrove DJ** (2000). Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. *J. Exp. Bot.*, 51(350):1543–1553.
- Xin Z, Mandaokar A, Chen J, Last RL, und Browse J** (2007). Arabidopsis ESK1 encodes a novel regulator of freezing tolerance. *Plant J.*, 49:786–799.
- Xiong L, Schumaker KS, und Zhu JK** (2002). Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell*, 14:165–183.
- Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho T, und 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 Physiol.*, 110(1):249–257.
- Xu J, Tian J, Belanger FC, und Huang B** (2007). Identification and characterization of an expansin gene AsEXP1 associated with heat tolerance in C3 Agrostis grass species. *J. Exp. Bot.*, 58(13):3789–3796.
- Yamaguchi-Shinozaki K und Shinozaki K** (1994). A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 6:251–264.
- Yamori W, Noguchi K, Hikosaka K, und Terashima I** (2009). Cold tolerant crop species have greater temperature homeostasis of leaf respiration and photosynthesis than cold sensitive species. *Plant Cell Physiol.*, 50(2):203–215.
- Yan J, Wang J, Li Q, Hwang JR, Patterson C, und Zhang H** (2003a). AtCHIP, a U-Box-Containing E3 ubiquitin ligase, plays a critical role in temperature stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 132(2):861–869.
- Yan L, Helguera M, Kato K, Fukuyama S, Sherman J, und Dubcovsky J** (2004). Allelic variation at the VRN-1 promoter region in polyploid wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 109:1677–1686.
- Yan L, Loukoianov A, Tranquilli G, Helguera M, Fahima T, und Dubcovsky J** (2003b). Positional cloning of the wheat vernalization gene VRN1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100:6263–6268.
- Yuen T, Wurmbach E, Pfeffer RL, Ebersole BJ, und Sealfon SC** (2002). Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res.*, 30(10):e48–e48.
- Zámečník J, Bieblová J, und Grospietsch M** (1994). Safety zone as a barrier to root-shoot ice propagation. *Plant Soil*, 167(1):149–155.

- Zhang H, Mao X, Wang C, und Jing R** (2010). Overexpression of a common wheat gene TaSnRK2.8 enhances tolerance to drought, salt and low temperature in Arabidopsis. *PLoS One*, 5(12):1–12.
- Zhang X, Fowler SG, Cheng H, Lou Y, Rhee SY, Stockinger EJ, und Thomashow MF** (2004). Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant Arabidopsis. *Plant J.*, 39:905–919.
- Zhang X, Liu S, und Takano T** (2008). Two cysteine proteinase inhibitors from Arabidopsis thaliana, AtCYSa and AtCYSb, increasing the salt, drought, oxidation and cold tolerance. *Plant Mol. Biol.*, 68(1-2):131–143.
- Zhao M, Li F, Fang Y, Gao Q, und Wang W** (2011). Expansin-regulated cell elongation is involved in the drought tolerance in wheat. *Protoplasma*, 248(2):313–323.
- Zohary D und Hopf M** (2000). *Domestication of Plants in the Old World*. Oxford University Press.
- Zuther E, Buechel K, Hundertmark M, Stitt M, Hinch DK, und Heyer AG** (2004). The role of raffinose in the cold acclimation response of Arabidopsis thaliana. *FEBS Letters*, 576(1-2):169–173.

Anhang A.

A Tabellen

Tabelle A.1 – Polymorphismus der verwendeten 38 Mikrosatelliten. MAF, *major allele frequency*; GD, *gene diversity*; PIC, *polymorphism information content*.

Marker	Allele	Beob.	MAF	GD	PIC
GBM1007	2	5	0,80	0,32	0,27
GBM1008	1	6	1,00	0,00	0,00
GBM1013	2	4	0,75	0,38	0,30
GBM1015	4	4	0,25	0,75	0,70
GBM1018	1	4	1,00	0,00	0,00
GBM1020	2	6	0,50	0,50	0,38
GBM1021	1	5	1,00	0,00	0,00
GBM1026	2	6	0,50	0,50	0,38
GBM1029	2	6	0,83	0,28	0,24
GBM1031	3	6	0,67	0,50	0,45
GBM1033	3	6	0,50	0,61	0,54
GBM1043	1	6	1,00	0,00	0,00
GBM1047	2	6	0,83	0,28	0,24
GBM1054	3	6	0,67	0,50	0,45
GBM1060	2	5	0,80	0,32	0,27
GBM1061	2	4	0,75	0,38	0,30
GBM1063	2	5	0,80	0,32	0,27
GBM1075	3	5	0,60	0,56	0,50
GBM1110	2	6	0,83	0,28	0,24
GBM1176	3	4	0,50	0,63	0,55
GBM1208	2	4	0,75	0,38	0,30
GBM1212	3	6	0,67	0,50	0,45
GBM1218	1	6	1,00	0,00	0,00
GBM1221	3	4	0,50	0,63	0,55
GBM1256	4	5	0,40	0,72	0,67
GBM1280	1	5	1,00	0,00	0,00
GBM1334	2	6	0,67	0,44	0,35
GBM1363	2	6	0,67	0,44	0,35
GBM1404	1	6	1,00	0,00	0,00
GBM1405	2	4	0,75	0,38	0,30
GBM1413	2	6	0,50	0,50	0,38
GBM1419	3	6	0,67	0,50	0,45
GBM1459	2	6	0,83	0,28	0,24
GBM1461	4	6	0,33	0,72	0,67
GBM1464	4	5	0,40	0,72	0,67
GBM1483	1	5	1,00	0,00	0,00
GBM1501	3	5	0,60	0,56	0,50
GBM1516	2	4	0,75	0,38	0,30
Mittelwert	2,23	5,26	0,71	0,37	0,32

Tabelle A.2 – Übersicht über die funktionellen Kategorien des Makroarrays.

BIN-Einträge	%	MapMan BINs
107	0.8	1 PS
97	0.8	2 major CHO metabolism
82	0.6	3 minor CHO metabolism
68	0.5	4 glycolysis
25	0.2	5 fermentation
18	0.1	6 gluconeogenesis/ glyoxylate cycle
19	0.1	7 OPP
70	0.6	8 TCA / org
71	0.6	9 mitochondrial electron transport
197	1.6	10 cell wall
338	2.7	11 lipid metabolism
29	0.2	12 N-metabolism
211	1.7	13 amino acid metabolism
6	0	14 S-assimilation
32	0.3	15 metal handling
168	1.3	16 secondary metabolism
230	1.8	17 hormone metabolism
26	0.2	18 Co-factor and vitamine metabolism
28	0.2	19 tetrapyrrole synthesis
322	2.5	20 stress
127	1	21 redox
18	0.1	22 polyamine metabolism
91	0.7	23 nucleotide metabolism
15	0.1	24 Biodegradation of Xenobiotics
20	0.2	25 C1-metabolism
545	4.3	26 misc
1146	9	27 RNA
337	2.7	28 DNA
1968	15.5	29 protein
458	3.6	30 signalling
397	3.1	31 cell
271	2.1	33 development
434	3.4	34 transport
4715	37.2	35 not assigned

Tabelle A.3 – Übersicht über die Anzahl und Verteilung differentiell exprimierter Gene (2-fach) an den verschiedenen Zeitpunkten und deren Kombinationen für die jeweils 1000 stärksten induzierten bzw. reprimierten Genen. Das gleiche Gen kann an den unterschiedlichen Zeitpunkten induziert oder reprimiert sein und daher redundant gezählt werden. Am Zeitpunkt Tag 7 erreicht die Genregulation in allen drei Arten ihren Höhepunkt. Einige Weizen- und Gerstegenotypen (Uljanovka, G.K. Tiszatáj, Hundred oder Kold) haben im Vergleich zu den anderen Genotypen eine höhere Anzahl permanent induzierter bzw. reprimierter Gene. G = Genotypen, T = Tag.

G	Anzahl induzierter Gene						Anzahl reprimierter Gene					
	T 1	T 1+7	T 7	T 7+21	T 21	T 1-21	T 1	T 1+7	T 7	T 7+21	T 21	T 1-21
1	362	261	778	405	574	155	281	204	719	450	704	148
2	509	236	672	353	442	106	527	209	612	302	405	95
3	715	241	446	154	283	79	799	229	408	141	211	52
4	612	205	382	140	412	61	688	203	351	172	417	75
5	674	271	488	257	555	146	765	339	530	360	731	249
6	461	301	783	401	526	187	352	273	893	418	508	186
\bar{x}	556	253	592	285	465	122	569	243	586	307	496	134
7	580	406	792	317	395	169	428	346	862	310	379	134
8	799	747	939	797	822	627	740	654	910	800	872	544
9	516	339	794	425	507	200	509	256	718	419	470	84
10	788	557	699	476	700	378	783	394	560	385	816	237
11	499	270	709	211	432	120	640	330	634	311	662	134
12	729	565	820	631	725	392	741	505	764	562	641	313
\bar{x}	652	481	792	476	597	314	640	414	741	465	640	241
13	776	679	881	534	589	358	897	881	977	789	810	697
14	714	515	757	407	531	223	738	576	826	466	551	239
15	875	717	831	427	511	343	927	791	863	679	813	614
16	518	435	844	693	819	315	576	476	891	743	843	359
17	603	505	848	677	783	382	666	575	899	654	744	361
18	748	436	654	347	450	186	766	615	824	380	515	218
\bar{x}	706	548	803	514	614	301	762	643	880	619	713	415

Tabelle A.4 – Übersicht über die Gesamtheit differentiell exprimierter Gene (2x) während des Zeitverlaufs. Die angegebenen Werte sind Relationen von der Gesamtanzahl der Kategorie-Mitglieder zu der Anzahl differentiell exprimierter Gene in der selben Kategorie.

	Secale cereale						Triticum aestivum						Hordeum vulgare								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	\bar{x}		
1 PS	0,30	0,36	0,24	0,24	0,27	0,35	0,29	0,45	0,3	0,45	0,28	0,29	0,35	0,35	0,38	0,32	0,17	0,27	0,35	0,39	0,31
2 major CHO metabolism	0,32	0,29	0,37	0,33	0,41	0,33	0,34	0,4	0,36	0,37	0,36	0,33	0,36	0,36	0,28	0,32	0,26	0,33	0,26	0,3	0,29
3 minor CHO metabolism	0,29	0,24	0,22	0,22	0,18	0,17	0,22	0,29	0,22	0,22	0,24	0,22	0,24	0,24	0,17	0,13	0,23	0,28	0,28	0,26	0,23
4 glycolysis	0,13	0,22	0,32	0,25	0,25	0,29	0,24	0,21	0,31	0,15	0,28	0,21	0,16	0,22	0,09	0,22	0,10	0,19	0,28	0,12	0,17
5 fermentation	0,32	0,28	0,32	0,32	0,28	0,32	0,31	0,24	0,28	0,24	0,24	0,28	0,16	0,24	0,24	0,28	0,16	0,36	0,36	0,16	0,26
6 gluconeogenesis/ glyoxylate cycle	0,17	0,28	0,39	0,28	0,39	0,28	0,30	0,22	0,44	0,22	0,28	0,33	0,28	0,30	0,22	0,39	0,28	0,28	0,22	0,17	0,26
7 OPP	0,37	0,32	0,21	0,32	0,16	0,11	0,25	0,26	0,42	0,21	0,32	0,26	0,11	0,26	0,16	0,05	0,16	0,26	0,32	0,20	0,20
TCA / org	0,09	0,17	0,23	0,19	0,21	0,19	0,18	0,20	0,16	0,20	0,19	0,23	0,26	0,21	0,14	0,23	0,16	0,24	0,23	0,20	0,20
9 mitochondrial electron transport	0,11	0,17	0,15	0,10	0,17	0,20	0,15	0,08	0,18	0,13	0,14	0,17	0,17	0,15	0,11	0,13	0,11	0,14	0,14	0,15	0,13
10 cell wall	0,21	0,20	0,15	0,16	0,19	0,16	0,18	0,20	0,15	0,16	0,16	0,14	0,18	0,17	0,15	0,18	0,24	0,20	0,26	0,19	0,20
11 lipid metabolism	0,14	0,11	0,13	0,12	0,13	0,11	0,12	0,13	0,12	0,12	0,16	0,11	0,10	0,12	0,11	0,12	0,13	0,16	0,17	0,14	0,14
12 N-metabolism	0,21	0,24	0,45	0,17	0,24	0,31	0,27	0,24	0,24	0,17	0,14	0,24	0,34	0,23	0,17	0,28	0,14	0,14	0,21	0,28	0,20
13 amino acid metabolism	0,24	0,22	0,17	0,25	0,22	0,18	0,21	0,16	0,15	0,16	0,18	0,17	0,18	0,17	0,17	0,17	0,16	0,21	0,18	0,19	0,18
14 S-assimilation	0,50	0,50	0,50	0,67	0,33	0,5	0,50	0,33	0,50	0,17	0,67	0,17	0,5	0,39	0,00	0,33	0,17	0,33	0,33	0,33	0,25
15 metal handling	0,25	0,38	0,25	0,38	0,22	0,25	0,29	0,34	0,22	0,31	0,19	0,31	0,34	0,29	0,22	0,22	0,31	0,22	0,22	0,25	0,24
16 secondary metabolism	0,23	0,21	0,24	0,23	0,23	0,29	0,24	0,24	0,21	0,20	0,19	0,16	0,17	0,20	0,27	0,26	0,22	0,26	0,26	0,27	0,26
17 hormone metabolism	0,16	0,20	0,19	0,19	0,16	0,18	0,18	0,17	0,15	0,15	0,14	0,12	0,16	0,15	0,18	0,21	0,17	0,21	0,21	0,24	0,20
18 Co-factor and vitamine metabolism	0,00	0,08	0,15	0,12	0,12	0,19	0,11	0,12	0,12	0,12	0,19	0,08	0,08	0,12	0,23	0,27	0,12	0,12	0,23	0,23	0,20
19 tetrapyrrole synthesis	0,21	0,25	0,29	0,14	0,21	0,25	0,23	0,18	0,18	0,18	0,14	0,11	0,14	0,16	0,32	0,32	0,11	0,36	0,32	0,29	0,29
20 stress	0,23	0,22	0,25	0,23	0,21	0,24	0,23	0,23	0,16	0,19	0,24	0,20	0,22	0,21	0,25	0,24	0,19	0,21	0,20	0,24	0,22
21 redox	0,16	0,17	0,19	0,24	0,17	0,24	0,20	0,19	0,17	0,2	0,21	0,19	0,22	0,20	0,20	0,24	0,23	0,26	0,25	0,19	0,23
22 polyamine metabolism	0,17	0,22	0,28	0,39	0,22	0,33	0,27	0,33	0,39	0,28	0,33	0,22	0,22	0,30	0,33	0,22	0,50	0,39	0,33	0,44	0,37
23 nucleotide metabolism	0,15	0,12	0,14	0,12	0,14	0,13	0,13	0,15	0,22	0,16	0,16	0,19	0,14	0,17	0,11	0,19	0,14	0,22	0,22	0,13	0,17
24 Biodegradation of Xenobiotics	0,00	0,00	0,07	0,20	0,13	0,00	0,07	0,00	0,07	0,07	0,00	0,13	0,00	0,05	0,07	0,13	0,07	0,00	0,00	0,00	0,05
25 C1-metabolism	0,15	0,05	0,05	0,20	0,15	0,15	0,13	0,10	0,15	0,20	0,25	0,15	0,15	0,17	0,00	0,20	0,10	0,20	0,10	0,20	0,13
26 misc	0,14	0,15	0,19	0,18	0,15	0,19	0,17	0,16	0,19	0,16	0,16	0,15	0,14	0,16	0,19	0,18	0,19	0,21	0,23	0,18	0,20
27 RNA	0,12	0,13	0,14	0,13	0,15	0,15	0,14	0,14	0,16	0,15	0,16	0,14	0,14	0,15	0,13	0,14	0,15	0,14	0,15	0,13	0,14
28 DNA	0,22	0,17	0,17	0,15	0,27	0,24	0,20	0,18	0,25	0,32	0,16	0,21	0,31	0,24	0,16	0,23	0,17	0,16	0,15	0,22	0,18
29 protein	0,16	0,15	0,17	0,16	0,18	0,18	0,17	0,14	0,17	0,15	0,17	0,15	0,16	0,16	0,15	0,16	0,14	0,16	0,15	0,15	0,15
30 signalling	0,14	0,15	0,15	0,15	0,14	0,14	0,15	0,16	0,14	0,15	0,15	0,17	0,18	0,16	0,17	0,15	0,16	0,15	0,13	0,16	0,15
31 cell	0,18	0,16	0,19	0,17	0,18	0,19	0,18	0,16	0,15	0,17	0,16	0,13	0,15	0,15	0,17	0,16	0,17	0,15	0,15	0,17	0,16
33 development	0,22	0,18	0,24	0,21	0,17	0,21	0,21	0,22	0,20	0,23	0,21	0,19	0,21	0,21	0,20	0,17	0,21	0,17	0,16	0,23	0,19
34 transport	0,25	0,20	0,21	0,21	0,20	0,19	0,21	0,24	0,21	0,22	0,20	0,20	0,21	0,21	0,21	0,21	0,19	0,20	0,19	0,18	0,20
35 not assigned	0,15	0,15	0,14	0,15	0,14	0,13	0,14	0,15	0,15	0,14	0,15	0,15	0,14	0,15	0,16	0,15	0,16	0,15	0,15	0,15	0,15

Tabelle A.5 – Übersicht Korrelationsanalyse Phänotyp- versus Expressionsdaten. Anzahl signifikanter ($\alpha = 0.05$) positiver/negativer Korrelationen bei induzierten und reprimierten Genen.

	Secale cereale			Triticum aestivum			Hordeum vulgare		
	1 d	7 d	21 d	1 d	7 d	21 d	1 d	7 d	21 d
1 PS	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:1/1:0	1:2/1:3	0:0/1:5	1:0/0:0	0:0/1:0	0:0/0:0
2 major CHO metabolism	0:1/0:0	0:0/0:0	1:0/0:0	3:0/1:0	4:1/0:1	4:0/0:0	0:0/0:1	0:0/0:0	0:0/0:0
3 minor CHO metabolism	0:1/0:0	0:0/1:0	0:0/0:1	2:0/0:0	1:0/0:0	0:0/0:0	1:0/1:0	1:0/0:0	0:1/0:0
4 glycolysis	0:0/0:0	0:0/1:0	0:0/0:0	0:0/0:0	4:1/0:0	0:0/0:1	0:0/0:0	0:0/0:0	3:0/0:0
5 fermentation	1:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	1:0/0:0	1:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
6 gluconeogenese/ glyoxylate cycle	0:0/1:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/1:0	1:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	1:0/0:0
7 OPP	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:1	0:0/1:0	1:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
8 TCA / org	0:0/0:0	0:0/0:0	0:2/0:1	1:0/0:0	3:1/0:0	0:0/0:0	1:0/0:0	1:0/0:0	1:0/0:0
9 mitochondrial electron transport	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	1:1/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:1
10 cell wall	0:0/2:0	0:0/0:0	1:0/0:0	0:1/1:2	0:0/0:2	0:0/0:1	0:1/0:1	1:0/0:5	1:0/4:3
11 lipid metabolism	0:0/0:0	0:0/0:3	0:0/0:0	3:0/2:0	4:2/0:1	1:1/1:2	1:0/1:0	0:0/1:0	3:0/0:1
12 N-metabolism	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	1:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:1	0:0/0:1	0:0/0:0
13 amino acid metabolism	0:0/0:0	0:0/0:0	3:1/0:0	0:0/0:1	2:0/0:0	2:1/2:1	0:0/0:0	1:1/2:1	0:0/1:3
14 S-assimilation	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:1	0:0/0:0	0:0/0:0
15 metal handling	0:0/1:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/1:0	2:0/0:0	0:0/0:1	0:0/0:0	0:0/0:0	1:0/0:0
16 secondary metabolism	0:1/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:2/0:0	5:0/1:2	1:1/0:2	0:0/0:0	1:0/0:1	0:1/0:3
17 hormone metabolism	0:2/0:1	0:0/1:1	1:0/1:0	0:2/0:0	1:0/1:1	2:1/0:1	0:0/0:1	0:0/1:0	2:0/0:4
18 Co-factor and vitamine metabolism	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	1:0/0:0	1:1/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	2:0/0:0
19 tetrapyrrole synthesis	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/1:0	0:0/0:0	0:0/1:0	0:0/0:1	0:0/0:0	0:0/1:0	1:0/0:0
20 stress	1:1/0:0	1:1/0:0	1:1/0:0	1:1/0:2	5:2/0:0	1:2/1:2	2:0/2:0	2:1/0:0	4:2/1:0
21 redox	0:1/0:0	0:0/0:1	0:0/0:0	3:1/1:0	4:0/0:0	2:0/0:0	0:0/0:0	1:0/0:0	2:0/0:0
22 polyamine metabolism	0:0/0:0	1:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	2:0/0:0	0:0/0:1	0:0/0:0	0:0/0:0	0:1/0:0
23 nucleotide metabolism	0:0/0:0	0:0/0:0	1:0/0:1	0:0/0:1	0:1/0:1	0:0/0:0	1:0/0:0	0:0/0:0	1:1/2:1
24 Biodegradation of Xenobiotics	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
25 Cl-metabolism	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	1:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
26 misc	1:0/1:0	1:0/0:0	3:1/5:2	1:1/2:2	5:1/5:4	2:5/0:3	0:3/0:1	5:1/1:1	5:0/1:0
27 RNA	0:2/3:0	0:0/0:0	0:0/0:4	2:1/3:2	5:1/3:4	8:2/1:7	1:0/1:0	0:3/2:0	6:1/2:1
28 DNA	0:0/1:0	0:0/0:2	0:0/0:0	0:1/0:0	1:0/0:7	1:0/0:23	1:0/0:3	0:0/2:3	1:0/0:4
29 protein	0:1/3:0	1:5/2:0	2:2/0:4	6:8/3:4	25:7/7:9	7:1/2:16	2:3/1:2	3:2/1:4	10:4/3:6
30 signalling	0:4/1:0	0:0/0:0	0:0/0:0	1:2/0:1	4:2/3:2	4:0/1:4	2:0/1:1	1:1/0:1	1:0/0:2
31 cell	1:3/0:0	0:0/1:1	1:0/0:4	1:0/1:0	3:4/1:3	0:1/1:3	1:0/0:0	0:1/1:0	2:1/0:2
33 development	0:2/0:0	0:0/1:0	0:0/0:1	3:2/1:0	6:0/0:2	5:0/0:3	0:0/0:0	0:0/0:0	1:0/0:1
34 transport	0:3/1:0	1:0/0:1	3:0/0:1	1:3/3:2	7:2/1:0	2:4/0:9	1:3/0:3	0:3/0:2	3:1/1:1
35 not assigned	1:3/6:0	8:1/3:3	4:4/1:5	16:9/16:14	33:15/16:17	25:11/9:27	4:9/0:8	6:9/9:5	18:9/8:14
Σ	5:25/20:1	13:7/10:12	21:11/8:25	44:35/38:31	133:42/40:59	70:32/19:113	19:19/7:23	23:22/22:24	69:22/23:47

Tabelle A.6 – Übersicht Gruppenseparabilitäts-Analyse. Anzahl positiver:negativer Ereignisse bei induzierten und reprimierten Genen.

	Secale cereale						Triticum aestivum						Hordeum vulgare					
	1 d		7 d		21 d		1 d		7 d		21 d		1 d		7 d		21 d	
1 PS	0:0/7:0	0:1/1:0	0:0/2:1	1:1/2:0	1:2/1:2	0:1/1:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
2 major CHO metabolism	0:0/0:0	0:2/0:0	1:0/0:0	6:0/1:0	1:0/0:1	2:3/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
3 minor CHO metabolism	0:0/0:0	1:0/0:0	0:0/0:1	2:0/1:1	1:1/0:0	0:1/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
4 glycolysis	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/1:0	1:0/0:0	4:2/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
5 fermentation	0:0/0:0	0:0/0:1	0:0/0:0	0:0/0:0	1:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
6 gluconeogenesis/ glyoxylate cycle	0:0/1:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	1:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
7 OPP	0:0/0:0	0:0/0:1	0:0/0:2	1:0/0:0	1:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
8 TCA / org	0:0/0:0	0:0/2:0	0:1/0:0	1:0/2:0	2:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
9 mitochondrial electron transport	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	2:0/1:0	1:1/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
10 cell wall	1:0/2:0	0:0/0:0	1:3/1:1	2:0/2:1	1:0/1:1	0:0/0:1	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
11 lipid metabolism	0:0/0:0	0:0/0:3	0:2/1:0	5:0/3:0	5:0/0:2	1:0/0:1	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
12 N-metabolism	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	1:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
13 amino acid metabolism	0:1/1:0	0:0/1:0	4:1/1:0	1:0/1:2	2:1/0:0	0:1/1:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
14 S-assimilation	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:1	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
15 metal handling	0:0/0:0	0:1/0:0	0:1/0:0	0:0/0:0	2:0/0:1	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
16 secondary metabolism	1:0/0:0	1:1/2:0	0:1/0:1	5:0/0:0	6:1/1:2	1:3/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
17 hormone metabolism	1:2/0:1	0:0/0:1	1:0/2:0	1:0/1:0	2:0/0:2	1:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
18 Co-factor and vitamine metabolism	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	1:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
19 tetrapyrrole synthesis	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/1:0	0:0/0:0	1:0/0:1	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
20 stress	1:3/1:0	2:2/0:0	0:2/0:0	3:2/2:1	5:3/0:1	1:1/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
21 redox	1:0/0:0	1:1/0:1	0:0/0:0	2:1/1:0	5:0/0:0	1:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
22 polyamine metabolism	0:0/0:0	1:0/0:0	1:1/0:0	0:0/0:0	2:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
23 nucleotide metabolism	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	1:0/0:0	0:0/0:2	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
24 Biodegradation of Xenobiotics	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
25 C1-metabolism	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
26 misc	1:2/1:0	1:2/0:0	4:2/3:1	7:1/4:3	4:2/1:2	1:4/1:1	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
27 RNA	0:4/3:0	1:3/1:0	0:2/3:5	7:3/6:3	11:2/3:4	2:2/1:2	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
28 DNA	0:0/0:0	0:0/4:3	0:0/1:1	0:1/1:1	1:1/0:4	0:0/1:1	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
29 protein	1:3/2:0	3:7/8:2	6:2/3:6	8:11/5:7	22:6/6:11	0:1/3:6	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
30 signalling	0:2/1:0	0:2/0:0	0:3/1:0	6:3/4:3	2:2/3:1	1:0/1:1	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
31 cell	1:3/0:0	0:3/2:1	0:4/0:5	4:3/1:2	3:4/3:3	1:1/0:1	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
33 development	0:0/0:0	0:2/1:0	0:1/1:1	4:3/4:0	7:1/0:2	3:0/0:1	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
34 transport	0:3/1:0	0:1/1:1	5:1/3:3	4:1/4:3	6:4/1:1	3:1/0:5	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
35 not assigned	3:3/7:1	9:14/9:3	5:11/9:16	33:9/51:17	35:29/13:19	8:11/2:13	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0	0:0/0:0
Σ	11:26/27:2	20:42/32:17	28:38/33:47	105:39/96:44	137:61/34:62	29:31/11:33	24:30/21:35	26:37/36:28	106:24/30:100									

Tabelle A.7 – Verwendete Primer für qRT-PCR (Gerste).

Oligo ID (5'- bzw. 3'-Ende)	ID	Sequenz 5'	Sequenz 3'
Actin_S	Actin_AS	GCCGTGCTTCCCTCTATG	GCTTCTCCTTGATGTCCTTA
HVRBS_S1	HVRBS_AS1	GACGAACGATTTGCACGTC	GCGAAGCCA GAGGAACCT
HVGAPDH-F1	HVGAPDH-R1	CAATGCTAGCTGCAACCACTG	CTAGCAGCCCTTCCACCTCTCCA
HVSUCDH_S	HVSUCDH_AS	AGTTCTGAAGCTTTGGAGAAATGGAG	ACATGAACGACCTTGATGACGAAATC
HVDHN9-S6	HVDHN9-AS8	TCCAAAGGCAAGCAGACAACC	GACCGCGCTGCCTCCCCCA
HVPDX_S1	HVPDX_AS1	GGCCACCATATCAACACCTGCCATCC	AGGAGGTGCATGGTTGGTACGACTTGAA
HVAR_S2	HVAR_AS2	TGGCGTTGCCGTGGAACATT	CGTAGGCGAGGACATGATGAAAGCT
HVCDSP_S1	HVCDSP_AS1	TGAACCCACAAGGCATCTCACGAGC	CGGGTGTTCTTTGTTGTTGTAAGCGA
HvGM10_S1	HvGM10_SA1	TTGATGATTTGTGTTOCCATTTGCCG	CAGATTTGCCACGGACTACATCAA
HvSTO_S2	HvSTO_AS2	GCCTTCGTCTTCTGGGTGAGGACA	TGTAGCGTTGGTGGTTGGCCGAGAG
HvJUMP_S2	HvJUMP_AS2	AGCCATGGGACGGTTGTGAT	CACCCAACATGTTCTTGAGCAACCA
HvIP3K_S1	HvIP3K_AS1	CCTGGAATACTTTGGGAGCTGATGC	CTGCAAGCTGAAAGAACATGGAAAG
HvCAX_S3	HvCAX_AS3	TCGTGGGCAAGTGGTTCCACTT	GCCAGTGTAGAGGGCAATCTGCTCT
HvNADK_S2	HvNADK_AS2	TTGACCTCATTTTAACCTCTGGCGGG	AAGCAACAACTGGAAGAACTGGTCC
HvCS_S2	HvCS_AS2	GAATGACCACTGGGACACCGCATTC	TCCGCATGGGAAGGTCTGTACG
HvAO_S2	HvAO_AS2	CACGTGCCCAACAACGATGCTCGACA	ACTGCCGCAACGGTCTCCAGCATCA
HvTSC_S2	HvTSC_AS2	ACTAACGTTTGTCTTGGTGGTGTGG	AGATGCACCTCAGACAGATTGGCAAT
HvCK_S2	HvCK_AS2	ACAACCTTGACATGCGCTGTTCCG	GCACAAGTTCTTTGGCAGTTTGGAGC
HvICE_S1	HvICE_AS1	TATGCAAGTATGAGATCCCGGAGCA	GGTGACCCCTCAACTTGGAAACAAGCT

Tabelle A.8 – Verwendete Primer für qRT-PCR (Roggen) und Sequenzierung.

Oligo ID (5'- bzw. 3'-Ende)	ID	Sequenz 5'	Sequenz 3'
ScTUB_S2	ScTUB_AS2	TTTGATGTTGTGAGGAGGAGGC	ATCATGGGTACGGGTACTCCTCC
ScEF1_A1	ScEF1_AS1	GCATGCTCTCTTCTTCTTCACTCTTG	ACGGGCTTCGACTACTTTGGGAGT
ScGAPDH_S1	ScGAPDH_AS1	ATGACCACTGTTTCATGCCACTGCTGC	CACCACTGCTGCTTGGAAATGATGTT
ScAHS-S2	ScAHS-AS2	CTTGATTTTGTATCCATGGCACAAGG	CCCTTTTGTACAGCTCATCAAGTACC
ScAKR_S2	ScAKR_AS2	CATCAITCCAACCTTCAGAGAGCTTG	TGGGCAAGTGGGTCTGCTCTGA
ScAMY_S3	ScAMY_AS3	CTCAAGGTGCAGGGCGTCAATG	CCGTTACCCATTTCCGGAAGTGGTATG
ScESK_A1	ScESK_AS1	CCAAAGATGAAAATTTGTGCCTGACG	CCCCAGCCTTCACTCTGCATATGTAC
ScWSI_S1	ScWSI_AS1	CCAAGGACGGGTGATGAACA	CGCCTTGACAAATGGCAGCAGTAGTAA
ScST-S3	ScST-AS3	ATGTTGGCTGCTACCAATTATCATT	CCTGGAATGTGCTGGTTATGATG
ScNAC_S2	ScNAC_AS2	CCGGCCCGTTCTAAGCAGAGCAAA	ACGGACCTCCCTCCCGTTTCCCTAT
ScSUS-S1	ScSUS-AS1	CCGTACTGGAGACATACACCG	GGCAATAGTGACTGGGTAACCTCC
ScADH-S3	ScADH-AS3	GTGTAGCTGTCTCTGTTGGTGT	CACCTCCAGCTCCTTTTCTCATG
ScWCR-S1	ScWCR-AS1	GCCGGCCCGTATATCTGTT	CGCCTTGACAATGGCAGCAGTAGTAA
ScENO-S2	ScENO-AS2	GTCAATGCAATGCTCTTCTGCTCA	GCATAGCAAGCTTGTTTCCAGC
ScCER-S2	ScCER-AS2	TGTCCTGGCTCTCCATGGTCCCT	GCTTCTTCTCCCACTTCAATCC
M13 Forward	M13 Reverse	GTAAACGACGGCCAG	CAGGAAAAGCTATGAC
M13-21uPE	M13rev	ACGACGTTGTAAACGACGGCCAG	GGAAACAGCTATGACCATG
M13revlong	M13uni	CACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC	TGTAAACGACGGCCAGT
T3 long	T3 Promoter	CCAAGCTCGAAATTAACCCCTCACTAAAG	ATTAAACCCTCACTAAAGGGA
T7 long		GAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAA	
SP6 Promoter Primer		GATTTAGGTGACACTATAG	
HvZCCTH_S	HvZCCTH_AS	CACCATCGCATGATGCAC	TCATATGGCGAAGCTGGAG
VAI-R		GATGTGGCTCACCATCCACG	
361S-F	361W-F	AAGCCCGTTATATCACCTTA	AAGCCCGTTATATCACCTTT

Tabelle A.9 – Überrepräsentationsanalyse Photosynthese (97 Einträge) G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung. (+/-), < 0.05; (+++/-), < 0.01; (+++/---), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert										Reprimiert													
	1		1+7		7		7+21		21		1+7+21		1		1+7		7		7+21		21		1+7+21	
G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p									
1	32	0.792	1.000	0.600	0.660	0.630	0.660	0.630	0.991	0.086	0.074	+++	3e-06	0.054	+	0.016	0.080							
2	39	0.581	0.863	0.794	0.330	0.266	1.000	1.000	1.000	1.000	0.246	0.072	+	0.015	0.273	+	0.037	1.000						
4	26	1.000	1.000	0.966	0.738	1.000	1.000	1.000	1.000	8e-04	+	0.012	++	0.001	+	0.017	+	0.020	0.136					
5	29	1.000	1.000	1.000	1.000	0.660	0.660	0.461	0.824	9e-05	+++	2e-04	+++	3e-08	+++	3e-05	+++	2e-05	0.055					
6	37	1.000	1.000	1.000	0.991	0.541	1.000	0.397	1.000	0.397	0.105	+++	1e-04	+++	2e-04	+++	2e-05	0.087						
9	48	0.586	0.161	0.604	0.822	0.733	0.623	0.733	0.623	9e-04	+++	2e-05	+++	3e-15	+++	8e-09	+++	9e-09	4e-06					
8	32	0.607	0.474	0.863	1.000	1.000	1.000	0.790	0.790	0.010	++	0.009	+++	8e-04	+++	2e-04	+++	2e-04	0.002					
7	48	0.187	+	0.032	0.392	1.000	1.000	1.000	0.998	4e-05	+++	3e-06	+++	1e-14	+++	9e-07	+++	2e-06	+	0.017				
12	37	0.463	0.177	0.615	0.998	1.000	1.000	0.483	0.483	2e-04	+++	4e-06	+++	1e-07	+++	4e-08	+++	4e-07	9e-07					
10	30	0.511	0.172	0.354	1.000	0.937	0.963	0.963	0.963	0.003	+++	3e-04	+++	8e-04	0.967	0.956	0.956	0.467						
11	31	0.315	0.076	0.808	0.656	1.000	0.338	1.000	0.338	3e-04	+++	2e-06	+++	2e-05	0.120	0.446	0.168							
14	34	1.000	0.737	0.378	0.660	0.463	1.000	0.463	1.000	2e-04	+++	2e-05	+++	1e-07	0.062	0.169	0.256							
15	18	1.000	1.000	0.957	1.000	1.000	0.943	1.000	0.943	1.000	0.950	0.531	0.679	0.956	0.993									
13	41	0.152	0.052	0.199	0.738	0.898	0.330	0.330	0.330	8e-12	+++	5e-12	+++	9e-14	+	0.049	0.250							
17	37	0.898	1.000	0.734	1.000	0.828	1.000	1.000	1.000	3e-08	+++	2e-09	+++	6e-11	+++	1e-04	+++	6e-04	++	0.002				
18	42	1.000	1.000	0.792	0.790	0.553	1.000	1.000	1.000	7e-06	+++	2e-07	+++	3e-15	+++	8e-04	++	0.009	0.091					
16	29	1.000	1.000	0.734	0.451	0.245	1.000	1.000	1.000	1e-03	+++	1e-04	+++	7e-06	+	0.023	0.057	0.093						

Tabelle A.10 – Überrepräsentationsanalyse Kohlenhydrat-Stoffwechsel (97 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung. (+/-), < 0.05; (++)/(-), < 0.01; (+++/---), < 0.001; p, p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert										Reprimiert									
	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21		
G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	
1	27	0.576	0.467	+	0.033	0.627	0.228	0.741	0.521	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.720	
2	25	++	0.004	+	0.010	++	0.005	+	0.025	+	0.031	0.247	0.986	0.326	1.000	0.696	0.955	0.209		
4	29	+	0.034	0.056	+++	3e-04	+	0.014	0.108	0.334	1.000	1.000	1.000	0.755	0.794	1.000	1.000	1.000		
5	36	++	0.002	+	0.019	+++	5e-05	+++	2e-04	+++	6e-05	0.004	0.935	1.000	0.703	1.000	1.000	1.000	0.853	
6	28	+	0.037	+	0.031	+++	9e-04	+++	0.621	0.986	0.531	0.567	0.274	0.955	0.466	0.686	0.263			
3	32	0.099	+	0.034	+++	8e-07	+++	2e-04	+++	5e-04	+++	0.008	1.000	0.837	0.956	0.373	0.332	1.000		
9	32	++	0.001	+++	5e-04	+++	2e-06	+++	4e-07	+++	3e-08	+++	1.000	1.000	0.541	0.794	0.977	1.000		
8	31	+++	3e-05	+++	1e-05	+++	7e-07	+++	1e-05	+++	2e-05	+++	1.000	1.000	0.956	1.000	1.000	0.986		
7	35	+++	2e-05	+++	6e-04	+++	1e-04	+++	4e-08	+++	2e-08	+++	0.476	1.000	1.000	0.704	0.598	0.345		
12	31	+++	1e-04	+++	7e-05	+++	9e-07	+++	5e-06	+++	2e-06	+++	0.447	0.983	1.000	1.000	1.000	1.000		
10	31	++	0.001	+++	8e-04	+++	3e-04	+++	0.002	+	0.016	++	1.000	0.791	1.000	1.000	0.467	1.000		
11	28	++	0.003	++	0.002	++	0.008	++	0.060	0.244	+	0.033	0.498	0.728	0.895	0.924	0.523	1.000		
14	27	++	0.008	0.062	++	0.002	++	0.007	++	0.014	+	0.072	0.447	0.459	0.939	1.000	1.000	0.660		
15	21	0.391	0.310	0.059	++	0.003	+	0.011	0.053	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.993	1.000	1.000	0.883		
13	23	0.251	0.217	0.076	0.145	0.057	0.269	0.315	0.292	0.459	0.511	0.898	0.946	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		
17	22	0.468	0.274	++	0.006	++	0.005	++	0.007	0.033	0.261	1.000	1.000	1.000	0.946	0.985	0.618	0.939		
18	25	+	0.025	+	0.011	++	0.001	+	0.022	+	0.033	0.986	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		
16	29	0.427	0.250	+++	8e-04	+++	6e-05	+++	5e-05	+++	0.092	0.986	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.767		

Tabelle A.11 – Überrepräsentationsanalyse Kohlenhydrat-Stoffwechsel II (82 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung. (+/-) < 0.05; (++/-), < 0.01; (+++/-), < 0.001; p, p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert										Reprimiert													
	1		1+7		7		7+21		21		1+7+21		1		1+7		7		7+21		21		1+7+21	
G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p									
1	23	0.180	1.000	1.000	1.000	0.930	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.090	0.230	0.250	0.310	0.060	0.310	0.160	0.160	0.100	0.280	0.240	0.560	0.160
2	20	0.480	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.070	0.100	0.280	0.240	0.560	0.160	0.100	0.280	0.240	0.560	0.160	0.100	0.160
4	18	0.690	0.990	0.930	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.350	0.230	0.330	0.160	0.060	0.100	0.100	0.280	0.240	0.560	0.160	0.100	0.160
5	15	0.990	0.840	0.790	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
6	14	0.950	1.000	1.000	1.000	0.930	0.930	0.660	0.660	0.990	0.990	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
3	18	0.470	1.000	0.790	0.990	0.990	0.990	0.660	0.660	1.000	1.000	0.990	0.120	0.050	0.110	0.100	0.100	0.230	0.230	0.120	0.050	0.110	0.100	0.230
9	17	0.480	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.970	0.970	1.000	1.000	0.970	1.000	0.870	0.760	0.950	0.830	0.830	0.760	0.950	0.830	0.830	0.760	0.950
8	17	0.540	0.890	0.810	0.990	0.990	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.990	1.000	0.990	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
7	23	0.100	0.560	0.530	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.570	1.000	0.920	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
12	20	0.170	0.180	0.030	+	0.030	+	0.070	0.220	1.000	1.000	1.000	1.000	0.900	0.660	0.450	1.000	1.000	0.900	0.660	0.450	1.000	1.000	1.000
10	19	0.990	0.660	1.000	1.000	1.000	1.000	0.870	0.540	0.760	0.410	0.540	0.390	0.640	0.390	0.640	0.390	0.640	0.390	0.640	0.390	0.640	0.390	0.640
11	17	0.230	0.650	0.470	0.250	0.250	0.230	0.230	0.230	0.990	0.880	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
14	10	1.000	1.000	0.900	1.000	1.000	1.000	0.540	1.000	1.000	1.000	0.540	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
15	18	1.000	1.000	1.000	1.000	0.570	0.680	0.680	0.680	0.570	0.990	0.990	0.660	0.590	0.220	0.990	0.990	0.220	0.990	0.990	0.220	0.990	0.990	0.220
13	13	0.990	0.860	0.670	0.510	0.680	0.700	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
17	22	0.410	0.470	0.660	0.860	0.990	0.720	0.090	0.190	0.240	0.570	0.270	0.700	0.270	0.700	0.270	0.700	0.270	0.700	0.270	0.700	0.270	0.700	0.270
18	20	0.750	0.780	0.720	1.000	1.000	1.000	0.750	0.380	0.430	0.410	0.210	0.250	0.260	0.250	0.260	0.250	0.260	0.250	0.260	0.250	0.260	0.250	0.260
16	22	0.250	0.150	0.430	0.870	1.000	0.260	0.050	0.450	0.550	0.270	0.040	0.180	0.180	0.040	0.180	0.180	0.040	0.180	0.180	0.040	0.180	0.180	0.040

Tabelle A.12 – Überrepräsentationsanalyse Glykolyse (68 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung. (+/-), < 0.05; (++)/(-), < 0.01; (+++/---), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert												Reprimiert											
	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21						
G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	
1	1	1.000	1.000	1.000	0.889	0.953	1.000	1.000	0.701	1.000	1.000	0.978	1.000	1.000	1.000	1.000	0.978	1.000	1.000	0.978	1.000	0.556		
2	5	0.569	0.214	0.170	0.436	0.704	0.413	0.940	1.000	0.940	0.332	0.296	0.813	1.000	0.796	1.000	0.332	0.296	0.813	1.000	0.813	0.813		
4	4	0.969	0.986	1.000	1.000	1.000	1.000	+	0.044	1.000	1.000	0.535	1.000	1.000	1.000	1.000	0.535	1.000	1.000	0.535	1.000	1.000		
5	6	0.535	0.272	0.555	0.503	0.947	0.232	0.143	1.000	0.940	0.274	1.000	1.000	1.000	0.940	1.000	0.274	1.000	1.000	0.274	1.000	1.000		
6	2	1.000	1.000	0.986	1.000	1.000	1.000	0.429	1.000	0.171	0.686	1.000	1.000	1.000	0.171	0.686	0.136	1.000	1.000	0.136	1.000	1.000		
3	6	0.676	0.219	0.189	1.000	0.821	1.000	+	0.018	0.988	0.717	1.000	1.000	1.000	0.941	0.717	1.000	1.000	0.717	1.000	1.000	1.000		
9	3	1.000	0.843	0.212	1.000	1.000	0.986	0.422	0.993	0.194	0.546	1.000	1.000	1.000	0.422	0.194	0.546	1.000	1.000	0.422	0.194	0.546		
8	18	+++	1e-05	+++	5e-06	+++	2e-05	+++	7e-04	+++	9e-04	+++	3e-04	+++	0.552	0.251	0.370	0.449	0.737	0.432	0.432	0.432		
7	5	0.625	0.531	0.211	1.000	1.000	0.984	1.000	0.984	1.000	1.000	0.926	1.000	1.000	1.000	1.000	0.926	1.000	1.000	0.926	1.000	0.926		
12	5	0.983	0.613	0.860	0.976	1.000	0.876	0.984	1.000	0.984	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		
10	12	+	0.017	+	0.014	++	0.008	+	0.017	+	0.020	+	0.049	0.986	1.000	0.667	1.000	0.667	1.000	0.667	1.000	0.989		
11	3	1.000	0.998	0.106	0.394	0.695	0.886	0.977	1.000	0.977	0.660	1.000	1.000	1.000	0.977	0.660	1.000	1.000	0.660	1.000	1.000	1.000		
14	6	0.675	0.572	0.137	0.890	1.000	1.000	1.000	0.890	1.000	0.933	0.990	1.000	1.000	1.000	0.933	0.788	1.000	1.000	0.788	1.000	0.990		
15	5	1.000	1.000	0.986	0.906	0.763	0.844	0.624	0.853	0.736	0.731	1.000	1.000	1.000	0.736	0.731	1.000	1.000	0.731	1.000	1.000	1.000		
13	2	0.852	0.977	0.738	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		
17	7	0.224	0.259	0.056	0.088	0.209	0.261	1.000	0.890	0.890	0.985	1.000	1.000	1.000	0.890	0.985	1.000	1.000	0.985	1.000	1.000	1.000		
18	3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.852	1.000	0.852	1.000	0.937	0.987	1.000	1.000	0.937	0.987	1.000	1.000	0.937	1.000	1.000	0.987		
16	2	1.000	1.000	1.000	0.834	0.860	1.000	0.860	1.000	0.860	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		

Tabelle A.13 – Überrepräsentationsanalyse Fermentation (25 Einträge) G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung. (+/-), < 0.05; (+/--), < 0.01; (++++/---), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert										Reprimiert													
	1		1+7		7		7+21		21		1+7+21		1		1+7		7		7+21		21		1+7+21	
G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	
1	8	0.196		0.818		0.564		0.233		0.054		0.658		1.000		1.000		0.521		0.603		0.992		1.000
2	7	1.000		0.792		0.796		0.495		0.599		0.557		0.673		0.749		0.185	+	0.037		0.075		0.530
4	8	0.986		1.000		0.942		0.630		0.963		1.000		0.232		0.071	+	0.011	+++	8e-04	++	0.004	++	0.010
5	7	0.476		0.385		0.112		0.363		0.698		0.642		1.000		1.000		0.986		1.000		0.997		1.000
6	8	0.028	+	0.425		0.567		1.000		0.672		1.000		1.000		1.000		1.000		0.569		0.658		1.000
3	8	0.516		0.794		0.599		1.000		1.000		1.000		1.000		0.319		0.076	++	0.004	+	0.014		0.054
9	6	0.663		0.473	+	0.047	++	0.004	++	0.009	++	0.275		0.986		1.000		0.813		1.000		1.000		1.000
8	7	0.306		0.268		0.198		0.133		0.052		0.194		1.000		0.988		0.647		0.815		1.000		0.986
7	6	0.722		0.555		0.298	+	0.041	+	0.017		0.230		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000
12	4	1.000		1.000		0.598		0.767		0.996		1.000		1.000		1.000		1.000		0.986		0.987		1.000
10	6	0.297		0.703		0.991		0.627		0.240		0.527		1.000		0.950		0.704		0.943		1.000		1.000
11	7	1.000		1.000		0.511		0.752		0.586		1.000		1.000		0.890		0.769		0.868		0.792		0.616
14	7	0.993		0.662		1.000		0.557		0.676		0.310		0.263		0.719		0.601		0.986		1.000		1.000
15	4	1.000		0.994		1.000		0.576		0.658		0.476		1.000		1.000		1.000		0.804		1.000		0.752
13	6	0.288		0.226		0.170	+	0.044		0.057		0.056		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000
17	9	0.017	+	0.008	++	0.057		0.226		0.294		0.065		1.000		1.000		0.831		0.461		0.538		0.926
18	4	0.998		0.591		0.788		0.484		0.603		0.254		1.000		0.753		1.000		0.940		1.000		0.763
16	9	0.131		0.088		0.151		0.236		0.318		0.156		0.718		0.986		0.647		0.538		0.337		0.923

Tabelle A.14 – Überrepräsentationsanalyse Gluconeogenese (18 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung. (+/-), < 0.05; (++)/(-), < 0.01; (+++)/(-), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert												Reprimiert											
	1		1+7		7		7+21		21		1+7+21		1		1+7		7		7+21		21		1+7+21	
G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p									
1	7	0.830	0.730	0.730	0.730	0.870	0.980	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.040	0.480	0.480	0.680	0.680	1.000	1.000	
2	6	0.950	0.700	0.660	0.830	0.830	0.900	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.280	0.320	0.320	0.150	0.150	1.000	1.000	
4	6	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.150	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.990	1.000	1.000	0.820	0.610	0.610	0.150	0.150	1.000	1.000	1.000	
5	3	0.990	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.720	0.810	0.550	0.390	1.000	1.000	1.000	0.370	0.370	0.720	0.720	
6	2	0.920	1.000	0.990	1.000	1.000	0.950	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
3	4	1.000	0.710	0.470	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.870	0.560	0.560	0.670	0.670	1.000	1.000	1.000	
9	4	0.950	0.810	0.740	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.540	0.730	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
8	8	0.180	0.150	0.240	0.750	0.750	0.760	0.630	0.630	0.630	0.630	0.380	1.000	1.000	0.990	0.750	0.460	0.750	0.460	0.960	0.960	0.960	0.960	
7	5	0.980	0.870	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.460	0.790	0.790	0.410	0.410	1.000	1.000	1.000	
12	2	1.000	0.980	1.000	1.000	1.000	0.990	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.990	1.000	1.000	0.990	0.990	1.000	1.000	1.000	
10	6	0.410	0.250	0.350	0.190	0.190	0.350	0.130	0.130	0.130	0.130	0.400	0.420	0.420	0.580	0.850	0.850	0.760	0.760	0.700	0.700	0.700	0.700	
11	5	0.940	0.740	1.000	0.670	0.670	0.890	0.520	0.520	0.520	0.520	0.300	0.810	0.810	0.630	0.790	0.320	0.790	0.320	0.540	0.540	0.540	0.540	
14	1	0.990	1.000	0.990	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.980	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
15	3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.990	0.740	0.740	0.790	1.000	1.000	1.000	0.990	0.990	1.000	1.000	1.000	
13	3	0.990	0.990	0.990	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.480	0.470	0.470	0.540	0.410	0.410	0.410	0.420	0.420	0.340	0.340	0.340	
17	5	1.000	1.000	0.990	0.990	0.990	0.990	1.000	1.000	1.000	1.000	0.120	0.090	0.090	0.080	0.310	0.310	0.310	0.380	0.380	0.390	0.390	0.390	
18	6	1.000	0.890	1.000	0.820	0.820	0.910	0.630	0.630	0.630	0.630	0.160	0.100	0.100	0.060	0.850	0.850	0.850	0.950	0.950	1.000	1.000	1.000	
16	5	1.000	1.000	1.000	0.990	0.990	0.990	1.000	1.000	1.000	1.000	0.090	0.500	0.500	0.800	0.710	0.710	0.710	0.200	0.200	0.380	0.380	0.380	

Tabelle A.15 – Überrepräsentationsanalyse **Oxidative Phosphorylierung** (19 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung; (+/-), < 0.05; (++)/(-), < 0.01; (+++/----), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert						Reprimiert											
	G	n	+/-	p	+/-	p	G	n	+/-	p	+/-	p	G	n	+/-	p	+/-	p
1	6	1.000	1.000	0.860	0.540	0.790	1.000	1.000	1.000	0.790	1.000	1.000	1.000	1.000	0.850	1.000	1.000	0.960
2	12	0.780	0.790	0.830	1.000	1.000	1.000	1.000	0.790	1.000	1.000	0.980	0.350	0.320	0.980	1.000	0.390	0.820
4	13	1.000	1.000	1.000	1.000	0.910	1.000	1.000	0.840	0.390	0.100	0.310	0.910	1.000	0.910	1.000	0.910	1.000
5	15	0.980	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.570	1.000	1.000	1.000	0.860	0.140	1.000	1.000	0.140	1.000
6	13	1.000	1.000	1.000	0.900	0.940	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.500	0.340	0.580	0.990	1.000	0.340	0.990
3	16	0.200	0.990	1.000	0.970	0.580	1.000	1.000	0.100	0.460	0.690	0.950	1.000	0.640	1.000	1.000	0.100	0.640
9	14	1.000	1.000	0.860	0.920	1.000	0.700	1.000	1.000	0.850	0.980	0.890	0.990	1.000	0.990	1.000	0.990	1.000
8	11	0.860	0.710	0.630	0.590	0.600	0.810	0.850	0.980	0.890	0.890	0.990	0.990	1.000	0.990	1.000	0.990	1.000
7	14	0.640	0.900	0.860	0.180	0.060	0.300	1.000	1.000	1.000	0.890	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
12	18	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.030	0.070	0.040	0.100	0.040	0.180	1.000	1.000	0.040	0.180
10	13	0.990	0.620	0.110	0.020	0.110	0.270	0.860	1.000	1.000	1.000	0.880	1.000	1.000	0.880	1.000	1.000	1.000
11	16	0.570	0.280	0.060	0.020	0.090	0.470	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
14	16	0.420	0.590	0.560	0.320	0.170	0.440	1.000	1.000	1.000	0.870	0.420	0.620	1.000	0.420	0.620	1.000	1.000
15	11	0.890	0.690	0.160	0.080	0.150	0.430	0.290	0.450	0.370	0.550	0.460	0.660	1.000	0.460	0.660	1.000	0.660
13	10	1.000	1.000	0.890	0.320	0.470	0.460	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.990	1.000	0.990	1.000	0.990	1.000
17	16	0.480	0.280	0.070	0.050	0.090	0.280	1.000	1.000	1.000	1.000	0.980	0.850	0.660	1.000	1.000	0.850	0.660
18	14	1.000	0.930	0.170	0.100	0.210	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.940	0.990	1.000	1.000	0.940	0.990
16	17	0.940	0.710	0.160	0.110	0.230	0.640	0.960	1.000	1.000	0.990	0.990	0.870	1.000	0.870	1.000	0.870	1.000

Tabelle A.16 – Überrepräsentationsanalyse Tricarbonsäurezyklus (70 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung. (+/-), < 0.05; (++)/(-), < 0.01; (+++/---), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert										Reprimiert									
	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21		
G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	
1	6	1.000	1.000	0.860	0.540	0.790	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.850	1.000	1.000	1.000	0.960	
2	12	0.780	0.790	0.830	1.000	1.000	1.000	0.830	1.000	0.790	1.000	1.000	1.000	1.000	0.980	0.350	0.320	0.820	0.820	
4	13	1.000	1.000	1.000	1.000	0.910	1.000	0.840	1.000	0.840	0.390	0.310	0.910	1.000	0.100	0.310	0.910	1.000	1.000	
5	15	0.980	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.570	1.000	0.860	1.000	1.000	1.000	0.860	0.140	1.000	1.000	
6	13	1.000	1.000	1.000	0.900	0.940	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.340	1.000	1.000	0.500	0.340	0.580	0.990	0.990	
3	16	0.200	0.990	1.000	0.970	0.580	1.000	1.000	0.970	0.100	0.460	0.950	1.000	0.690	0.950	1.000	0.640	1.000	0.640	
9	14	1.000	1.000	0.860	0.920	1.000	1.000	0.700	1.000	1.000	0.700	0.920	1.000	0.690	0.920	1.000	1.000	1.000	1.000	
8	11	0.860	0.710	0.630	0.590	0.600	0.810	0.850	0.980	0.850	0.980	0.990	0.990	0.890	0.990	0.990	1.000	1.000	1.000	
7	14	0.640	0.900	0.860	0.180	0.060	0.300	1.000	1.000	1.000	0.300	1.000	1.000	0.890	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
12	18	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.030	0.070	0.100	0.180	0.040	0.100	0.040	0.180	0.180	0.180	
10	13	0.990	0.620	0.110	0.020	0.110	0.270	0.860	1.000	0.860	1.000	0.880	1.000	1.000	1.000	0.880	1.000	1.000	1.000	
11	16	0.570	0.280	0.060	0.020	0.090	0.470	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
14	16	0.420	0.590	0.560	0.320	0.170	0.440	1.000	1.000	1.000	1.000	0.420	1.000	0.870	0.420	0.620	1.000	1.000	1.000	
15	11	0.890	0.690	0.160	0.080	0.150	0.430	0.290	0.450	0.290	0.450	0.550	0.460	0.370	0.550	0.460	0.660	0.660	0.660	
13	10	1.000	1.000	0.890	0.320	0.470	0.460	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
17	16	0.480	0.280	0.070	0.050	0.090	0.280	1.000	1.000	1.000	1.000	0.980	1.000	1.000	1.000	0.980	0.850	0.660	0.660	
18	14	1.000	0.930	0.170	0.100	0.210	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.940	0.990	0.990	
16	17	0.940	0.710	0.160	0.110	0.230	0.640	0.960	1.000	0.960	1.000	0.990	1.000	0.990	0.990	0.870	1.000	1.000	1.000	

Tabelle A.17 – Überrepräsentationsanalyse Mitochondriale Elektronentransportkette (71 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung: (+/-), < 0.05; (++/-), < 0.01; (+++/-), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert										Reprimiert																
	1		1+7		7		7+21		21		1+7+21		1		1+7		7		7+21		21		1+7+21				
G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p		
1	0	0.700		0.800		1.000		0.900		1.000		1.000		1.000		0.800		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000	
2	2	1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		0.500		1.000		0.900		0.800	
4	0	0.300		1.000		0.700		1.000		1.000		1.000		1.000		0.800		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000	
5	4	1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000	
6	2	1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		0.700		0.800		0.500		0.900		0.800		1.000	
3	1	0.600		1.000		1.000		1.000		0.600		1.000		1.000		1.000		1.000		0.700		1.000		1.000		1.000	
9	1	0.800		1.000		0.600		0.200		0.300		1.000		1.000		0.400		0.800		0.900		1.000		0.900		1.000	
8	4	1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		0.300		0.400		0.800		1.000		1.000		0.600	
7	1	0.800		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		0.600		0.800		0.700		1.000	
12	8	0.300		0.200		0.600		0.500		0.400		0.200		0.900		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		0.800	
10	3	1.000		1.000		1.000		1.000		0.900		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000	
11	3	1.000		1.000		1.000		0.700		0.400		0.900		1.000		0.700		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000	
14	6	0.700		1.000		1.000		1.000		0.900		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		0.400		0.300		1.000	
15	4	1.000		0.900		0.700		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000	
13	6	0.900		1.000		1.000		0.800		1.000		1.000		1.000		0.300		0.400		0.200		0.200		0.200		0.200	
17	3	1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		0.900		0.700	
18	3	1.000		0.900		1.000		0.700		0.900		1.000		1.000		0.600		1.000		1.000		0.700		1.000		1.000	
16	3	1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		0.800		0.400		1.000		1.000		1.000		0.700	

Tabelle A.18 – Überrepräsentationsanalyse **Zellwand** (197 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung. (+/-), < 0.05; (++)/(-), < 0.01; (+++/---), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert						Reprimiert						
	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	
G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p
1	41	0.331	0.447	0.784	0.209	0.153	0.711	0.052	0.112	1.000	0.846	0.340	0.081
2	40	1.000	0.834	0.934	0.794	1.000	1.000	0.002	0.025	0.226	0.264	0.101	0.281
4	31	1.000	1.000	0.692	1.000	0.386	0.986	0.406	0.021	0.315	1.000	0.712	0.410
5	37	1.000	1.000	0.862	1.000	0.598	1.000	0.308	0.998	1.000	0.923	0.236	0.853
6	31	1.000	0.885	0.863	1.000	1.000	0.599	0.104	0.326	0.970	0.712	0.660	0.599
3	30	0.760	1.000	1.000	1.000	1.000	0.759	1.000	0.261	0.385	0.682	0.802	1.000
9	32	1.000	0.998	0.955	1.000	1.000	1.000	0.660	0.986	1.000	0.948	0.744	0.226
8	29	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.986	0.991	1.000	1.000	1.000	0.885	0.979
7	39	0.897	0.480	0.790	0.760	0.594	0.558	0.076	0.655	1.000	0.895	0.938	0.874
12	36	1.000	0.986	0.872	0.986	1.000	1.000	0.370	0.294	0.449	0.689	0.552	0.502
10	31	1.000	0.794	0.936	0.543	0.988	0.569	0.785	0.594	0.985	0.461	0.792	0.672
11	27	0.458	1.000	0.665	1.000	0.729	1.000	0.824	1.000	1.000	1.000	0.828	1.000
14	36	1.000	0.977	0.531	1.000	1.000	1.000	0.041	0.263	0.794	0.646	0.193	0.102
15	48	0.969	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	7e-04	5e-04	2e-05	2e-05	2e-05
13	29	1.000	1.000	0.969	1.000	1.000	1.000	0.734	0.809	1.000	1.000	1.000	0.936
17	52	0.616	0.977	0.963	1.000	0.618	1.000	1e-05	2e-05	0.005	0.016	0.008	6e-05
18	38	0.600	1.000	0.986	1.000	1.000	1.000	0.009	0.135	0.224	0.133	0.004	0.070
16	39	0.230	0.244	0.799	0.842	1.000	0.294	0.516	0.748	0.652	0.524	0.487	0.668

Tabelle A.19 – Überrepräsentationsanalyse Lipid-Metabolismus (338 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung; (+/-), < 0.05; (++/-), < 0.01; (+++/-), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert										Reprimiert									
	G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p
1	46	0.92	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	0.68	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
2	36	0.81	0.60	0.66	0.30	0.12	0.94	0.38	0.55	0.57	0.98	0.94	0.93							
4	41	0.93	1.00	0.93	0.39	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.99	0.74	0.18	0.66						
5	44	0.40	0.26	1.00	1.00	1.00	0.56	0.90	0.81	0.38	0.72	0.38	0.83							
6	35	0.47	0.31	0.09	0.34	0.74	0.30	0.92	0.75	0.62	1.00	0.97	0.39							
3	44	0.81	1.00	1.00	0.86	0.37	1.00	1.00	0.94	0.85	0.84	0.67	0.82							
9	40	1.00	0.99	0.84	1.00	1.00	1.00	0.30	0.52	0.26	0.44	0.27	1.00							
8	40	1.00	1.00	0.87	0.71	0.60	0.85	0.13	0.03	0.11	0.13	0.34	0.03							
7	43	1.00	1.00	0.97	1.00	0.99	1.00	0.60	0.54	0.12	0.31	0.40	0.98							
12	35	0.75	0.61	0.48	0.85	0.95	0.94	0.33	0.50	0.17	0.19	0.08	0.49							
10	53	0.64	0.67	0.67	0.71	0.18	0.93	0.09	0.09	0.33	0.40	0.26	0.38							
11	37	0.65	1.00	1.00	1.00	0.60	1.00	0.65	0.42	0.09	0.49	0.86	0.98							
14	40	0.43	0.44	0.28	1.00	0.90	1.00	1.00	1.00	1.00	0.63	0.46	1.00							
15	45	0.67	1.00	1.00	0.85	0.89	1.00	0.69	0.71	0.85	1.00	1.00	0.85							
13	38	0.25	0.35	0.22	0.74	0.49	0.92	1.00	0.93	0.88	0.97	0.91	0.99							
17	56	0.85	0.89	0.61	0.87	0.64	1.00	0.53	0.55	0.62	0.99	1.00	0.92							
18	46	0.69	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.93	1.00	1.00	1.00	1.00							
16	52	1.00	0.78	1.00	1.00	1.00	1.00	0.69	1.00	1.00	0.76	1.00	0.99							

Tabelle A.20 – Überrepräsentationsanalyse N-Metabolismus (29 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung. (+/-), < 0.05; (++)/(-), < 0.01; (+++/---), < 0.001; p, p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert												Reprimiert											
	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21						
G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p					
1	6	1.000	1.000	0.182	0.105	0.220	1.000	1.000	1.000	0.220	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000					
2	7	0.734	0.390	0.293	0.241	0.335	0.161	1.000	1.000	0.335	0.161	1.000	1.000	1.000	0.993	1.000	1.000	1.000	1.000					
4	5	0.813	1.000	1.000	1.000	0.986	1.000	1.000	1.000	0.986	1.000	1.000	0.816	1.000	0.236	0.070	0.112	1.000	1.000					
5	7	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.949	0.187	0.568	0.616	0.851	0.851					
6	9	0.354	0.186	0.185	0.287	0.424	0.301	0.185	0.287	0.424	0.301	0.558	0.447	0.474	0.986	1.000	0.760	0.760	0.760					
3	12	1.000	1.000	0.010	0.001	0.001	0.001	++	0.001	0.001	0.001	0.838	0.822	0.986	1.000	0.345	1.000	1.000	1.000					
9	5	1.000	0.949	0.837	1.000	1.000	1.000	0.837	1.000	1.000	1.000	0.855	1.000	1.000	0.986	1.000	1.000	1.000	1.000					
8	7	0.650	0.825	1.000	1.000	1.000	0.813	1.000	1.000	0.813	1.000	0.551	0.490	0.490	0.402	0.103	0.442	0.442	0.442					
7	7	1.000	0.986	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.119	0.074	0.232	0.924	0.977	1.000	1.000	1.000					
12	9	1.000	0.788	1.000	0.998	1.000	0.608	1.000	0.998	1.000	0.608	0.062	+	0.006	++	0.006	+	0.011	+	0.014				
10	4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.977	1.000	1.000	0.977	1.000	0.610	0.784	0.784	0.599	0.842	0.390	0.390	0.390					
11	6	1.000	0.872	1.000	0.798	1.000	0.627	1.000	0.798	1.000	0.627	0.538	0.214	0.262	0.923	1.000	1.000	1.000	1.000					
14	8	0.603	0.737	0.637	0.623	0.754	0.815	1.000	0.623	0.754	0.815	1.000	1.000	0.423	0.361	0.449	1.000	1.000	1.000					
15	4	1.000	1.000	1.000	0.986	1.000	0.986	1.000	0.986	1.000	0.986	1.000	0.875	1.000	1.000	0.842	1.000	1.000	1.000					
13	5	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.963	1.000	1.000	0.963	1.000	0.657	0.895	0.895	0.835	0.841	0.818	0.818	0.818					
17	6	0.991	0.727	0.852	1.000	1.000	0.977	1.000	1.000	0.977	1.000	1.000	0.794	0.865	1.000	1.000	0.967	0.967	0.967					
18	7	1.000	1.000	1.000	1.000	0.986	1.000	1.000	1.000	0.986	1.000	0.646	0.516	0.422	0.597	0.738	0.810	0.810	0.810					
16	4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.932	1.000	1.000	0.932	1.000	0.794	0.697	0.863	0.625	0.851	0.567	0.567	0.567					

Tabelle A.21 – Überrepräsentationsanalyse Aminosäure (211 Einträge) G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung. (+/-), < 0.05; (++/-), < 0.01; (+++/---), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert										Reprimiert														
	1		1+7		7		7+21		21		1+7+21		1		1+7		7		7+21		21		1+7+21		
G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p										
1	49		0.140		0.590		0.630		0.410	+	0.030		0.240		0.620		0.980		0.380	+	0.030		0.080		0.720
2	46	+	0.030		0.290		0.230		0.570		0.750		0.390		1.000		0.810		1.000		0.990		0.410		1.000
4	51		0.080		0.070		0.210		0.350		0.420		0.340		0.990		0.500		0.130		0.940		0.320		0.990
5	45		0.060	+	0.030		0.090		0.220		0.430	+	0.040		1.000		0.070		0.610		0.690		0.950		0.210
6	38		0.460		0.200	+	0.040		0.610		0.800		0.460		0.940		1.000		0.600		0.740		0.890		1.000
3	35		0.610		0.440		0.540		0.740		1.000		0.480		1.000		0.980		1.000		0.700		0.520		1.000
9	34		1.000		1.000		0.640		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		0.860		0.960		1.000		0.820
8	31		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		0.810		0.980		0.610
7	34		0.630		0.730		0.800		0.650		0.390		0.780		1.000		1.000		0.820		0.780		0.700		0.900
12	39		0.380		0.620		0.890		1.000		0.950		0.950		1.000		0.250		0.960		1.000		0.990		0.540
10	38		1.000		1.000		1.000		1.000		0.950		1.000		0.110		0.720		0.620		0.490		0.120		0.690
11	36		0.780		1.000		0.370		0.980		0.850		1.000		1.000		0.240		1.000		0.540		0.090		0.540
14	36		0.950		1.000		1.000		1.000		0.690		1.000		1.000		0.920		1.000		0.980		1.000		0.850
15	33		0.740		0.310		0.200		0.130		0.320		0.340		0.400		0.490		0.660		0.600		0.500		0.390
13	35		1.000		1.000		0.750		0.510		0.380		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000
17	37		0.730		0.590		1.000		0.940		1.000		0.300		0.990		0.920		0.540		0.580		0.540		0.460
18	40		0.960		1.000		0.750		0.120	+	0.050		0.200		0.710		0.470		0.240		0.700		1.000		1.000
16	43		0.790		0.650		0.300		0.290		0.360		0.650		0.630		0.870		1.000		1.000		1.000		1.000

Tabelle A.22 – Überrepräsentationsanalyse S-Metabolismus (6 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung. (+/-), < 0.05; (++)/(-), < 0.01; (+++)/(-), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert						Reprimiert						
	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	
G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p
1	3	0.510	1.000	1.000	1.000	0.630	1.000	1.000	1.000	0.700	0.560	0.220	1.000
2	3	0.600	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.650	0.460	0.110	1.000
4	4	0.650	1.000	1.000	1.000	1.000	0.210	0.370	0.500	1.000	1.000	0.540	1.000
5	2	0.670	0.430	0.590	1.000	1.000	0.720	1.000	1.000	1.000	1.000	0.700	1.000
6	3	0.130	0.080	0.250	1.000	1.000	0.500	0.440	0.770	0.540	0.600	0.350	1.000
3	3	0.690	1.000	1.000	1.000	1.000	0.250	0.390	0.540	1.000	1.000	1.000	1.000
9	1	0.600	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
8	3	0.730	0.710	0.790	0.730	0.740	0.660	0.670	0.770	0.730	0.730	0.280	0.620
7	2	0.630	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.520	1.000
12	3	0.700	0.620	0.740	1.000	1.000	1.000	0.600	0.240	0.170	0.200	0.470	1.000
10	4	0.720	0.620	0.690	0.580	0.690	0.520	0.530	0.620	0.520	0.520	0.400	1.000
11	1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.660	0.460	0.670	1.000	1.000
14	2	0.220	0.600	0.710	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
15	1	0.760	0.690	0.740	0.550	0.600	0.490	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
13	0	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
17	2	0.640	0.600	0.750	0.670	0.720	0.520	0.630	0.770	1.000	1.000	1.000	1.000
18	2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.190	0.260	0.520	0.600	0.380	1.000
16	2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.140	0.280	0.230	0.260	0.090	1.000

Tabelle A.23 – Überrepräsentationsanalyse **Metalloproteine** (32 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung. (+/-), < 0.05; (++/-), < 0.01; (+++/---), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert										Reprimiert									
	G	n	+/-	p	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21					
1	8	0.286	0.467	0.099	+	0.010	+	0.038	0.274	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000					
2	12	0.006	0.148	0.623	0.984	0.712	0.622	0.479	0.382	0.569	1.000	0.986	1.000							
4	12	0.297	1.000	0.986	1.000	0.138	1.000	0.639	1.000	0.979	0.767	0.354	1.000							
5	7	0.355	0.909	0.437	0.889	1.000	1.000	1.000	1.000	0.991	1.000	0.653	1.000							
6	8	0.406	0.535	1.000	1.000	1.000	0.792	0.274	0.489	0.676	1.000	0.785	0.792							
3	8	0.393	0.151	0.387	1.000	0.926	1.000	0.862	0.853	1.000	0.827	1.000								
9	10	0.217	0.260	0.107	+	0.013	+	0.024	0.109	0.988	1.000	0.837	1.000	1.000						
8	7	0.245	0.212	0.176	0.108	0.119	0.138	0.653	0.822	1.000	1.000	1.000	0.991							
7	11	0.998	1.000	0.859	0.955	0.655	1.000	0.149	0.265	0.138	0.951	0.986	1.000							
12	11	0.405	0.524	0.484	0.590	0.402	0.654	0.416	0.211	0.095	0.255	0.325	0.551							
10	6	0.238	0.251	0.181	0.186	0.181	0.306	0.655	0.986	0.814	0.986	0.659	1.000							
11	10	0.449	0.184	0.389	0.121	0.374	0.210	0.599	0.572	0.315	0.950	0.616	1.000							
14	7	1.000	1.000	1.000	1.000	0.804	0.846	0.414	0.998	0.870	1.000	1.000	1.000							
15	10	0.143	0.394	0.495	0.147	+	0.024	0.690	0.461	0.669	0.630	0.865	0.571							
13	7	0.853	1.000	0.301	0.090	+	0.041	1.000	1.000	0.924	1.000	1.000	1.000							
17	7	0.557	0.456	0.275	0.168	0.235	0.310	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.986							
18	8	0.422	1.000	1.000	0.977	0.393	0.791	0.852	0.572	0.490	0.638	0.791	0.838							
16	7	0.792	1.000	0.509	0.375	0.258	0.955	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000							

Tabelle A.24 – Überrepräsentationsanalyse Sekundär-Metabolismus (168 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung. (+/-), < 0.05; (++)/-, < 0.01; (+++/---), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert										Reprimiert									
	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21		
G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	
1	38	0.494	0.514	0.645	1.000	0.970	1.000	1.000	1.000	0.452	0.372	1.000	0.452	0.372	1.000	0.452	0.372	1.000	0.283	
2	35	0.082	0.214	0.511	0.484	0.081	0.261	0.251	0.940	1.000	1.000	0.940	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
4	38	0.384	0.141	0.056	0.421	0.660	0.561	0.704	0.755	0.619	0.693	0.755	0.619	0.693	0.664	0.664	0.664	1.000	1.000	
5	39	0.151	0.376	0.216	0.145	0.140	0.856	0.465	0.871	1.000	0.633	0.871	1.000	0.633	0.369	0.369	0.369	0.484	0.484	
6	48	0.009	0.002	6e-04	0.003	0.006	0.044	1.000	1.000	0.301	1.000	1.000	0.301	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
3	40	0.012	0.022	0.081	0.262	0.202	0.145	0.835	0.952	1.000	0.425	0.835	1.000	0.425	0.583	0.583	0.425	0.583	0.490	
9	34	0.247	0.242	0.156	0.112	0.049	0.564	1.000	0.497	1.000	1.000	0.497	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
8	36	0.986	0.917	0.542	0.655	0.749	0.885	0.178	0.198	0.457	0.401	0.198	0.457	0.401	0.287	0.287	0.401	0.287	0.135	
7	41	0.108	0.099	0.112	0.042	0.065	0.070	0.675	0.612	0.283	0.151	0.612	0.283	0.151	0.391	0.391	0.151	0.391	1.000	
12	29	0.231	0.751	1.000	1.000	0.365	0.645	1.000	0.610	1.000	1.000	0.610	1.000	1.000	0.888	0.888	1.000	0.888	0.986	
10	32	0.479	0.541	0.214	0.209	0.063	0.521	1.000	0.997	1.000	0.641	1.000	0.997	1.000	0.641	0.641	0.641	0.494	1.000	
11	27	0.074	0.042	0.442	0.151	0.118	0.057	0.888	0.986	1.000	0.417	0.888	1.000	0.417	1.000	1.000	0.417	1.000	1.000	
14	44	0.128	0.085	0.010	0.008	0.014	0.180	0.720	0.451	0.129	0.201	0.451	0.129	0.201	0.345	0.345	0.201	0.345	0.641	
15	37	1.000	1.000	0.583	0.180	0.404	1.000	0.385	0.154	0.075	0.036	0.154	0.075	0.036	0.121	0.121	0.036	0.121	0.087	
13	46	0.081	0.055	0.014	0.007	0.020	0.039	0.446	0.527	0.266	0.253	0.527	0.266	0.253	0.209	0.209	0.253	0.209	0.611	
17	43	0.469	0.400	0.098	0.109	0.151	0.528	0.256	0.274	0.242	0.073	0.274	0.242	0.073	0.070	0.070	0.073	0.070	0.081	
18	45	0.986	0.250	0.049	0.006	0.036	0.098	0.054	0.015	0.003	0.002	0.015	0.003	0.002	0.011	0.011	0.002	0.011	0.004	
16	43	0.088	0.030	0.016	0.116	0.212	0.216	0.970	1.000	0.442	0.243	0.970	1.000	0.442	0.243	0.243	0.442	0.243	0.889	

Tabelle A.25 – Überrepräsentationsanalyse Hormon-Metabolismus (230 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung; (+/-), < 0.05; (++)/(-), < 0.01; (+++/+/-), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert										Reprimiert																			
	1		1+7		7		7+21		21		1+7+21		1		1+7		7		7+21		21		1+7+21							
G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p													
1	34	1.000	1.000	1.000	0.737	p	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.212	p	0.194	p	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.262	p				
2	43	0.217	0.096	0.256	1.000	1.000	0.663	1.000	1.000	0.403	0.594	0.318	0.352	0.180	0.098	0.505	0.556	0.253	0.552	1.000	1.000	0.986	0.986	0.703	0.385	0.297	0.459	0.970	0.970	0.098
4	42	0.505	0.902	1.000	0.976	1.000	0.993	0.998	0.998	0.598	0.214	0.100	0.116	0.034	0.998	1.000	0.986	0.986	1.000	0.993	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998
5	34	0.998	1.000	0.986	0.822	0.373	0.807	0.263	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
6	40	0.586	1.000	0.986	0.822	0.373	0.807	0.263	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
3	43	1.000	0.986	0.382	0.986	1.000	0.977	1.000	0.977	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
9	33	0.986	1.000	0.443	0.523	0.457	0.441	0.332	0.216	0.209	0.620	1.000	0.961	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
8	34	1.000	0.443	0.523	0.457	0.441	0.332	0.216	0.209	0.620	1.000	0.961	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
7	37	1.000	0.986	0.754	0.436	0.562	0.740	1.000	0.535	0.895	1.000	0.948	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
12	35	1.000	0.897	0.112	0.268	0.890	0.874	0.523	0.738	0.963	0.986	1.000	0.824	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
10	31	0.897	0.112	0.268	0.890	0.874	0.523	0.738	0.963	0.986	1.000	0.824	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
11	26	0.986	0.635	0.715	0.984	0.777	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
14	47	0.796	1.000	0.970	0.862	1.000	1.000	1.000	0.090	0.090	0.146	0.315	0.306	0.099	0.773	0.880	1.000	1.000	0.568	0.356	0.382	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
15	37	0.773	0.880	1.000	0.568	0.356	0.382	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
13	40	1.000	0.318	1.000	0.834	1.000	0.834	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
17	48	0.937	1.000	0.611	0.792	0.819	1.000	1.000	0.785	0.986	0.986	0.609	0.237	0.393	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
18	55	1.000	1.000	0.309	0.942	0.780	0.349	0.075	0.598	0.328	+	0.034	++	0.002	0.133	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
16	48	0.986	0.977	0.610	0.552	0.533	0.933	0.986	0.600	0.250	0.066	0.187	0.221																	

Tabelle A.26 – Überrepräsentationsanalyse Co-Faktor und Vitamin-Metabolismus (26 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung. (+/-), < 0.05; (++)/(-), < 0.01; (+++/---), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

		Induziert										Reprimiert										
Tag	G	n	+/-	p	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	
			+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p
1	0		1.000		1.000	0.800	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.800	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.800	1.000	1.000	0.800	1.000
2	2		1.000		1.000	0.800	1.000	1.000	1.000	0.700	0.800	1.000	0.900	1.000	1.000	0.700	0.800	1.000	0.900	1.000	1.000	0.500
4	3		1.000		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
5	3		0.800		1.000	0.700	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.800	1.000
6	5		1.000		1.000	0.600	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
3	4		0.800		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.600	0.800	0.600	1.000	1.000	0.600	0.600	0.800	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
9	3		1.000		1.000	1.000	0.600	0.600	1.000	1.000	1.000	0.800	1.000	0.700	1.000	1.000	1.000	0.800	1.000	1.000	1.000	1.000
8	3		1.000		1.000	1.000	1.000	1.000	0.800	0.800	1.000	1.000	1.000	1.000	0.800	0.800	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
7	3		1.000		1.000	0.600	0.500	0.600	0.700	1.000	1.000	0.600	1.000	0.600	1.000	1.000	1.000	0.600	1.000	1.000	1.000	1.000
12	2		0.800		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
10	5		0.600		0.400	0.500	0.300	0.100	0.200	0.800	0.800	0.500	0.300	0.100	0.200	0.800	0.800	0.500	0.300	0.100	0.800	1.000
11	2		1.000		0.800	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
14	7		0.300		0.400	0.300	0.600	0.100	0.800	1.000	1.000	0.300	0.600	0.100	0.800	1.000	1.000	0.300	0.600	0.100	1.000	1.000
15	3		1.000		1.000	1.000	0.600	0.700	0.500	1.000	1.000	1.000	0.600	0.700	0.500	1.000	1.000	1.000	0.600	0.700	0.500	1.000
13	6		0.100		0.200	0.400	0.700	0.400	0.500	1.000	1.000	0.400	0.700	0.400	0.500	1.000	1.000	0.400	0.700	0.400	1.000	1.000
17	6		0.800		0.700	0.600	0.500	0.600	0.500	0.800	0.800	0.600	0.500	0.600	0.500	0.800	0.800	0.600	0.500	0.600	0.800	0.900
18	6		1.000		0.600	0.200	0.500	0.600	0.700	1.000	1.000	0.200	0.500	0.600	0.700	1.000	1.000	0.200	0.500	0.600	1.000	1.000
16	3		1.000		1.000	1.000	1.000	0.600	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.600	1.000	1.000	1.000	0.600	1.000	1.000	0.800	1.000

Tabelle A.27 – Überrepräsentationsanalyse **Tetrapyrrol-Biosynthese** (28 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung; (+/-), < 0.05; (++)/(-), < 0.01; (+++/----), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert										Reprimiert											
	G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	7+21	21	1+7+21	1	+/-	p	+/-	p	1+7	7	7+21	21
1	6	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.984	1.000	1.000	1.000	0.984	1.000	1.000	0.443	0.319	0.138	0.656	1.000	0.676			
2	7	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.951	1.000	1.000	1.000	0.986	1.000	1.000	0.986	1.000	0.090	0.177	0.275	1.000			
4	4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.615	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000			
5	6	1.000	0.863	1.000	1.000	0.849	0.755	0.672	0.621	1.000	0.621	1.000	1.000	0.621	1.000	1.000	0.955	0.598	1.000			
6	7	0.986	1.000	1.000	0.635	0.603	0.732	1.000	0.543	0.432	0.451	0.289	0.387	0.288	0.288	0.288	0.289	0.387	0.288			
3	8	1.000	1.000	1.000	0.649	0.689	0.447	1.000	1.000	1.000	0.610	0.214	0.332	1.000	1.000	0.332	1.000	1.000	1.000			
9	5	0.986	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.986	1.000	1.000	0.310	0.105	0.136	1.000	1.000	0.136	1.000	1.000	1.000			
8	5	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.860	0.832	0.851	1.000	1.000	0.851	1.000	1.000	1.000			
7	5	1.000	0.984	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.848	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000			
12	4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.977	1.000	1.000	0.621	0.441	0.520	0.916	0.916	0.916	0.916	0.916	0.916			
10	4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.969	1.000	1.000	1.000	0.975	0.835	1.000	1.000	0.835	1.000	1.000	1.000			
11	3	0.703	0.862	1.000	1.000	1.000	1.000	0.635	1.000	1.000	0.813	1.000	0.813	1.000	1.000	0.813	1.000	1.000	1.000			
14	9	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.985	0.737	0.807	0.147	0.076	0.027	0.669	0.755	0.824	0.824	0.824	0.824	0.824			
15	3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.986	1.000	0.941	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000			
13	9	1.000	1.000	1.000	1.000	0.738	0.792	0.551	0.232	0.224	0.052	0.641	0.834	1.000	1.000	0.834	1.000	1.000	1.000			
17	9	0.991	0.986	0.650	0.813	0.827	1.000	1.000	0.002	0.005	0.012	0.106	0.149	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075			
18	8	1.000	0.986	1.000	0.947	1.000	0.746	1.000	0.160	0.091	0.026	0.252	0.393	0.797	0.797	0.797	0.797	0.797	0.797			
16	10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.835	1.000	1.000	0.075	0.139	0.099	0.149	0.231	0.231	0.231	0.231	0.231			

Tabelle A.28 – Überrepräsentationsanalyse Redox-Metabolismus (127 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung. (+/-), < 0.05; (++)/-, < 0.01; (+++/-), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert												Reprimiert												
	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21							
G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p		
1	20		0.542		0.744		1.000		0.986		0.683		1.000		0.941		1.000		0.961		1.000		1.000		0.821
2	21		0.774		1.000		1.000		0.664		0.738		0.986		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		0.986
4	31	+	0.020		0.130		0.275		0.107		0.079	++	0.008		0.412		0.866		1.000		1.000		1.000		0.532
5	22		0.162		0.265		0.755		0.737		0.168		0.276		1.000		0.660		0.303		0.261		1.000		0.548
6	31		0.616		0.615	+	0.033	+	0.014		0.066		0.219		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000
3	24		0.131		0.373		1.000		1.000		0.788		0.952		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000
9	25		0.138	+	0.031	++	0.008	+	0.020		0.055	+	0.049		1.000		0.552		0.092		0.457		0.374		1.000
8	21		0.221		0.147		0.283		0.467		0.571		0.203		1.000		1.000		0.798		0.564		0.410		1.000
7	24		0.248		0.446		0.216		0.112		0.065		0.621		0.860		0.977		0.680		0.332		0.555		0.991
12	28	++	0.008	+	0.011	++	0.005	++	0.002	++	0.001	++	0.004		0.644		1.000		0.860		0.794		0.600		1.000
10	27		0.656		0.322		0.179		0.179		0.180		0.401		0.770		0.853		0.794		0.984		0.873		1.000
11	24		0.051		0.569		1.000		1.000		0.337		0.748		0.704		1.000		1.000		0.955		0.719		0.798
14	30		0.190		0.059		0.152	+	0.036		0.149	++	0.009		0.258		0.247		0.387		0.883		0.917		0.369
15	29		0.323		0.330		0.574		0.219		0.135		0.072		0.609		0.658		0.492		0.405		0.381		0.466
13	26		0.974		0.955		0.500		0.306		0.253		0.823		0.693		0.795		0.986		0.977		0.871		0.841
17	32		0.810		0.991		0.308		0.165		0.112		0.850		0.394		0.246		0.151		0.070		0.144		0.091
18	24		1.000		0.986		1.000		0.516		0.242		0.420		0.558		0.467		0.386		0.680		0.779		0.535
16	33		0.140		0.863		1.000		1.000		0.569		0.961		0.246		0.077	+	0.024	+	0.025		0.062		0.088

Tabelle A.29 – Überrepräsentationsanalyse **Stress** (322 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung. (+/-), < 0.05; (++/-), < 0.01; (+++/---), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert										Reprimiert																	
	1		1+7		7		7+21		21		1+7+21		1		1+7		7		7+21		21		1+7+21					
G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p													
1	19	+	0.041	0.232	+	0.017	0.427	0.018	+++	2e-04	0.426	0.852	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000				
2	29	++	0.002	0.039	++	0.008	0.427	0.105	0.138	1.000	0.792	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.933				
4	26	0.097	0.066	+++	7e-04	++	0.002	++	0.002	0.573	0.525	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.838			
5	26	0.189	0.091	0.212	0.714	1.000	0.390	0.681	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.810	0.603		
6	22	0.061	0.019	0.106	0.057	+++	9e-05	+	0.018	1.000	0.337	0.565	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.963		
3	26	0.294	0.592	+	0.039	++	0.001	+++	5e-07	0.469	0.963	0.712	0.871	0.749	0.695	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.794		
9	19	0.414	0.326	0.098	0.218	0.336	0.298	0.166	0.423	0.570	0.246	0.514	0.426	0.973	0.973	0.973	0.973	0.973	0.973	0.973	0.973	0.973	0.973	0.973	0.973	0.973	0.973	
8	34	+	0.043	0.058	0.239	0.479	0.193	0.222	0.937	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.258	
7	33	+++	7e-04	0.058	0.058	0.081	0.112	0.190	0.609	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.871	
12	30	0.090	0.171	0.015	0.014	++	0.004	+++	8e-04	++	0.001	1.000	0.734	0.446	0.242	0.580	0.265	0.265	0.265	0.265	0.265	0.265	0.265	0.265	0.265	0.265	0.265	0.265
10	37	++	0.007	0.252	0.137	0.099	++	0.010	0.450	1.000	0.979	0.627	0.777	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.265	
11	25	+	0.020	0.413	+	0.049	0.154	0.068	0.928	0.609	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.660	
14	33	+	0.016	0.736	0.254	0.128	0.181	0.603	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
15	27	0.658	0.045	+++	8e-04	++	0.002	++	0.002	0.117	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
13	44	+++	3e-05	0.339	+	0.022	+	0.044	+	0.017	0.821	0.646	0.531	0.609	0.853	0.986	0.808	0.808	0.808	0.808	0.808	0.808	0.808	0.808	0.808	0.808	0.808	0.808
17	22	0.342	0.226	+	0.029	0.512	0.186	1.000	0.620	0.551	0.348	0.722	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.808	
18	46	+++	2e-06	0.054	+++	3e-04	++	0.003	++	0.002	0.230	1.000	0.864	0.546	0.423	0.532	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807
16	22	0.146	0.054	+++	3e-04	++	0.003	++	0.002	0.230	1.000	0.864	0.546	0.423	0.532	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807	0.807

Tabelle A.30 – Überrepräsentationsanalyse **Polyamin-Metabolismus** (18 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung. (+/-), < 0.05; (++) < 0.01; (+++/-), < 0.001; p, p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

		Induziert												Reprimiert											
Tag		1		1+7		7		7+21		21		1+7+21		1		1+7		7		7+21		21		1+7+21	
G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p
1	3	0.109	0.060		0.374	0.135	0.237	+	0.021	1.000	1.000	1.000	0.986	1.000	1.000	1.000	0.986	1.000	1.000	1.000	0.986	1.000	1.000	1.000	
2	4	0.197	0.051		0.298	0.106	0.156	++	0.010	0.941	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
4	7	0.977	0.647		0.121	+	0.017	0.138	0.345	0.112	+	0.037	0.103	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
5	4	1.000	0.729		0.183	0.251	0.546		0.553	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
6	6	0.464	0.762		0.707	0.406	0.060		0.620	0.813	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
3	5	0.663	0.690		0.449	0.140	0.280		0.401	0.719	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
9	5	0.201	0.342		0.154	0.146	0.056		0.192	1.000	1.000	1.000	0.986	1.000	1.000	1.000	0.986	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
8	7	+	0.013	++	0.009	+	0.023	+	0.014	++	0.005	1.000	1.000	1.000	1.000	0.986	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.950	
7	6	0.241	0.135	+	0.049	+	0.017	+	0.030	+	0.025	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.774	1.000	0.834	1.000	1.000	
12	4	0.671	0.555		0.165	0.092	0.128		0.398	0.986	1.000	1.000	0.986	1.000	1.000	1.000	0.986	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
10	6	0.712	0.551		0.117	+	0.049		0.385	0.706	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
11	4	0.498	0.265		0.121	0.655	0.872		0.502	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
14	4	0.328	0.201		0.358	0.136	0.212	+	0.046	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.966	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
15	9	0.064	+	0.036	+	0.015	+++	8e-04	++	0.002	++	0.003	0.467	0.383	0.428	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.978	
13	6	+	0.047	+	0.066	0.213	0.246		0.107	0.987	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.986	
17	6	0.253	0.194		0.058	+	0.030	+	0.048	0.986	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
18	8	++	0.009	++	0.007	++	0.006	+	0.021	++	0.008	++	0.003	1.000	1.000	1.000	0.986	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
16	7	+	0.013	++	0.007	0.058	+	0.033	0.054	++	0.002	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.779	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.747	

Tabelle A.31 – Überrepräsentationsanalyse Nukleotid-Metabolismus (91 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung; (+/-), < 0.05; (++)/(-), < 0.01; (+++/----), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert										Reprimiert													
	G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21		
1	14	0.930	1.000	0.540	0.790	0.450	0.990	0.860	1.000	0.860	1.000	0.210	0.470	0.770	1.000									
2	11	1.000	1.000	0.370	0.550	0.790	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.990	0.890	1.000	0.910									
4	11	0.460	1.000	0.940	0.990	0.790	1.000	0.630	0.820	0.630	0.820	0.400	0.760	0.950	1.000									
5	13	0.630	0.660	0.660	1.000	0.850	0.990	1.000	1.000	1.000	1.000	0.270	0.230	0.780	1.000									
6	12	0.340	0.680	0.790	0.790	0.550	0.990	0.730	0.860	0.730	0.860	1.000	1.000	0.540	0.800									
3	13	0.900	0.830	0.790	0.990	0.670	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.320	0.340	0.290	0.720									
9	15	1.000	1.000	1.000	1.000	0.980	1.000	0.670	1.000	0.670	1.000	0.390	0.950	0.980	1.000									
8	20	0.790	0.790	1.000	1.000	0.940	0.740	0.140	0.070	0.140	0.070	0.070	0.030	0.060	0.030									
7	14	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.990	0.950	0.720	0.950	0.720	1.000	0.690	0.760	0.640									
12	13	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.900	0.980	0.900	0.980	1.000	0.990	0.870	1.000									
10	15	0.790	0.560	0.630	1.000	1.000	0.940	0.920	0.290	0.920	0.290	0.140	0.140	0.560	0.370									
11	17	1.000	1.000	0.900	1.000	0.960	0.980	0.990	0.920	0.990	0.920	0.160	0.310	1.000	0.990									
14	17	1.000	0.980	1.000	1.000	1.000	0.820	1.000	1.000	1.000	1.000	0.800	0.490	0.430	1.000									
15	13	0.600	0.640	0.680	1.000	1.000	0.930	1.000	0.920	1.000	0.920	0.590	0.500	0.800	0.860									
13	10	1.000	0.990	0.940	1.000	1.000	1.000	0.820	0.940	0.820	0.940	0.960	0.790	0.680	0.630									
17	20	1.000	1.000	1.000	0.990	1.000	1.000	0.890	0.710	0.890	0.710	0.060	0.030	0.090	0.550									
18	12	0.230	0.330	0.740	0.930	1.000	0.990	1.000	0.990	1.000	0.990	0.800	0.260	0.670	0.580									
16	20	0.980	1.000	0.940	1.000	1.000	1.000	0.710	0.500	0.710	0.500	0.100	0.030	0.040	0.230									

Tabelle A.32 – Überrepräsentationsanalyse “Biodegradation of Xenobiotics” (15 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung. (+/-), < 0.05; (+++/-), < 0.01; (+++/---), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert												Reprimiert											
	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21						
G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p					
1	0	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000					
2	0	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000					
4	3	0.900	1.000	0.800	1.000	1.000	1.000	0.800	1.000	0.800	0.500	1.000	1.000	1.000	0.800	1.000	0.800	1.000	1.000					
5	1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000					
6	0	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000					
3	1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000					
9	1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.800	1.000	1.000					
8	1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000					
7	0	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000					
12	0	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000					
10	0	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000					
11	2	0.900	1.000	1.000	1.000	1.000	0.400	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000					
14	1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.800	0.900	1.000					
15	1	1.000	1.000	1.000	0.800	0.900	1.000	1.000	0.700	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000					
13	1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000					
17	0	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000					
18	0	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000					
16	0	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000					

Tabelle A.34 – Überrepräsentationsanalyse Sonstige (545 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung. (+/-), < 0.05; (++)/(-), < 0.01; (+++/---), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert										Reprimiert																	
	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21										
G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p									
1	78	1.000	1.000	1.000	0.654	0.271	0.518	0.538	0.891	0.599	0.496	1.000	0.086	1.000	1.000	0.975	0.567	1.000	0.838	0.618	0.470	0.977	0.265	1.000	1.000	0.707		
2	83	0.975	0.567	1.000	0.838	0.618	0.470	0.977	0.265	1.000	0.354	0.350	0.226	0.226	0.711	0.607	0.853	0.812	0.342	0.934	0.387	0.794	1.000	1.000	0.988	1.000	1.000	
4	98	0.711	0.607	0.853	0.812	0.342	0.934	0.387	0.794	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.470	0.949	0.775	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
5	83	0.470	0.949	0.775	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.237	0.276	0.531	0.196	0.039	0.382	0.154	0.061	0.658	0.352	0.656	0.400	0.040	
6	102	0.237	0.276	0.531	0.196	0.039	0.382	0.154	0.061	0.658	0.352	0.656	0.400	0.040	0.446	0.831	0.618	0.047	2e-06	0.141	0.977	0.548	0.941	0.463	0.427	0.311	0.311	
3	104	0.446	0.831	0.618	0.047	2e-06	0.141	0.977	0.548	0.941	0.463	0.427	0.311	0.311	1.000	0.977	1.000	0.300	0.233	0.599	1.000	0.849	0.857	1.000	0.991	0.823	0.823	
9	89	1.000	0.977	1.000	0.300	0.233	0.599	1.000	0.849	0.857	1.000	0.991	0.823	0.823	0.627	0.561	0.496	0.273	0.284	0.306	0.555	0.620	0.621	1.000	0.949	1.000	1.000	
8	103	0.627	0.561	0.496	0.273	0.284	0.306	0.555	0.620	0.621	1.000	0.949	1.000	1.000	0.755	0.592	0.827	0.890	0.579	0.534	0.541	0.673	0.696	0.723	0.852	0.557	0.557	
7	89	0.755	0.592	0.827	0.890	0.579	0.534	0.541	0.673	0.696	0.723	0.852	0.557	0.557	0.453	0.575	1.000	1.000	1.000	0.792	1.000	0.973	1.000	1.000	1.000	1.000	0.727	0.727
12	78	0.453	0.575	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.670	1.000	1.000	0.457	0.124	0.630	1.000	0.448	1.000	0.853	0.190	1.000	1.000	
10	86	0.670	1.000	1.000	0.457	0.124	0.630	1.000	0.448	1.000	0.853	0.190	1.000	1.000	1.000	0.856	1.000	0.898	0.548	1.000	1.000	0.976	1.000	1.000	0.621	1.000	1.000	
11	83	1.000	0.856	1.000	0.898	0.548	1.000	1.000	0.976	1.000	1.000	0.621	1.000	1.000	1.000	0.998	0.991	0.529	0.553	0.459	0.924	0.870	0.637	0.630	0.565	0.744	0.744	
14	96	1.000	0.998	0.991	0.529	0.553	0.459	0.924	0.870	0.637	0.630	0.565	0.744	0.744	0.654	0.645	0.409	0.071	0.070	0.142	0.538	0.210	0.181	0.382	0.788	0.441	0.441	
15	106	0.654	0.645	0.409	0.071	0.070	0.142	0.538	0.210	0.181	0.382	0.788	0.441	0.441	0.619	0.630	0.523	0.079	0.033	0.076	0.951	0.950	0.822	1.000	1.000	0.986	0.986	
13	101	0.619	0.630	0.523	0.079	0.033	0.076	0.951	0.950	0.822	1.000	0.986	0.986	0.986	0.046	0.014	0.019	0.013	0.018	0.002	0.015	0.014	0.054	0.211	0.138	0.129	0.129	
17	123	0.046	0.014	0.019	0.013	0.018	0.002	0.015	0.014	0.054	0.211	0.138	0.129	0.129	0.973	0.813	0.620	0.538	0.436	0.224	0.383	0.442	0.835	0.853	0.790	0.444	0.444	
18	99	0.973	0.813	0.620	0.538	0.436	0.224	0.383	0.442	0.835	0.853	0.790	0.444	0.444	0.008	0.003	0.002	0.018	0.026	0.013	0.752	0.699	0.902	0.863	0.984	0.616	0.616	
16	113	0.008	0.003	0.002	0.018	0.026	0.013	0.752	0.699	0.902	0.863	0.984	0.616	0.616	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Tabelle A.35 – Überrepräsentationsanalyse RNA (1146 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung. (+/-), < 0.05; (+/+/-), < 0.01; (+++/+/-), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert										Reprimiert												
	1		1+7		7		7+21		21		1+7+21		1		1+7		7		7+21		21		1+7+21
G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p								
1	136	--	0.003	-	0.024	-	0.015	-	0.019	---	8e-04	0.153	1.000	1.000	1.000	0.191	0.332	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
2	150	-	0.030	0.525	0.480	0.156	-	0.014	0.281	0.808	1.000	0.986	0.393	0.374	1.000	0.294	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
4	144	0.412	0.209	-	0.046	0.258	0.095	0.785	0.052	0.341	0.467	0.294	1.000	1.000	0.963	0.941	0.863	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
5	171	1.000	0.306	0.441	-	0.016	0.337	0.057	1.000	0.551	0.746	1.000	0.564	1.000	0.259	0.365	0.352	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
6	170	0.919	0.393	0.341	0.579	0.410	0.594	0.785	1.000	0.337	0.203	0.654	0.986	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
3	161	0.677	0.258	0.408	0.986	0.987	0.796	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
9	164	0.665	0.637	0.770	1.000	0.998	1.000	0.721	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
8	181	0.998	0.792	0.934	0.057	-	0.033	0.179	0.524	0.546	0.576	1.000	0.782	0.576	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
7	161	0.620	0.157	0.053	0.090	0.283	0.162	0.767	0.976	1.000	1.000	0.837	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
12	162	0.260	0.248	0.100	0.112	0.603	0.303	0.932	0.979	0.418	1.000	0.993	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
10	179	0.816	0.933	0.794	0.810	0.220	0.838	0.539	0.737	1.000	0.834	0.993	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
11	158	0.882	0.543	0.329	1.000	0.895	1.000	0.447	0.501	0.142	0.066	--	0.007	0.181	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
14	163	1.000	0.212	0.079	-	0.018	--	0.007	0.070	0.749	0.817	0.803	0.703	0.613	0.759	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
15	165	0.961	1.000	0.541	0.126	0.066	0.669	0.621	0.579	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
13	152	0.405	0.577	0.986	0.941	0.669	0.671	0.621	0.579	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
17	166	0.481	0.986	0.437	0.089	0.051	0.254	0.494	0.562	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
18	149	0.100	0.108	0.201	0.359	0.191	0.149	0.285	0.352	1.000	0.921	0.986	0.762	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
16	154	0.100	0.108	0.201	0.359	0.191	0.149	0.285	0.352	1.000	0.921	0.986	0.762	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Tabelle A.36 – Überrepräsentationsanalyse DNA (337 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung; (+/-), < 0.05; (++/-), < 0.01; (+++/---), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert												Reprimiert											
	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21						
G	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p		
1	73	0.179	0.525	-	0.002	-	0.009	-	0.002	0.212	0.863	1.000	+++	6e-13	+	0.036	0.058	1.000	+++	1e-06	0.729	1.000		
2	56	0.095	0.384	-	0.028	0.538	1.000	1.000	0.536	1.000	1.000	+++	0.014	+++	3e-05	+++	1e-06	1.000	+++	1e-10	0.465	1.000		
4	47	0.109	0.242	0.399	0.267	0.669	0.824	0.663	0.203	0.203	+++	8e-10	+++	<2e-16	+++	<2e-16	+++	<2e-16	+++	7e-11	1.000	0.816		
5	90	0.248	0.258	0.143	0.124	0.222	0.590	0.590	0.637	0.637	0.719	1.000	+++	1e-09	+++	2e-12	+++	2e-12	+++	0.980	0.552	0.816		
6	80	0.467	0.778	0.770	1.000	0.212	0.212	0.212	0.671	0.671	+	0.050	++	0.002	++	0.002	0.980	<2e-16	+++	<2e-16	+++	7e-07		
3	57	0.551	0.386	-	0.049	0.212	0.288	0.196	0.308	0.308	0.155	++	0.005	+++	<2e-16	+++	<2e-16	+++	<2e-16	+++	2e-12	0.082		
9	104	8e-04	-	0.027	0.149	0.288	0.410	0.367	0.180	0.180	0.134	+++	0.100	+++	4e-12	+++	5e-13	+++	5e-13	+++	0.562	0.170		
8	85	0.080	0.085	0.201	0.461	0.494	0.404	0.404	0.162	0.162	+++	4e-06	+++	1e-07	+++	0.393	0.562	0.562	0.562	0.562	0.562	0.170		
7	62	-	0.016	0.093	0.461	0.494	0.404	0.404	0.162	0.162	+++	4e-06	+++	1e-07	+++	0.393	0.562	0.562	0.562	0.562	0.562	0.170		
12	103	0.267	0.609	0.475	0.710	0.375	0.748	0.375	0.748	0.748	++	0.002	++	0.008	+++	<2e-16	+++	<2e-16	+++	<2e-16	+++	6e-05		
10	51	-	0.049	0.187	0.144	-	0.030	-	0.017	0.146	1.000	0.260	++	0.004	++	0.082	0.598	0.598	0.598	0.598	0.598	0.828		
11	68	-	0.024	0.258	0.308	0.245	-	0.020	0.794	0.794	+++	2e-06	+++	6e-10	+++	0.062	0.337	0.337	0.337	0.337	0.337	0.006		
14	76	0.060	0.095	0.070	0.341	0.258	0.341	0.258	0.195	0.195	+++	7e-04	++	0.001	+++	1e-07	+++	3e-09	+++	3e-09	+++	0.006		
15	55	0.150	0.185	0.161	0.852	1.000	0.852	1.000	1.000	1.000	0.075	0.061	0.061	0.077	0.107	0.107	0.129	0.129	0.129	0.129	0.087	0.087		
13	55	0.094	0.169	0.053	0.079	0.133	0.079	0.133	0.177	0.177	+	0.019	+	0.018	0.068	0.349	0.534	0.534	0.534	0.534	0.606	0.606		
17	48	0.134	0.196	-	0.047	0.052	-	0.049	0.251	0.251	0.726	0.917	0.917	0.154	1.000	0.889	0.889	0.889	0.889	0.889	0.721	0.721		
18	70	-	0.022	0.060	-	0.034	0.088	-	0.049	0.092	++	0.001	+++	2e-05	+++	0.645	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.803		
16	52	0.437	0.603	0.138	0.214	0.265	0.214	0.265	0.890	0.890	0.762	0.628	0.628	0.254	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		

Tabelle A.37 – Überrepräsentationsanalyse **Protein** (1968 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung. (+/-), < 0.05; (++)/(-), < 0.01; (+++/---), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert										Reprimiert									
	G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	1	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p
1	317	0.662	0.702	0.318	1.000	1.000	1.000	0.510	0.470	1.000	0.320	1.000	1.000	0.233	0.350	0.329	1.000			
2	294	0.940	0.726	0.441	0.392	0.510	0.470	1.000	0.320	0.083	1.000	1.000	0.288	1.000	1.000	0.288	1.000			
4	308	1.000	0.906	0.419	1.000	0.819	1.000	0.085	1.000	1.000	0.538	0.412	0.558	1.000	1.000	0.558	1.000			
5	347	0.886	1.000	1.000	1.000	0.920	1.000	0.053	1.000	0.151	0.154	0.466	0.118	0.500	0.500	0.118	0.500			
6	343	1.000	1.000	0.125	1.000	1.000	1.000	0.885	0.885	0.696	0.813	0.348	0.788	0.488	0.885	0.488	0.885			
3	332	1.000	1.000	0.762	0.599	0.593	0.426	0.401	0.991	0.991	0.698	0.446	0.964	0.535	0.535	0.964	0.535			
9	291	0.762	1.000	0.213	1.000	0.653	1.000	0.002	1.000	0.056	0.463	0.900	0.960	0.666	0.960	0.666	0.960			
8	326	0.044	0.016	0.007	0.009	0.009	0.016	0.871	0.723	0.166	0.265	0.385	0.950	0.950	0.385	0.950	0.950			
7	278	0.723	1.000	0.446	1.000	1.000	0.862	0.014	0.024	0.021	0.338	0.311	0.552	0.552	0.311	0.552	0.552			
12	308	0.467	0.270	0.362	0.813	1.000	0.649	0.396	0.070	0.201	0.228	0.478	0.052	0.052	0.478	0.052	0.052			
10	321	0.151	0.049	0.157	0.433	0.711	0.281	0.971	0.771	1.000	1.000	1.000	0.726	0.726	1.000	0.726	0.726			
11	302	0.937	1.000	1.000	1.000	0.674	1.000	0.371	0.977	1.000	0.748	1.000	0.951	0.951	1.000	0.951	0.951			
14	303	0.716	0.725	1.000	0.939	1.000	1.000	0.988	1.000	0.516	0.019	0.015	0.311	0.311	0.015	0.311	0.311			
15	279	0.684	0.717	0.439	1.000	0.986	1.000	0.947	0.986	0.656	0.214	0.237	0.463	0.463	0.237	0.463	0.463			
13	296	1.000	0.767	0.939	0.977	0.990	1.000	0.616	0.686	0.616	0.261	0.219	0.300	0.300	0.261	0.300	0.300			
17	304	0.577	0.552	0.171	0.111	0.093	0.453	0.034	0.076	0.161	0.083	0.016	0.009	0.009	0.016	0.009	0.009			
18	281	0.873	1.000	1.000	1.000	1.000	0.655	0.969	1.000	0.754	0.008	8e-04	0.052	0.052	0.008	0.052	0.052			
16	314	0.865	1.000	0.421	0.375	0.615	1.000	0.720	1.000	1.000	1.000	0.955	0.702	0.702	1.000	0.955	0.702			

Tabelle A.38 – Überrepräsentationsanalyse **Signaltransduktion** (458 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung. (+/-), < 0.05; (++/-), < 0.01; (+++/---), < 0.001; p, p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert												Reprimiert											
	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21						
G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	
1	61	0.490	1.000	0.290	1.000	1.000	1.000	0.990	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.970	1.000	0.290	1.000	0.570	1.000	0.820	1.000	0.790		
2	64	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.550	0.860	0.980	0.850	0.980	0.850	1.000	0.980	0.980	0.660		
4	68	0.550	0.750	0.660	0.300	0.190	1.000	0.190	1.000	0.300	1.000	0.940	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.920	1.000	1.000		
5	61	0.980	0.920	1.000	1.000	0.890	1.000	0.890	1.000	1.000	1.000	0.060	0.170	0.820	0.560	0.820	0.560	0.560	0.390	0.390	0.430	0.430		
6	64	1.000	0.940	0.570	0.600	0.880	0.610	0.880	0.610	0.600	0.610	0.140	0.460	0.370	0.280	0.370	0.280	0.280	0.220	0.220	0.310	0.310		
3	65	1.000	1.000	0.850	0.670	1.000	1.000	1.000	1.000	0.670	1.000	0.190	0.140	0.830	1.000	0.830	1.000	1.000	1.000	1.000	0.660	0.660		
9	68	0.550	1.000	0.730	0.160	0.480	1.000	0.480	1.000	0.160	1.000	0.870	1.000	0.540	0.280	0.540	0.280	0.280	0.380	0.380	1.000	1.000		
8	64	0.570	0.550	0.340	0.570	0.480	0.920	0.480	0.920	0.570	0.920	1.000	0.980	0.870	0.870	0.870	0.850	0.850	0.920	0.920	0.960	0.960		
7	71	0.770	0.750	1.000	1.000	0.740	1.000	0.740	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.850	1.000	1.000	0.990	0.990		
12	81	0.950	1.000	0.680	0.980	1.000	1.000	1.000	1.000	0.980	1.000	1.000	1.000	0.810	0.610	0.610	0.830	0.830	0.860	0.860	0.990	0.990		
10	67	0.620	0.210	0.280	0.460	0.870	0.650	0.870	0.650	0.460	0.650	1.000	0.980	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.980	0.980		
11	76	1.000	1.000	0.870	0.970	0.770	1.000	0.770	1.000	0.970	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.670	0.670	0.860	0.860	0.990	0.990		
14	66	0.990	0.360	0.560	0.980	0.500	0.980	0.500	0.980	0.980	0.980	0.600	0.990	1.000	1.000	1.000	0.940	0.940	1.000	1.000	0.980	0.980		
15	70	1.000	1.000	1.000	0.920	0.870	0.630	0.870	0.630	0.920	0.630	1.000	0.960	0.920	1.000	0.920	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		
13	74	0.840	0.750	0.860	0.500	0.650	0.720	0.650	0.720	0.500	0.720	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.940	0.940		
17	61	1.000	1.000	0.750	0.690	0.790	1.000	0.790	1.000	0.690	1.000	0.740	0.900	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		
18	70	0.990	1.000	1.000	0.960	1.000	0.830	1.000	0.830	0.960	0.830	0.610	0.980	1.000	1.000	1.000	0.650	0.650	0.950	0.950	0.980	0.980		
16	67	0.950	0.780	1.000	0.990	0.630	1.000	0.630	1.000	0.990	1.000	1.000	1.000	0.930	1.000	0.930	1.000	1.000	1.000	1.000	0.960	0.960		

Tabelle A.39 – Überrepräsentationsanalyse Zelle (397 Einträge), G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung. (+/-), < 0.05; (++/-), < 0.01; (+++/-), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert										Reprimiert														
	1		1+7		7		7+21		21		1+7+21		1		1+7		7		7+21		21		1+7+21		
G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p								
1	70	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.800	1.000	1.000	1.000	1.000	0.600	0.800	1.000	1.000	1.000	0.700	0.500	1.000	1.000	1.000	0.500	1.000	
2	62	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.900	0.800	0.900	0.900	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.900	0.900	0.800	0.900	0.900	0.900	
4	67	1.000	1.000	1.000	0.500	1.000	1.000	1.000	1.000	0.900	1.000	1.000	1.000	0.600	0.600	1.000	1.000	1.000	1.000	0.400	1.000	0.400	0.200	1.000	
5	71	0.500	0.400	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.600	1.000	1.000	1.000	1.000	0.800	0.800	0.200	1.000	1.000	0.200	1.000		
6	73	1.000	0.800	0.700	0.900	0.900	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.200	0.500	1.000	0.800	0.400	1.000	0.800	0.400	1.000	1.000	0.400	1.000		
3	74	0.600	0.800	1.000	1.000	0.900	1.000	1.000	1.000	0.400	1.000	0.200	0.500	0.300	1.000	1.000	0.500	1.000	0.500	1.000	1.000	0.500	1.000		
9	68	0.700	0.700	1.000	0.800	0.900	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
8	61	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
7	62	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.800	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.900	1.000	1.000	0.900	1.000	0.500	1.000	
12	61	1.000	0.900	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.700	0.400	0.400	0.700	0.600	0.400	0.700	0.600	1.000	
10	64	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.800	1.000	1.000	0.400	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.400	1.000	1.000	0.400	1.000	1.000	
11	53	1.000	1.000	1.000	1.000	0.700	1.000	0.900	1.000	0.800	1.000	0.800	0.600	0.700	0.800	0.700	0.800	0.800	0.700	0.800	0.700	0.700	1.000	1.000	
14	61	1.000	0.800	0.500	0.800	0.300	1.000	0.600	0.300	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.700	1.000	0.700	1.000	1.000	1.000	
15	67	0.900	0.600	0.800	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.800	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.900	0.800	0.900	0.800	0.800	0.600	1.000	
13	64	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.900	0.400	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.900	1.000	0.900	1.000	1.000	1.000	
17	60	0.600	0.300	0.800	0.800	0.800	0.900	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.400	0.600	0.600	0.500	0.600	0.500	0.600	0.600	0.600	0.300	0.300	1.000	
18	65	0.700	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.800	0.800	0.600	1.000	1.000	1.000	1.000	0.200	0.800	0.800	1.000	
16	59	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.900	1.000	0.900	1.000	0.900	0.900	0.500	0.900	0.900	1.000	1.000	0.900	1.000	0.900	0.900	0.700	1.000	

Tabelle A.40 – Überrepräsentationsanalyse Entwicklung (271 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung. (+/-), < 0.05; (++)/(-), < 0.01; (+++/---), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert										Reprimiert														
	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21							
G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p						
1	57		0.290		0.450		0.310		0.330		0.260		0.130		1.000		1.000		0.610		0.630		0.540		0.960
2	47		0.130		0.060		0.260		0.280		0.370		0.080		1.000		1.000		1.000		0.950		1.000		0.870
4	55	+	0.050		0.110		0.580		0.190		0.510	+	0.030		1.000		1.000		0.970		0.980		1.000		1.000
5	45		0.600		0.560		0.990		0.440		0.250		0.460		1.000		0.860		0.670		0.970		0.840		1.000
6	57		0.070		0.950		0.790		0.790		0.360		0.700		1.000		1.000		0.740		1.000		0.990		1.000
3	63	+	0.020		0.540		0.450		0.480		0.090		0.360		0.580		0.290		0.800		0.950		0.610		0.390
9	60		0.050		0.140		0.090	+	0.040	+	0.020		0.090		0.850		0.920		0.610		1.000		1.000		1.000
8	52		0.580		0.420		0.440		0.450		0.530		0.570		0.920		0.820		0.820		0.860		0.950		0.860
7	58		0.210		0.140		0.320		0.620		0.410		0.540		1.000		1.000		0.540		1.000		0.870		1.000
12	56	+	0.030	+	0.040		0.160		0.240		0.130		0.070		0.420		0.420		0.850		0.950		0.730		0.400
10	55	+	0.030		0.150		0.230		0.200	+	0.040		0.230		1.000		1.000		1.000		1.000		0.940		0.990
11	50	+	0.050		0.930		0.980		0.990		0.280		1.000		1.000		1.000		0.970		0.830		1.000		0.790
14	47		0.470		0.140		0.560		0.800		0.950		0.180		0.690		0.790		1.000		1.000		1.000		0.210
15	55		0.090		0.470		0.590		0.530		0.420		0.350		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000		1.000
13	52		0.510		0.600		0.480		0.370		0.470		0.460		0.990		0.950		0.900		0.710		0.790		0.670
17	44		0.800		0.750		0.600		1.000		1.000		1.000		0.900		0.620		0.670		0.900		1.000		0.860
18	61		0.100		0.070		0.060		0.260		0.370		0.430		0.500		0.640		0.530		0.240		0.430		0.480
16	46		0.350		0.290		0.990		0.830		0.650		0.170		1.000		1.000		1.000		0.930		1.000		0.650

Tabelle A.41 – Überrepräsentationsanalyse Transport (434 Einträge): G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung. (+/-), < 0.05; (+/--), < 0.01; (+++/---), < 0.001; p: p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert										Reprimiert																		
	G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	1	+/-	p	+/-	p	1+7	+/-	p	7	+/-	p	7+21	+/-	p	21	+/-	p	1+7+21	
1	104	+	0.028	0.264	+++	7e-04	+++	1e-05	+++	9e-06	0.150	0.630	0.427	0.752	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.991
2	83	++	0.006	0.002	+	0.031	0.541	0.613	0.185	1.000	0.741	0.969	0.833	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
4	90		0.645	0.630	1.000	0.492	++	0.003	0.271	0.620	0.422	0.459	0.807	0.219	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
5	85		0.052	8e-04	+++	3e-06	+++	5e-05	++	0.010	++	0.002	1.000	0.776	0.250	0.321	0.871	0.890	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
6	79		0.163	0.478	0.658	0.655	0.600	0.600	0.707	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
3	87	+	0.030	+	0.016	++	0.004	0.649	1.000	0.760	1.000	0.977	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
9	91		0.081	+	0.014	+++	6e-04	+	0.034	+	0.026	0.173	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.942
8	88		0.118	0.083	+	0.018	0.118	0.086	0.156	1.000	0.851	0.859	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
7	98	+	0.031	0.055	++	0.006	++	0.003	++	0.008	+	0.029	0.181	0.309	0.794	0.121	0.082	0.251	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
12	90		0.062	0.082	+	0.017	++	0.010	++	0.004	0.067	0.590	0.456	1.000	0.752	0.998	0.937	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
10	84		0.096	+	0.036	+++	4e-04	+++	3e-05	++	0.003	++	0.007	0.711	1.000	0.953	0.884	0.564	0.977	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
11	81		0.095	0.715	0.193	0.535	0.225	1.000	0.998	0.852	0.785	0.936	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
14	90		0.265	0.658	+	0.017	+++	2e-04	+++	1e-05	0.277	0.699	0.201	0.841	1.000	0.986	0.176	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
15	82		0.434	0.413	0.072	+++	6e-06	+++	1e-05	++	0.002	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
13	90	+	0.039	++	0.010	++	0.002	++	0.002	+++	6e-04	++	0.004	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
17	83		0.292	0.392	0.157	+	0.024	+	0.019	0.145	0.332	0.385	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
18	79		0.874	0.401	0.169	++	0.006	+	0.031	+	0.027	0.824	0.777	0.954	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
16	86	+	0.020	0.092	+	0.041	+	0.020	++	0.004	0.072	1.000	0.707	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Tabelle A.42 – Überrepräsentationsanalyse **Unbekannt** (4715 Einträge). G, Genotypen: 1-6 Roggen, 7-12 Weizen, 13-18 Gerste; n, Anzahl regulierter Gene; +/-, Überrepräsentiert (+), Unterrepräsentiert (-) nach FDR-Anpassung. (+/-), < 0.05; (++/-), < 0.01; (+++/---), < 0.001; p, p-Wert des Fisher-Tests (Unterrepräsentiert).

Tag	Induziert										Reprimiert									
	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21	1	1+7	7	7+21	21	1+7+21		
G	n	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	+/-	p	
1	696	1.000	0.631	0.441	0.349	-	0.033	0.916	1.000	1.000	0.923	-	0.021	0.439	0.594	1.000				
2	721	-	0.027	--	0.008	+	0.041	1.000	0.015	+	0.145	0.277	--	0.006	-	0.006	1.000			
4	694	0.951	1.000	0.281	0.944	0.181	0.619	0.358	0.628	0.423	0.975	1.000	1.000							
5	667	0.515	0.545	-	0.049	0.490	0.704	0.362	0.556	-	0.047	0.487	0.382	0.984						
6	631	-	0.023	-	0.026	--	3e-04	0.120	0.096	0.603	0.715	-	0.042	-	0.016	-	0.015	0.603		
3	650	0.136	0.676	--	0.002	0.135	0.082	0.630	1.000	1.000	0.401	0.509	0.133	1.000						
9	677	0.461	0.260	--	6e-05	0.062	-	0.041	0.467	++	0.004	0.557	0.228	--	3e-04	--	1e-04	0.308		
8	700	0.360	0.111	-	0.021	0.056	0.077	0.151	0.986	0.962	1.000	0.969	0.779	1.000						
7	702	0.078	0.075	-	0.012	0.076	0.056	0.195	1.000	1.000	0.538	0.788	0.802	0.676						
12	675	-	0.010	--	0.007	-	0.037	0.176	0.082	-	0.044	0.703	0.494	-	0.017	-	0.017	0.987		
10	706	0.586	0.247	0.220	-	0.011	0.055	0.077	1.000	0.936	0.263	0.599	1.000	1.000						
11	721	-	0.043	0.511	0.233	-	0.018	0.498	0.071	1.000	1.000	1.000	0.066	1.000						
14	686	-	0.028	0.141	0.160	0.149	-	0.048	0.403	0.625	0.291	0.763	0.819	0.537	1.000					
15	753	+	0.019	0.202	0.640	--	0.001	--	0.008	0.541	0.392	0.459	0.432	0.538	0.437					
13	729	0.771	0.470	0.174	0.099	0.057	0.277	0.642	0.635	0.611	+	0.020	+	0.025	+	0.017				
17	682	0.630	0.079	-	0.016	-	0.006	-	0.047	-	0.046	0.478	0.057	0.381	0.667	1.000				
18	699	0.129	1.000	0.339	0.288	0.516	0.898	-	0.003	--	6e-05	8e-05	0.621	1.000	0.850					
16	683	0.309	0.098	-	0.038	-	0.028	0.143	0.060	1.000	1.000	0.212	0.118	0.151	0.879					

Anhang B.

B Abbildungen

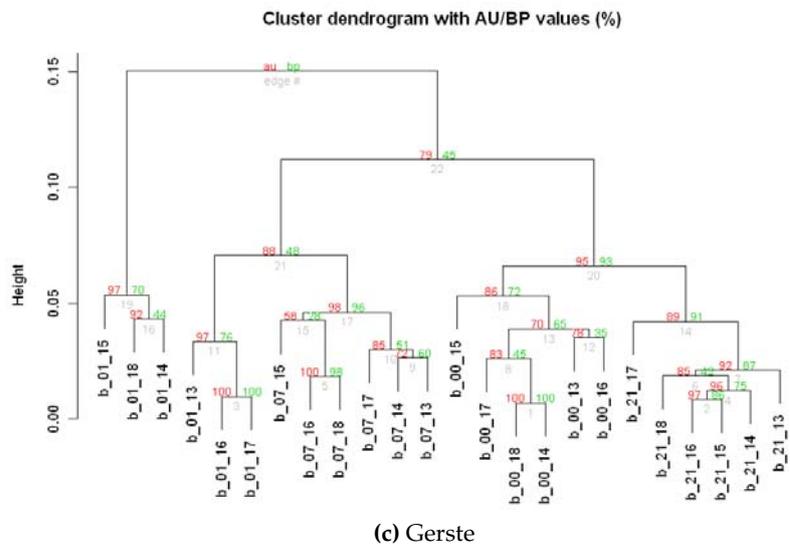
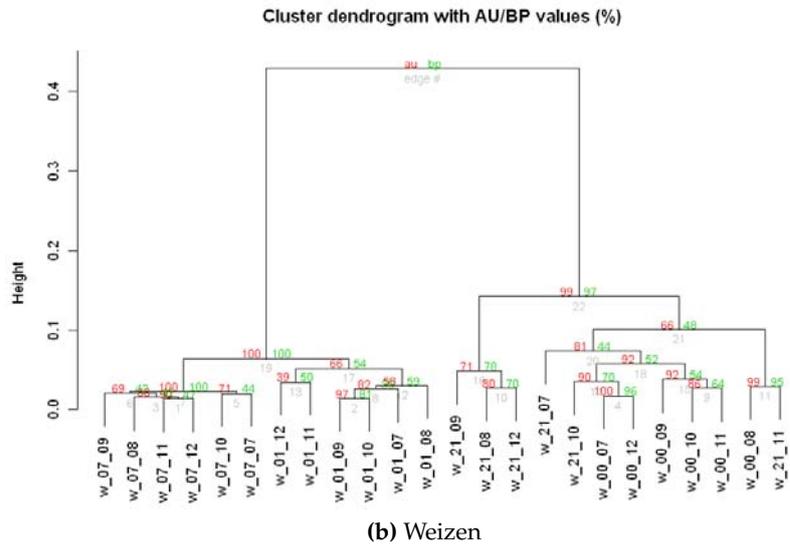
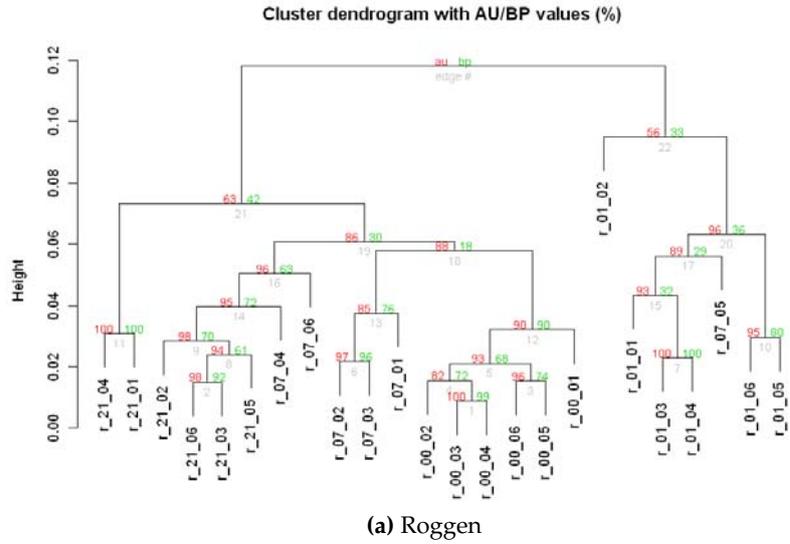


Abbildung B.1 – Dendrogramme berechnet aus den Hybridisierungen von Roggen (a), Weizen (b) und Gerste (c) nach hierarchischen Clustern und Bootstrap-Analyse (n = 10 000). R, Roggen; W, Weizen; B, Gerste; 00-21, Tag 0-21; 01-18, Genotypen.

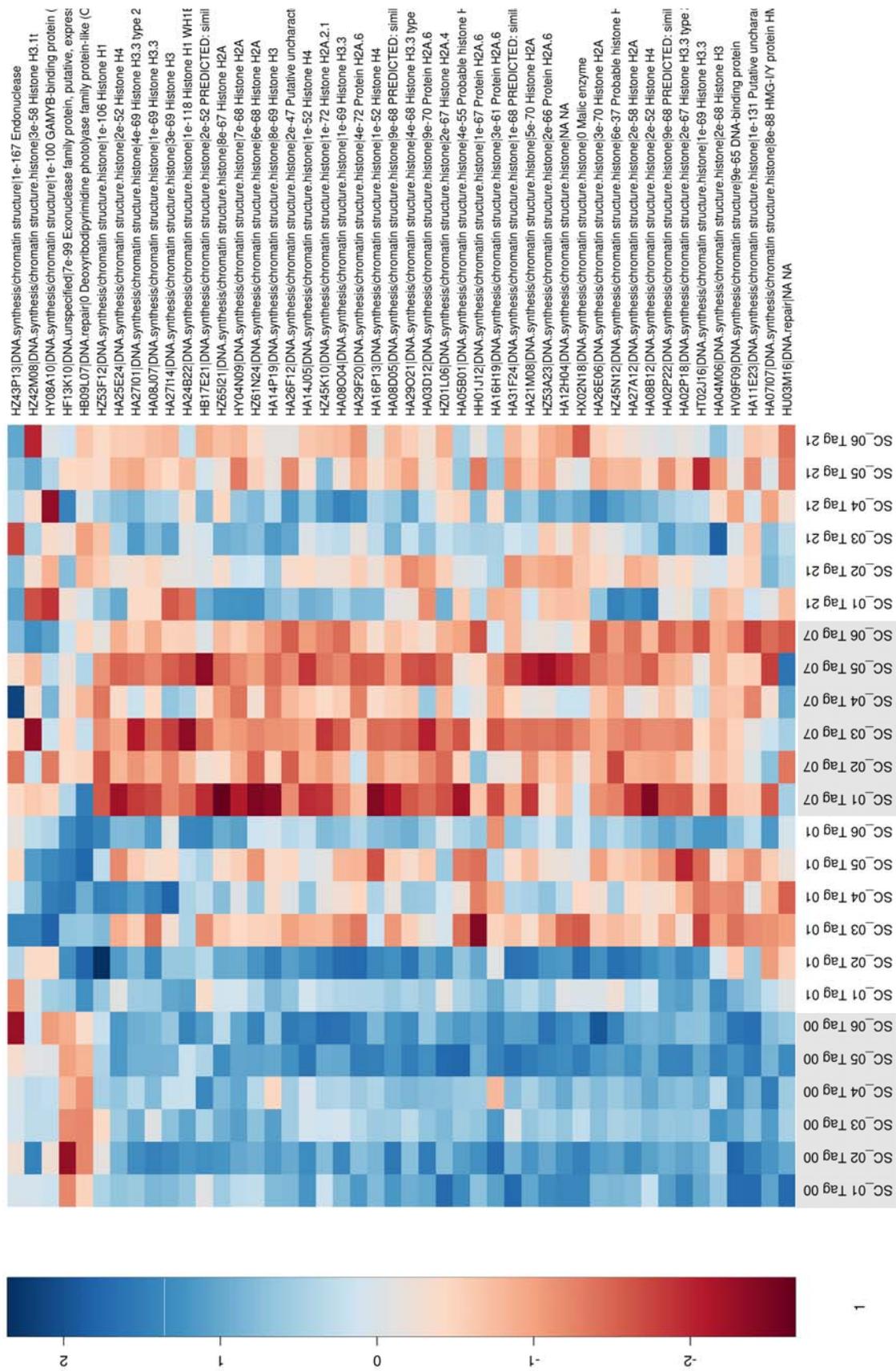


Abbildung B.2 – Heatmap der Kategorie DNA von *Secale cereale*.

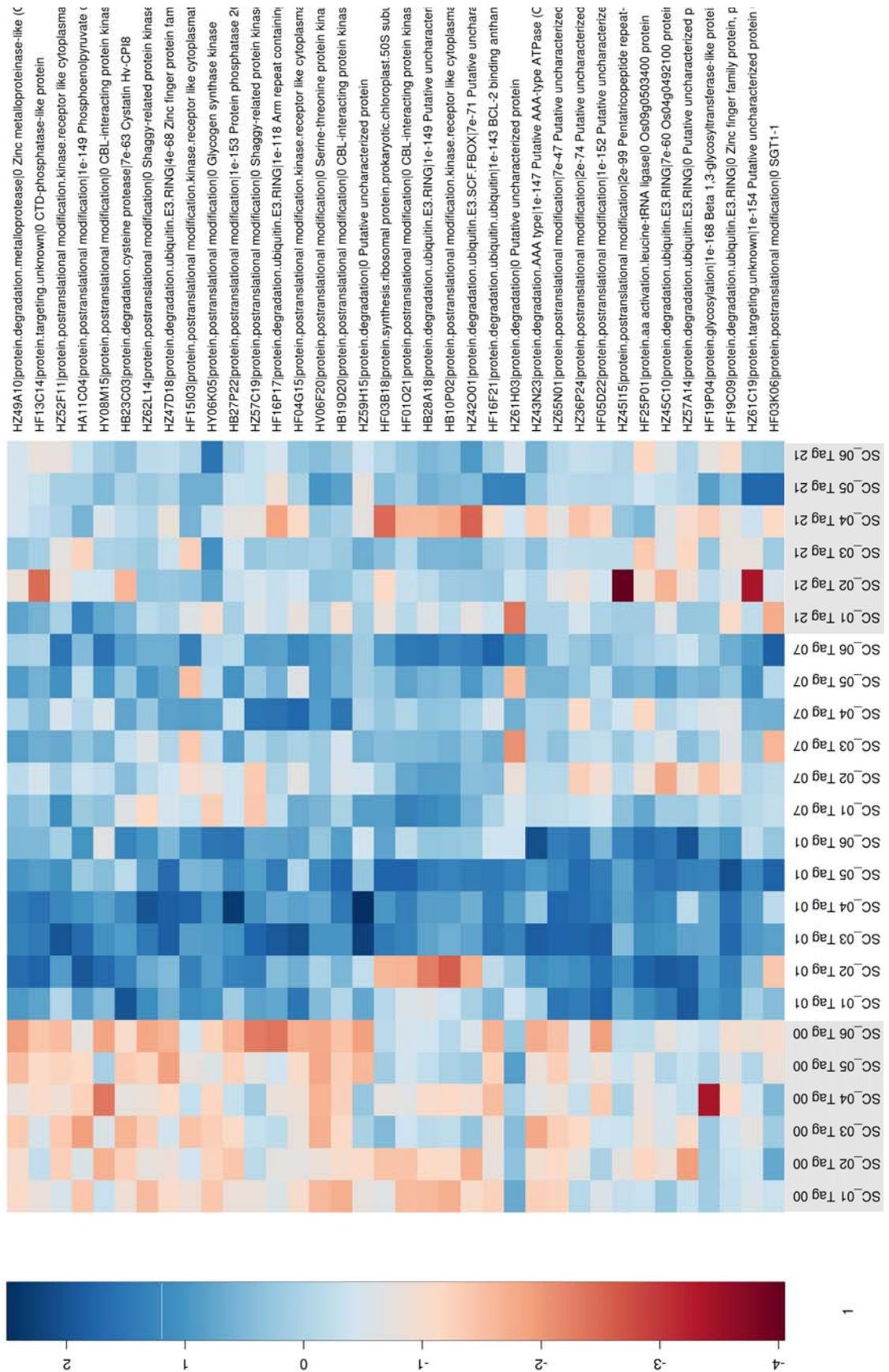


Abbildung B.5 – Heatmap der Kategorie Protein von *Secale cereale*.

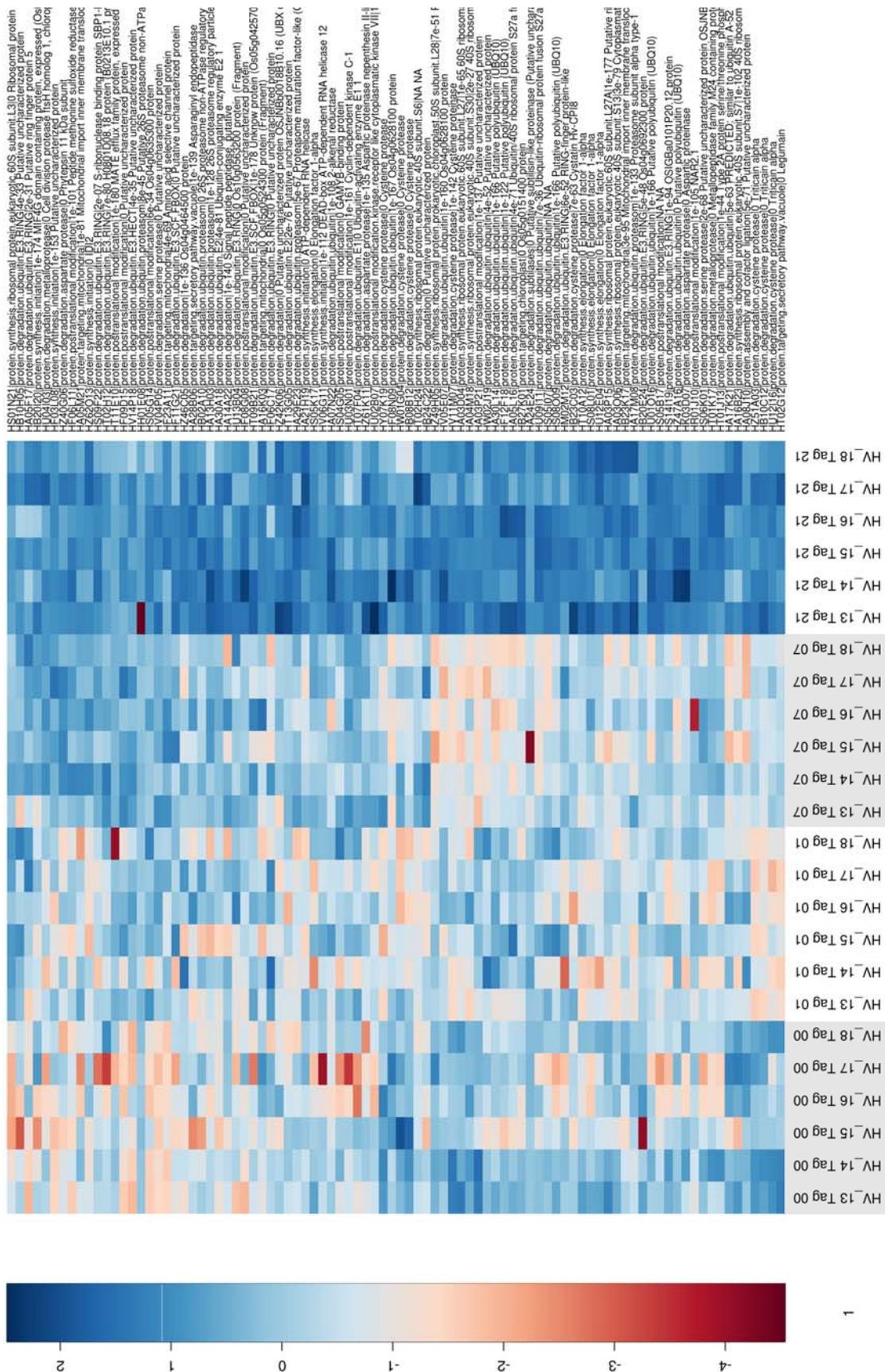


Abbildung B.7 – Heatmap der Kategorie Protein von *Hordeum vulgare*.

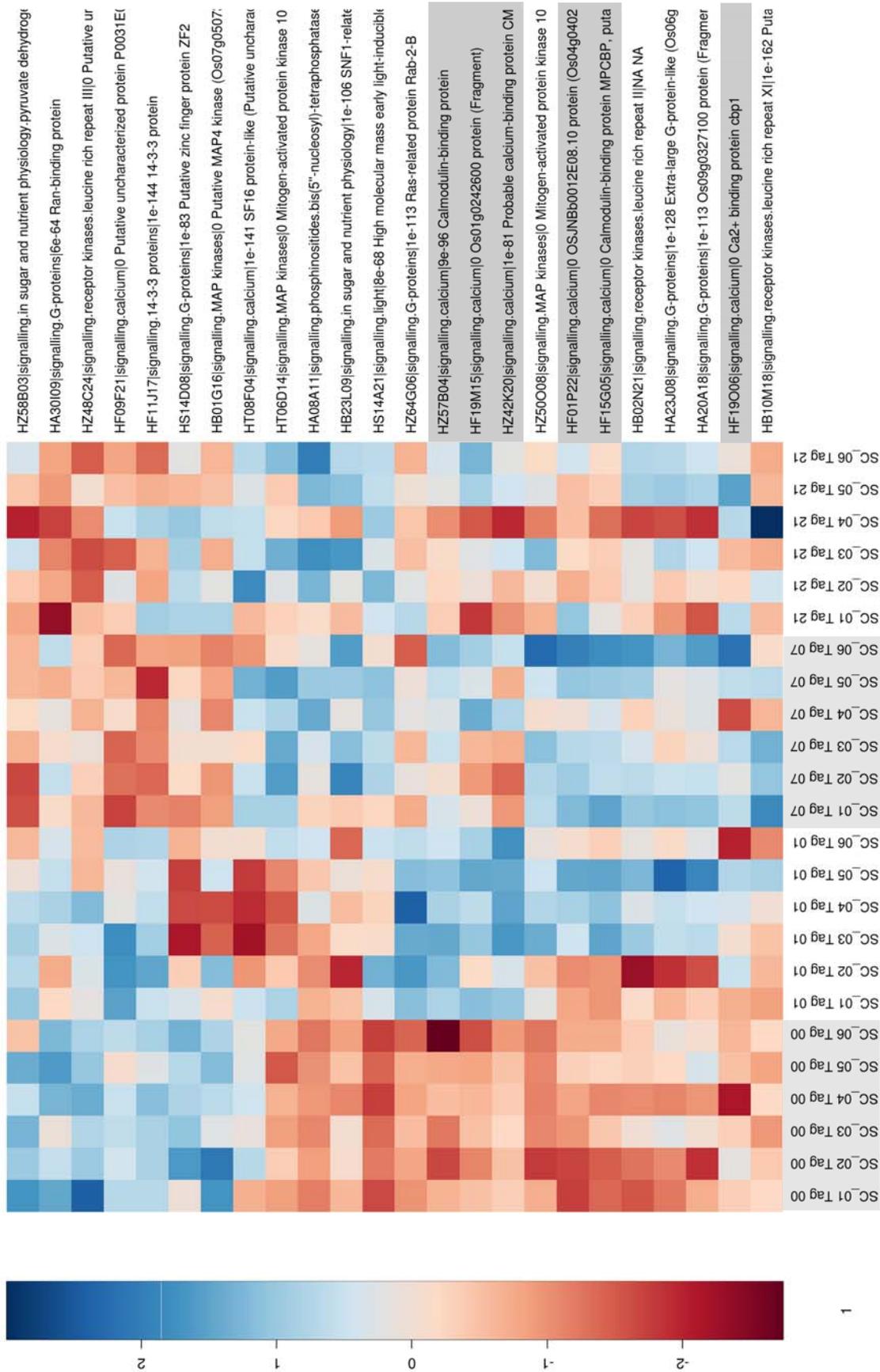


Abbildung B.8 – Heatmap der Kategorie Signaltransduktion von *Secale cereale*.

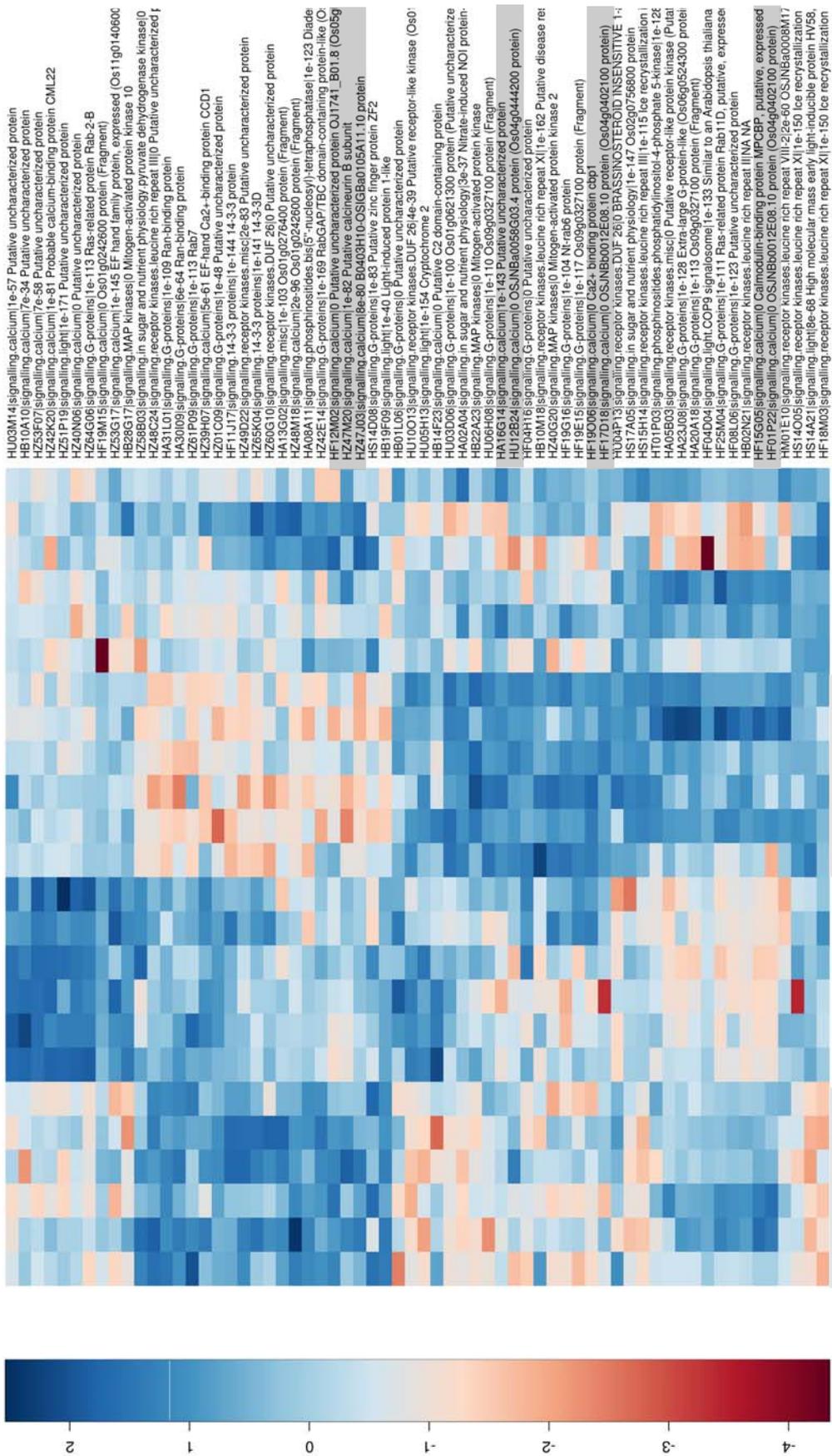


Abbildung B.9 – Heatmap der Kategorie Signaltransduktion von *Triticum aestivum*.

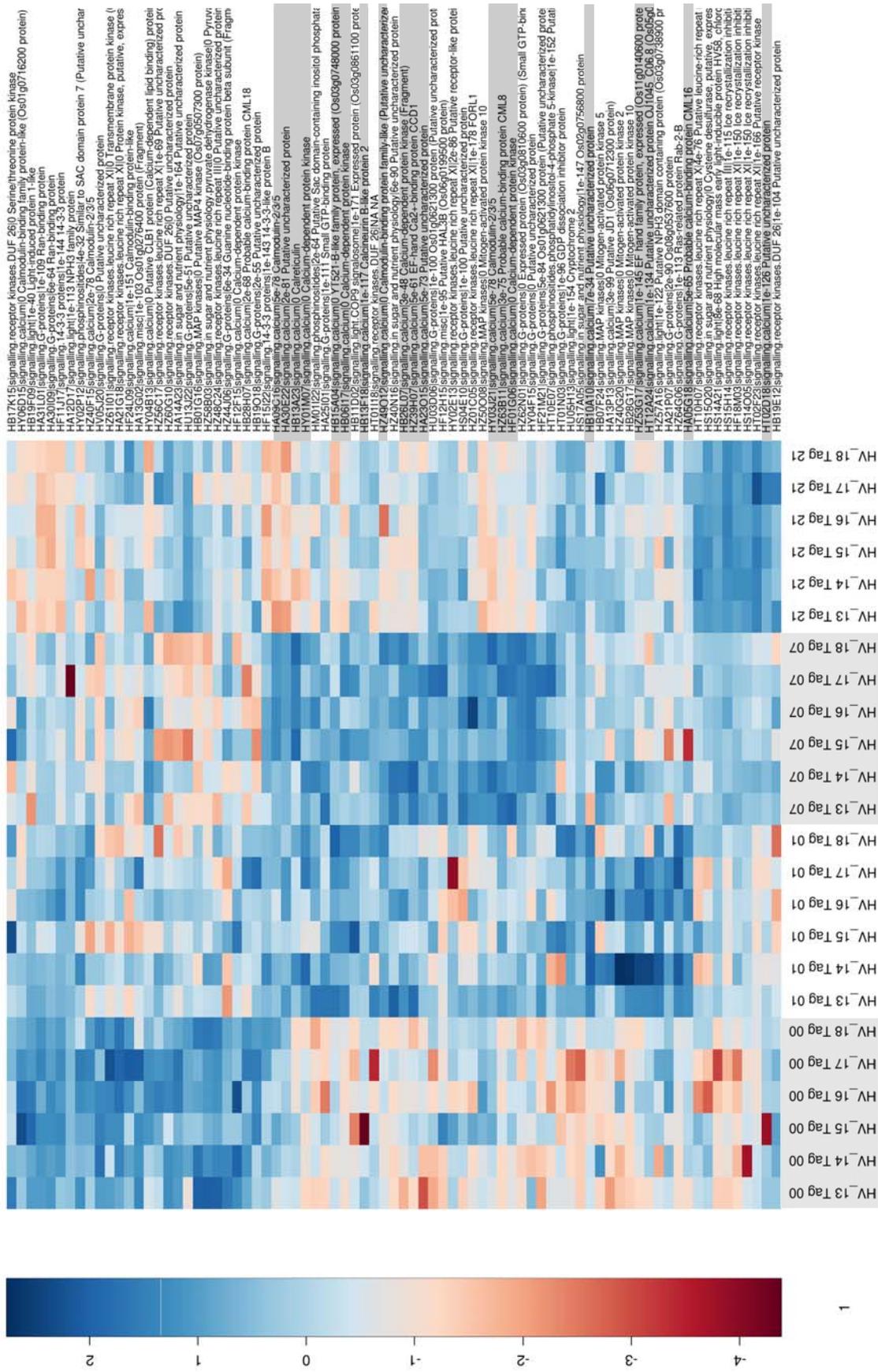


Abbildung B.10 – Heatmap der Kategorie Signaltransduktion von *Hordeum vulgare*.

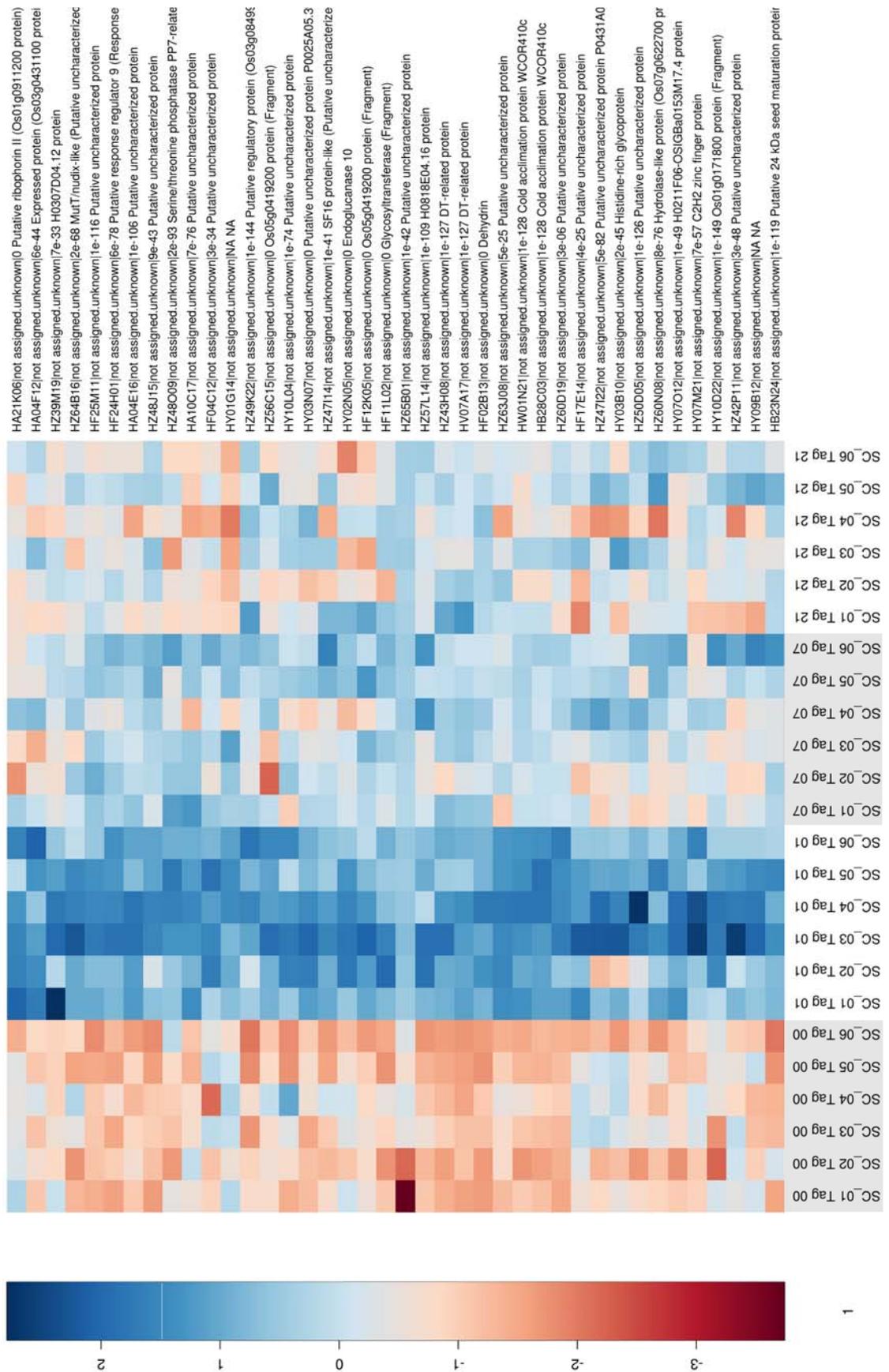


Abbildung B.11 – Heatmap der Kategorie „Unbekannt“ von *Secale cereale*.

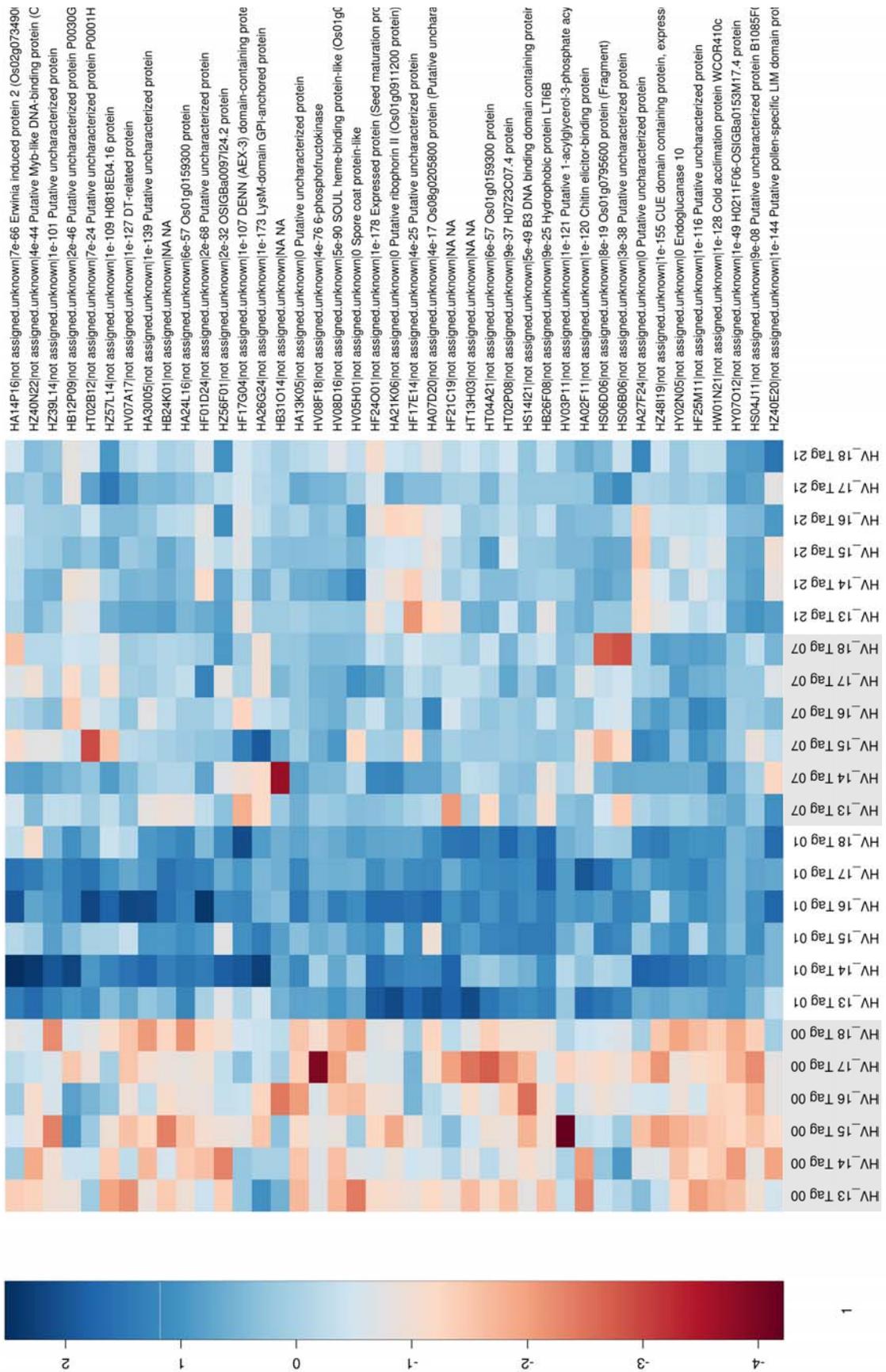


Abbildung B.13 – Heatmap der Kategorie „Unbekannt“ von *Hordeum vulgare*.

Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Name Benedikt Athmer
Geburtstag und -ort 08. September 1978 in Hannover
Nationalität deutsch
Wohnort Wandsbeker Königstr. 38, 22041 Hamburg

Berufstätigkeit

seit 2012 Wissenschaftlich-technischer Mitarbeiter, *Europäisches Labor für Molekularbiologie*, Hamburg
2006-2011 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, *Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung*, Gatersleben

Ausbildung

1999-2005 Biologiestudium, *Universität Hannover*
1998-1999 Zivildienst, Hannover
1995-1998 Allgemeine Hochschulreife, Integrierte Gesamtschule Mühlenberg, Hannover
1991-1995 Kooperative Gesamtschule, Barsinghausen.
1989-1991 Orientierungsstufe, Wennigsen
1985-1989 Grundschule, Wennigsen

Hamburg, 10. Juli 2012

Benedikt Athmer

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass ich die eingereichte Dissertation „Differenzielle Genexpression in Roggen, Weizen und Gerste und ihr Bezug zur Frosttoleranz“ selbstständig angefertigt und diese nicht bereits für eine Promotion oder andere Zwecke an einer anderen Universität eingereicht habe. Weiterhin versichere ich, dass ich die zur Erstellung der Dissertationsschrift verwendeten Arbeiten und Hilfsmittel genau und vollständig angegeben habe.

Hamburg, 10. Juli 2012

Benedikt Athmer