

Quantitative Bestimmung der Permeabilität  
und  
Analyse der chemischen Zusammensetzung  
ausgewählter Kutikula-Mutanten von  
*Arabidopsis thaliana*

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von  
Anna Christina Ballmann  
aus Bonn

Bonn 2010

angefertigt mit Genehmigung  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für zelluläre und molekulare  
Botanik der Universität Bonn angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Lukas Schreiber
2. Gutachter: PD Dr. Rochus Franke

Tag der Promotion: 21.12.2010

Erscheinungsjahr: 2010

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Einleitung</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1. Die Kutikula</b>  | <b>3</b>  |
| 1.1.1. Kutin  | 3         |
| 1.1.2. Wachse   | 4         |
| <b>1.2. Wachs- und Kutinsynthese am Beispiel von <i>A. thaliana</i></b>   | <b>5</b>  |
| <b>1.3. Transporteigenschaften der Kutikula</b>   | <b>10</b> |
| <b>1.4. Ziel dieser Arbeit</b>  | <b>11</b> |
| <b>2. Material und Methoden</b>   | <b>14</b> |
| <b>2.1. Radioaktive Methoden</b>  | <b>15</b> |
| 2.1.1. Pflanzenmaterial für radioaktive Methoden  | 15        |
| 2.1.1.1. Ernte von <i>P. laurocerasus</i> , <i>C. aurantium</i> , <i>H. helix</i> und<br><i>C. annuum</i> und Isolierung der Kutikularmembranen             | 15        |
| 2.1.1.2. Anzucht von <i>A. thaliana</i> auf Erde  | 16        |
| 2.1.2. Material und Herstellung radioaktiver Donorlösungen  | 17        |
| 2.1.3. Quantitativer Permeationsassay für intakte Blätter von <i>A. thaliana</i>  | 17        |
| 2.1.4. Desorptionsexperiment für <i>A. thaliana</i>   | 19        |
| 2.1.5. Metabolisierungsexperiment   | 20        |
| 2.1.6. Co-Permeationsexperiment für isolierte Kutikularmembranen von<br><i>P. laurocerasus</i> , <i>C. aurantium</i> , <i>H. helix</i> und <i>C. annuum</i> | 20        |
| <b>2.2. Bekannte Methoden der Permeabilitätsbestimmung bei <i>A. thaliana</i></b>   | <b>21</b> |
| 2.2.1. Trockenexperiment  | 21        |
| 2.2.2. Chlorophyll Leaching   | 22        |
| 2.2.3. Toluidin Blau  | 22        |
| <b>2.3. Chemische Analyse von Wachs und Kutin mittels Gaschromatographie</b>  | <b>23</b> |
| 2.3.1. Wachs-Extraktion von <i>A. thaliana</i> Blättern   | 23        |
| 2.3.2. Kutinextraktion von <i>A. thaliana</i> Blättern  | 23        |
| 2.3.3. Umesterung   | 24        |
| 2.3.4. Derivatisierung  | 24        |
| 2.3.5. Gaschromatographie und Massenspektrometrie   | 25        |
| 2.3.5.1. Quantitative Analyse mittels GC-FID  | 25        |
| 2.3.5.2. Qualitative Analyse mittels GC-MS  | 27        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>2.4. Molekularbiologische Materialien und Methoden</b>  | <b>28</b> |
| 2.4.1. Materialien   | 28        |
| 2.4.1.1. Primer  | 28        |
| 2.4.1.2. Anzucht von Bakterien und Antibiotikakonzentrationen  | 28        |
| 2.4.1.3. Anzucht <i>A. thaliana</i>  | 30        |
| 2.4.2. Allgemeine molekularbiologische und mikrobiologische Methoden   | 31        |
| 2.4.2.1. Methode zur Isolierung genomischer DNA aus Blättern<br>von <i>A. thaliana</i>   | 31        |
| 2.4.2.2. RNA Extraktion  | 32        |
| 2.4.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)   | 32        |
| 2.4.2.4. Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)  | 33        |
| 2.4.2.5. Verdau mit Restriktionsenzymen  | 34        |
| 2.4.2.6. Gelelektrophorese   | 35        |
| 2.4.2.7. Herstellung kompetenter Zellen von <i>E. coli</i>   | 36        |
| 2.4.2.8. Transformation von <i>E. coli</i> durch Hitzeschock   | 37        |
| 2.4.2.9. Transformation von <i>A. tumefaciens</i>  | 38        |
| 2.4.2.10. Flüssigkulturen und Miniprep   | 38        |
| 2.4.2.11. Glycerin-Stocks  | 39        |
| 2.4.3. Die Klonierung von DNA-Fragmenten und Herstellung transgener<br>Pflanzenlinien  | 39        |
| 2.4.3.1. TA-Klonierung   | 39        |
| 2.4.3.2. Rekombinationsvermitteltes Klonieren mi Hilfe des<br>Gateway-Systems  | 41        |
| 2.4.3.4. Transformation von <i>A. thaliana</i> mittels <i>Floral Dip</i> -Methode  | 44        |
| 2.4.3.4. Überprüfung der transgenen Linien   | 45        |
| <b>3. Ergebnisse</b>   | <b>46</b> |
| <b>3.1. Permeationsassay für intakte Blätter von <i>A. thaliana</i></b>  | <b>47</b> |
| 3.1.1. Verteilung der Häufigkeiten von <sup>14</sup> C-Epoxiconazol Permeation in<br>Blätter von <i>A. thaliana</i>  | 47        |
| 3.1.2. Leitwertberechnung  | 47        |
| 3.1.3. Desorption von <sup>14</sup> C-Epoxiconazol aus dem Blatt von <i>A. thaliana</i>  | 49        |
| 3.1.4. Metabolismus von Epoxiconazol   | 51        |
| 3.1.5. Überprüfung der <i>A. thaliana</i> Blätter auf Bakterien- und Pilzbewuchs   | 52        |
| 3.1.6. Permeationsassay mit Silwet   | 53        |
| 3.1.7. Austrocknung von <i>A. thaliana</i> Blättern  | 54        |
| <b>3.2. Co-Permeabilität von <sup>14</sup>C-Epoxiconazol und <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O für die isolierte Kutikula von<br/><i>P. laurocerasus</i>, <i>C. aurantium</i>, <i>H. helix</i> und <i>C. annuum</i></b> | <b>55</b> |
| 3.2.1. <i>P. laurocerasus</i>  | 55        |

|   |            |
|---|------------|
| 3.2.2. <i>C. aurantium</i>  | 57         |
| 3.2.3. <i>H. helix</i>  | 57         |
| 3.2.4. <i>C. annuum</i>   | 60         |
| 3.2.5. Gesamtbetrachtung Co-Permeabilität $^3\text{H}_2\text{O}$ und $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol                      | 60         |
| 3.2.6. Permeation von Epoxyconazol in das intakte Blatt von <i>P. laurocerasus</i>                                      | 63         |
| <br>  |            |
| <b>3.3. Kutikula-Mutanten von <i>A. thaliana</i>: Permeabilität und Wachs- und Kutinzusammensetzung</b>                 | <b>64</b>  |
| 3.3.1. Permeabilität und Wachsbelegung der Wildtypen  | 64         |
| 3.3.2. Permeabilität, Wachs- und Kutinzusammensetzung von <i>wax2</i> ,<br><i>cer3</i> und <i>yre</i> :                 | 66         |
| 3.3.3. Permeabilität, Wachs- und Kutinzusammensetzung von <i>cer5</i>   | 71         |
| 3.3.4. Permeabilität, Wachs- und Kutinzusammensetzung von <i>cut1</i>   | 74         |
| 3.3.5. Permeabilität, Wachs- und Kutinzusammensetzung von <i>cer10</i>  | 79         |
| 3.3.6. Permeabilität, Wachs- und Kutinzusammensetzung von <i>shn1</i>   | 81         |
| 3.3.7. Permeabilität, Wachs- und Kutinzusammensetzung von <i>shn3</i>   | 83         |
| 3.3.8. Permeabilität und Wachsbelegung von <i>bdg</i>   | 86         |
| 3.3.7. Permeabilität, Wachs- und Kutinzusammensetzung von <i>att1</i>   | 87         |
| <br>  |            |
| <b>3.4. Vergleich mit <i>Chlorophyll Leaching</i> und Toluidin Blau</b>   | <b>90</b>  |
| 3.4.1. <i>Chlorophyll Leaching</i>  | 90         |
| 3.4.2. Toluidin Blau  | 92         |
| <br>  |            |
| <b>3.5. Transgene Linien, die das Gen <i>CYP703A2</i> exprimieren</b>   | <b>93</b>  |
| 3.5.1. Das Gen <i>CYP7023A2</i> unter der Kontrolle des Promotor <sub><i>CUT1</i></sub>                                 | 93         |
| 3.5.2. Das Gen <i>CYP703A2</i> unter der Kontrolle des Promotor <sub><i>S35S</i></sub>                                  | 95         |
| <br>  |            |
| <b>4. Diskussion</b>  | <b>98</b>  |
| <hr/>   |            |
| <b>4.1. Permeationsassay für <i>A. thaliana</i></b>   | <b>99</b>  |
| 4.1.1. Permeationsassay für den Ökotyp Col-8 von <i>A. thaliana</i>   | 99         |
| 4.1.2. Leitwert für <i>A. thaliana</i>  | 100        |
| 4.1.3. Desorption   | 104        |
| 4.1.4. Verlust von $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol  | 105        |
| 4.1.5. Infiltration   | 106        |
| 4.1.6. Permeabilität von Wasser   | 107        |
| <br>  |            |
| <b>4.2. Messung der Permeabilität von Kutikula-Mutanten und chemische Analyse deren Wachs- und Kutinzusammensetzung</b> | <b>112</b> |
| 4.2.1. Wildtypen  | 113        |
| 4.2.2. Hohe Permeabilität und geringe Wachsbelegung bei <i>wax2</i> , <i>cer3</i> und <i>yre</i>                        | 113        |

|  |            |
|--|------------|
| 4.2.3. Leichte Veränderung in der Permeabilität und geringe Wachsbelegung bei <i>cer5</i>                | 116        |
| 4.2.4. Hohe Permeabilität und geringe Wachsbelegung bei <i>cut1</i>                                      | 118        |
| 4.2.5. Leichte Veränderung in der Permeabilität und leichte Reduktion der Wachsbelegung bei <i>cer10</i> | 119        |
| 4.2.6. Hohe Permeabilität, höhere Wachs- und Kutinmenge bei <i>shn1</i>                                  | 120        |
| 4.2.7. Keine Veränderung in der Permeabilität und erhöhte Wachsbelegung bei <i>shn3</i>                  | 121        |
| 4.2.8. Erhöhte Permeabilität und höhere Wachsbelegung bei <i>bdg</i>                                     | 122        |
| 4.2.9. Hohe Permeabilität und geringe Kutinmenge bei <i>att1</i>   | 123        |
| <b>4.3. Transgene Linien, die das Gen <i>CYP703A2</i> exprimieren</b>                                    | <b>124</b> |
| <b>4.4. Vergleich mit anderen Methoden</b>   | <b>125</b> |
| <b>4.5. Gibt es einen Zusammenhang zwischen Permeabilität und einzelnen Kutikula-Eigenschaften?</b>      | <b>127</b> |
| <b>4.6. Zusammenfassung der Diskussion und Ausblick</b>  | <b>133</b> |
| <b>5. Zusammenfassung</b>  | <b>137</b> |
| <b>6. Summary</b>  | <b>139</b> |
| <b>7. Literaturliste</b>   | <b>141</b> |
| <b>8. Anhang</b>   | <b>158</b> |
| 8.1. Wachs- und Kutinzusammensetzungen der Wildtypen   | 159        |
| 8.2. Wachszusammensetzungen der Mutanten   | 161        |
| 8.3. Die Klonierung des Gens <i>CYP703A2</i>   | 178        |
| 8.3.1. Vektorkarten  | 178        |
| 8.3.2. Wachs- und Kutinanalysen der transgenen Linien  | 181        |
| 8.4. Prozentuale Veränderungen der Wachs- und Kutinmenge   | 186        |
| 8.5. Abbildungsverzeichnis   | 186        |
| 8.6. Tabellenverzeichnis   | 188        |
| 8.7. Abkürzungsverzeichnis   | 189        |
| <b>9. Erklärung</b>  | <b>191</b> |



## **1. Einleitung**

Vor etwa 500 Millionen Jahren fand der Übergang des pflanzlichen Lebens vom Wasser auf das Festland statt. Die durch die neuen Umweltfaktoren entstehenden Probleme wurden durch die Ausbildung spezieller Gewebe und Barrieren gelöst. Für eine mechanische Stabilität, die im Wasser zuvor nicht nötig war, wird das Polymer Lignin in Zellwände eingelagert. So kann auch der Wassertransport in der Pflanze problemfrei stattfinden (Lewis und Yamamoto, 1990; Boerjan *et al.* 2003). Zusätzlich bietet Lignin eine antipathogene Wirkung (Moerschbacher *et al.* 1990). Um unkontrollierten Wasser- und Nährstoffverlust zu vermeiden, also ein definiertes inneres Milieu aufrechtzuerhalten, wurden spezielle Grenzflächen entwickelt. In den unterirdischen Pflanzenteilen sorgt besonders das Polymer Suberin (Franke *et al.*, 2005; Franke und Schreiber, 2007; Schreiber *et al.*, 1994) für die Ausbildung einer Barriere zwischen der Wurzel und dem umgebenden Medium. Zwischen den oberirdischen Organen der Pflanze und der umgebenden Umwelt wurde eine Kutikula gebildet (Abb. 1.1.).

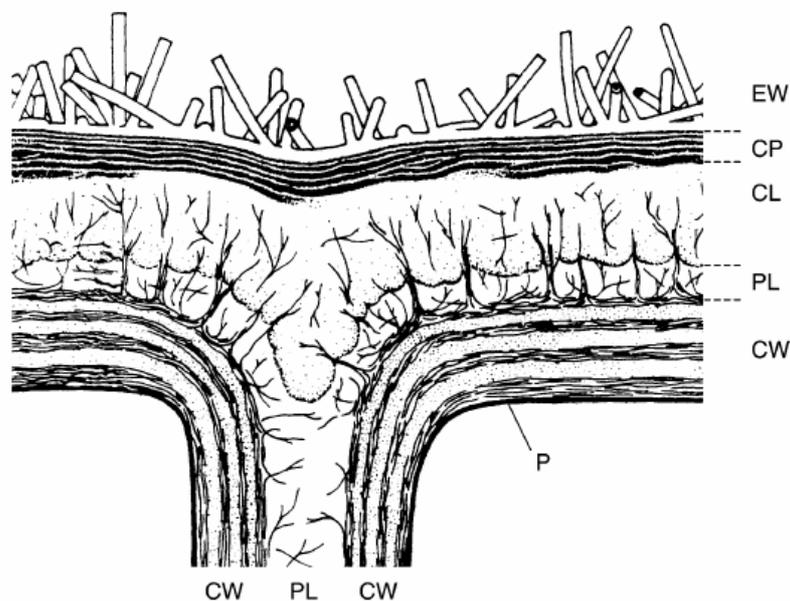


Abb. 1.1. **Schematischer Aufbau der Kutikula** (aus: Buchholz, 2006; modifiziert nach Jeffree, 1986). Von außen nach innen: EW – epikutikuläre Wachse; CP – reine Kutikula (*cuticle proper*) - eine Schicht von in Kutin eingebettetes Wachs; CL – Kutikularschicht (*cuticle layer*), eine Schicht aus Kutin und Wachs, in die Zellwandkomponenten wie Pektin und Cellulose eingelagert sind; PL – Pektinschicht (*pectinaceous layer*); CW – Zellwand (*cell wall*); P – Plasmalemma

## 1.1. Die Kutikula

Die Kutikula übt verschiedene Funktionen aus. Neben dem Schutz vor unkontrolliertem Wasserverlust verhindert sie das Auswaschen von Aminosäuren und Zuckermolekülen (Tukey, 1970). Zusätzlich erschwert diese Barriere einen Befall durch Fraßfeinde (Walker, 1988). Durch die epikutikulären Wachse (Abb. 1.1.) wird eine hydrophobe Oberfläche geschaffen, die schlecht benetzbar ist und so die Besiedlung von Mikroorganismen und das Auskeimen von Pilzsporen erschwert (Martin und Juniper, 1970). Die Kutikula bildet außerdem eine Barriere für Mikroorganismen, so dass diese nicht in das Blatt gelangen und die Wahrscheinlichkeit einer Infektion sinkt (Hammer und Evensen, 1994). Außerdem kommt es durch diese schlecht benetzbare Oberfläche zu einem Abperlen von Wassertropfen, wodurch eine Reinigung der Oberfläche erzielt wird (Barthlott, 1990).

Die Kutikula von verschiedenen Spezies variiert stark in ihrer Dicke, welche von 30 nm (*Arabidopsis thaliana*) bis 30 µm (Frucht von *Malus domestica*) reichen kann (Schreiber und Schönherr, 2009). Die Kutikula ist der Epidermis aufgelagert und wird dort durch eine Pektinschicht fest verankert. Die Kutikula besteht vorwiegend aus dem Polymer Kutin und ein- und aufgelagerten Lipiden, die auch Wachse genannt werden.

### 1.1.1. Kutin

Das Kutin besteht in der Grundstruktur aus Di- und Trihydroxyfettsäuren der Kettenlängen C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub>, die durch Esterverbindungen miteinander verknüpft sind (Holloway 1982; Walton 1990). Das Kutin der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* unterscheidet sich allerdings von den meisten zuvor analysierten Spezies (Nawrath 2006; Schreiber und Schönherr, 2009). Das Polymer besteht aus Fettsäuren, ω-Hydroxyfettsäuren, α-ω-Disäuren, Alkoholen und 2-Hydroxysäuren (Franke *et al.*, 2005), wobei die Hauptkomponenten C<sub>16</sub>- und C<sub>18</sub>-α-ω-Disäuren in un-, einfach- und zweifachgesättigter Form sind. Diese werden durch Esterbindungen miteinander verknüpft, so dass sie mit organischen Lösungsmitteln nicht gelöst werden können. Das Kutin muss vor der chemischen Analyse mittels Gaschromatographie einer

Umesterung unterzogen werden. Generell geben diese Daten nur eine Aussage über die Zusammensetzung des Kutins und nicht über dessen Struktur. Neben den bereits erwähnten Aliphaten findet sich auch das kleine und polare Molekül Glycerin in der kutikulären Membran, welches wahrscheinlich Quervernetzungen bildet (Graca *et al.*, 2002). Zusätzlich kommen noch kleine Mengen von Polypeptiden (Schönherr und Huber, 1977), aromatische Komponenten (Hunt und Baker, 1980) und Kohlenhydrate (Wattendorff und Holloway, 1980; Dominguez und Heredia, 1999; Marga *et al.*, 2001) in der kutikulären Membran vor. Die Kohlenhydrate sind Pektin und Cellulose, die die Kutikula mit den Epidermiszellen verbinden.

Ein Teil der kutikulären Membran entzieht sich der Umesterung, was auf nicht-Esterverbindungen hinweist. Dieser Teil des Polymers wird Kutan genannt und ist wahrscheinlich durch Ether-Bindungen verknüpft (Villena *et al.*, 1999). Über diesen Bereich der Kutikula ist noch am wenigstens bekannt.

### 1.1.2. Wachse

Die kutikulären Wachse bestehen aus einem Gemisch von aliphatischen Molekülen. Auch hier variiert die Zusammensetzung je nach Spezies. Die Grundbestandteile des Blattwachses von *A. thaliana* sind Fettsäuren, Aldehyde, Alkohole und Alkane (Jenks *et al.*, 1995). Bei der Zusammensetzung des Stängelwachses sind auch Ketone, sekundäre Alkohole und Ester vorhanden, die im Blatt nur in kleinen Mengen nachzuweisen sind (Jenks *et al.*, 1995). In anderen Spezies (wie z.B. *Prunus laurocerasus*) besteht ein Großteil des Wachses aus Triterpenen (Jetter *et al.*, 2000), die bei *A. thaliana* nur in Spuren vorkommen.

Die kutikulären Wachse stellen die Transportbarriere der Kutikula dar (Schönherr 1976), was durch eine starke Zunahme der Permeabilität nach Entfernung der Wachse gezeigt werden konnte (Riederer und Schönherr, 1985; Schreiber und Schönherr, 2009).

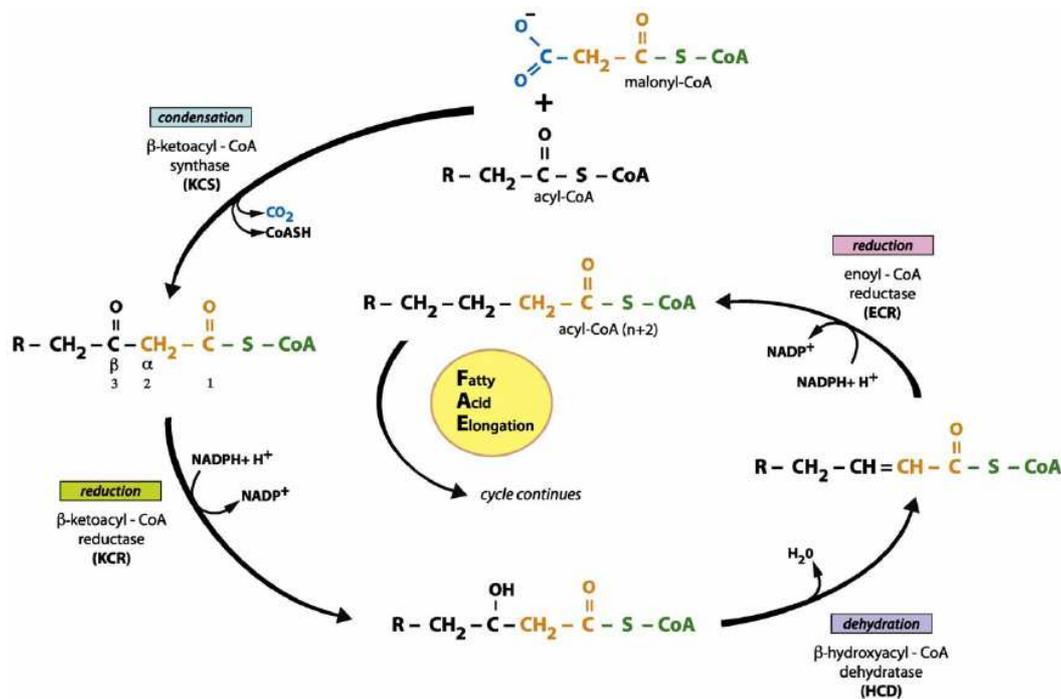
Wachse liegen in einer partiell kristallinen Struktur mit einem Grad hoher Ordnung vor (Meyer 1938, Roelofsen 1952, Sitte und Rennie 1963). Durch NMR (Kernspinresonanzspektroskopie; *nuclear magnetic resonance*) konnte gezeigt werden, dass die kutikulären Wachse aus Aggregaten gebildet werden, die aus kristallinen, fest amorphen und flüssigen Fraktionen bestehen (Reynhardt und

Riederer 1991 und 1994). Die kristallinen Bereiche sind für die permeierenden Moleküle nicht zugänglich, so dass die Diffusion im Wachs ausschließlich in den amorphen Fraktionen stattfindet. So ist das Durchdringen der Wachsbarriere für Moleküle mit einer großen Wegverlängerung verbunden.

## 1.2. Wachs- und Kutinsynthese am Beispiel von *A. thaliana*

In der Modellpflanze *A. thaliana* sind die Prozesse der Wachssynthese gut untersucht (Samuels *et al.*, 2008). Für die Aufklärung dieser Prozesse half maßgeblich ein *forward-genetic*-Ansatz, in dem Mutanten mit glänzenden Sprossachsen, so genannte *eceriferum* (*cer*) Mutanten ausgewählt wurden (Koorneef *et al.*, 1989). Diese Mutanten zeigten Veränderungen in der Wachsbelegung (Jenks *et al.*, 1995; Rashotte *et al.*, 2001). Zusätzlich wurden durch DNA Microarray-Studien (Suh *et al.*, 2005) Gene identifiziert, die zwar in den Mutanten zu Veränderungen in der Wachszusammensetzung führen, aber keinen deutlichen Phänotyp zeigen.

In der Wachssynthese werden zunächst C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub> Fettsäuren in den Leukoplasten der Epidermiszellen synthetisiert. Der Prozess spielt sich an einem Enzymkomplex, der Fettsäuresynthase (*fatty acid synthase* - FAS) ab, der alle Enzymfunktionen besitzt. Zunächst findet eine Carboxylierung von freiem Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA durch die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACCase) und die Verknüpfung eines Acetyl-CoA (C<sub>2</sub>)-Bausteins mit diesem Malonyl-Baustein (der an ein *acyl-carrier-protein* (ACP) gebunden ist) unter Abspaltung von CO<sub>2</sub> statt. Auf diesen Kondensationsschritt folgen die Reduktion der Keto-Gruppe an C<sub>3</sub> durch eine Ketoacyl-ACP-Reduktase, die Dehydratisierung des Hydroxyacylrestes durch eine Hydroxyacyl-ACP-Dehydratase und eine erneute Reduktion der Doppelbindung durch die Enoyl-ACP-Reduktase. Diese Schritte wiederholen sich dann sechs bis siebenmal bis ein C<sub>16</sub> oder C<sub>18</sub>-Baustein vorliegt (Harwood, 2005; Ohlrogge und Browse, 1995). Es sind mehrere Fettsäuresynthasekomplexe notwendig, da die Kondensierungsenzyme eine Kettenlängenspezifität zeigen (Shimakata und Stumpf, 1982). Die Ketoacyl-ACP-Synthase III (KASIII) ist für C<sub>2</sub> bis C<sub>4</sub> verantwortlich, KASI für C<sub>4</sub> bis C<sub>16</sub> und KASII für C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub>.



**Abb. 1.2. Verlängerung zu sehr langen Fettsäuren ( $\geq C_{20}$ ; *very-long-chain-fatty-acids*, VLCFA).** Der Fettsäureelongasekomplex (*fatty acid elongase*, FAE), der in der ER-Membran lokalisiert ist, synthetisiert die VLCFAs durch mehrere Zyklen, in denen jeweils ein  $C_2$ -Baustein angehängt wird. Hierfür wird durch eine  $\beta$ -ketoacyl-CoA-Synthase (KCS) unter Abspaltung von  $CO_2$  ein Malonyl-CoA angehängt. In den weiteren Schritten kommt es zu einer Reduktion durch eine  $\beta$ -Ketoacyl-Reduktase (KCR), eine Dehydratation durch eine  $\beta$ -Hydroxyacyl-Dehydratase (HCD) und einer weiteren Reduktion durch eine Enoyl-CoA-Reduktase (ECR). (aus: Kunst und Samuels, 2009)

Eine weitere Verlängerung der Fettsäuren kann erst erfolgen, wenn diese von dem Enzymkomplex gelöst werden. Dies wird durch eine Acyl-ACP-Thioesterase bewerkstelligt. Anschließend werden die Fettsäuren durch eine *long-chain*-Acyl-CoA-Synthase (LACS) mit CoA aktiviert (Joyard und Stumpf, 1981; Schnurr *et al.*, 2002) und ins Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. An dieser Stelle findet auch die Verteilung in die verschiedenen Synthesewege statt, die zu kutikulären Lipiden oder zu Membranlipiden führen kann. Wie diese Verteilung vonstatten geht ist noch nicht genau verstanden, aber eine Beteiligung mehrerer Enzyme wird vermutet.

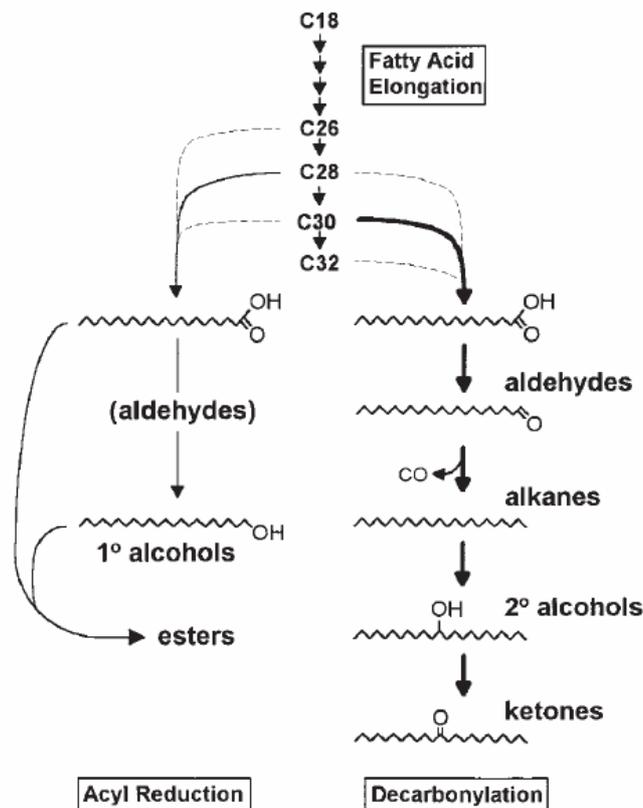
Die Verlängerung der langen Fettsäuren zu sehr langen Fettsäuren (*very long chain fatty acids*; VLCFA;  $\geq C_{20}$ ) wird durch die Fettsäureelongase (*fatty acid elongase* - FAE) durchgeführt (Abb. 1.2.), die wie FAS ein Multienzymkomplex ist und in der ER-Membran lokalisiert ist (Joubes *et al.*, 2008). In diesen Elongationszyklen werden

erneut C<sub>2</sub>-Bausteine angehängt, in diesem Fall wird freies Malonyl-CoA als Donor verwendet, welches erneut außerhalb der Plastiden durch die ACCase aktiviert wird (Baud *et al.*, 2003). Mehrere Elongationszyklen werden benötigt, um C<sub>24</sub> bis C<sub>34</sub>-Fettsäuren herzustellen. Die Kondensierungsenzyme ( $\beta$ -ketoacyl-CoA-Synthase; KCS) sind kettenlängenspezifisch, so dass auch hier mehrere Enzyme benötigt werden. CER6/CUT1 ist eine bekannte wachsspezifische KCS (Millar *et al.*, 1999; Fiebig *et al.*, 2000), wobei auch andere KCS wie FIDDLEHEAD (Yephremov *et al.*, 1999; Pruitt *et al.*, 2000) und KCS1 (Todd *et al.*, 1999) für die Formation der Kutikula wichtig sind. Zusätzlich wurden durch eine Identifikation dieser Gene in Hefe einige Kandidaten für die Enzyme gefunden, die als  $\beta$ -Ketoacyl-Reduktase (KCR), als  $\beta$ -Hydroxyacyl-Dehydratase (HCD) und als Enoyl-CoA-Reduktase (ECR) fungieren (Denic und Weissman, 2007; Kohlwein *et al.*, 2001; Beaudoin *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2002). Als KCR wurden zwei Orthologe zu den Hefe-Genen gefunden, von denen allerdings nur ein Gen (*KCR1*) für eine funktionierende KCR kodiert (Beaudoin *et al.*, 2009). Das Gen *PASTICCINO2* (*PAS2*) kodiert als einziges Gen für eine HCD (Bach *et al.*, 2008). Die beiden Gene *KCR1* und *PAS2* sind essentiell für die Pflanze. Fallen diese Gene komplett aus, hat dies letale Folgen für den Embryo. Das Gen *CER10* kodiert für das einzige Ortholog der Hefe ECR *TSC13*. Bei einem *knockout* dieses Gens in *A. thaliana* akkumuliert die Mutante *cer10* trotz allem Wachskomponenten (Zheng *et al.*, 2005), was darauf hindeutet, dass weitere ECRs vorhanden sind. Diese sind strukturell wahrscheinlich sehr unterschiedlich, können aber die Funktionen von CER10 übernehmen.

Ab diesem Punkt gibt es zwei Wege, den die Fettsäuren einschlagen können. Dies ist zum einen der Acyl-Reduktionsweg (Abb. 1.3.). Auf diesem Weg entstehen primäre Alkohole mit Kettenlängen zwischen C<sub>24</sub> und C<sub>34</sub> und deren Ester. Als Zwischenschritt zwischen Säuren und Alkoholen werden Aldehyde gebildet (Kolattukudy, 1971). Die Fettsäure-CoA-Reduktase CER4 ist für die Bildung der Alkohole zuständig (Rowland *et al.*, 2006) und eine bifunktionale Wachs Synthase/Acyl-CoA:diacylglycerol Acyltransferase WSD1 ist für die Bildung der Ester zuständig (Lai *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008).

Die zweite Möglichkeit für die Fettsäuren ist der Decarboxylierungsweg (Abb. 1.3.). Am Ende dieses Syntheseweges stehen im Blatt die Alkane, die in der Regel eine ungrade Anzahl an C-Atomen besitzen. Im Stängel ist das Enzym MAH1 (*midchain-alkane-hydroxylase*; Greer *et al.*, 2007) aktiv, welches noch die Synthese von

Ketonen und sekundären Alkoholen aus Alkanen katalysiert. Der erste Schritt, der über Aldehyde zu Alkanen führt ist noch weitestgehend unverstanden. Die Proteine CER1 (Aarts *et al.*, 1995), CER2 (Xia *et al.*, 1996), und CER3/WAX2/YRE/FLP (Chen *et al.*, 2003; Rowland *et al.*, 2007) haben einen Effekt auf die Alkanmenge, ihre genaue Funktion ist jedoch unbekannt. Trotz fehlender experimenteller Belege wird angenommen, dass Alkane durch den Verlust und nicht durch das Anhängen eines C-Atoms an eine Kohlenstoffkette mit gerader Anzahl von C-Atomen entstehen. Hierbei würde die Decarboxylierung mit Verlust von CO über ein Aldehyd-Intermediat vonstatten gehen.



**Abb. 1.3. Schematische Darstellung der Wachssynthese im Stängel von *A. thaliana*.** Die VLCFAs werden in zwei Biosynthesewegen zu anderen Wachskomponenten umgewandelt. Der Decarbonylierungsweg führt zu Aldehyden, Alkanen, sekundären Alkoholen und Ketonen. Der Acyl-Reduktionsweg führt zu Alkoholen und Estern. Die Dicke der Pfeile symbolisiert die Menge, die umgesetzt wird. (aus: Millar *et al.*, 1999)

Die Wachskomponenten werden dann wahrscheinlich über Golgi-vermittelten-Vesikeltransfer oder über Verbindungen zwischen ER und Plasmamembran (PM) zu den Transportern der PM transportiert. Die Transporter, die vermutlich für den Export der Wachskomponenten verantwortlich sind, gehören zur Gruppe der *ATP-binding-cassette*-(ABC)-Transporter von der Gruppe der ABCG/WHITE-BROWN-COMPLEX (WBC)-Unterfamilie. Zu den Transportern gehören CER5 (WBC12; Pighin *et al.*, 2004; Bird, 2008) und DESPERADO (WBC11; Bird *et al.*, 2007; Panikashvili *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2007; Bird, 2008). Beide Transporter sind in der Plasmamembran der Epidermiszellen lokalisiert. Die Mutanten, die Defekte in den entsprechenden Genen besitzen, zeigen einen reduzierten Wachsgehalt. Die *desperado*-Mutanten weisen zusätzlich einen Effekt im Kutin auf.

Wenn die Substanzen aus den Epidermiszellen exportiert werden, müssen sie durch die Zellwand gebracht werden. Diese Aufgabe übernehmen vermutlich *Lipid Transfer Proteine* (LTPs) (De Bono *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009).

Die Regulation der Wachssynthese wird auch durch Transkriptionsfaktoren beeinflusst, über die bisher noch nicht viel bekannt ist. Allerdings kennt man die Wirkung bei einer Überexpression des Transkriptionsfaktors WAX INDUCER (WIN)/SHINE1 (SHN1), der in der entsprechenden Mutante zu einer hohen Wachsbelegung führt (Aharoni *et al.*, 2004; Broun *et al.*, 2004; Kannangara *et al.*, 2007). SHN induziert wachsrelevante Gene wie z.B. *CER1* (Aarts *et al.*, 1995), *CER2* (Xia *et al.*, 1996) und *KCS1* (Todd *et al.*, 1999) und sorgt so für eine besonders hohe Alkanmenge im Wachs der Mutante. In dieser Mutante gibt es auch noch einen Effekt in der Kutinbelegung.

Als weiterer Regulationsmechanismus wurde die CER7 Ribonuclease entdeckt (Hooker *et al.* 2007), die als Untereinheit des Exosoms fungiert. Die Aufgabe von CER7 ist der Abbau eines negativen Regulators für die Expression des Gens *WAX2/CER3/YRE/FLP*. Aktivität von CER7 aktiviert die *WAX2/CER3/YRE/FLP* Expression.

Die Kutinsynthese ist weniger erforscht und auch die wirkliche Struktur von Kutin ist noch weitestgehend unbekannt. Es konnten allerdings schon einige Enzyme identifiziert werden, die in der Kutinsynthese eine wichtige Rolle spielen (Pollard *et al.*, 2008). Hierzu zählen Fettsäureoxidasen der Cyp86-Familie (Benveniste *et al.*, 1998; Rupasinghe *et al.*, 2007; Wellesen *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2004; Li *et al.*,

2007; Molina *et al.*, 2008), Acyl-aktivierende Enzyme der LACS-Familie (Schnurr *et al.*, 2004; Bessire *et al.*, 2007) und Acyltransferasen der GPAT-Familie (Li *et al.*, 2007). Die Reihenfolge der Enzymreaktionen und somit auch deren Substrate sind noch nicht bekannt. Die Mutanten *hothead* (Kurdyokov *et al.*, 2006a) und *bodyguard* (*bdg*) (Kurdyokov *et al.*, 2006b) zeigen Probleme bei der Ausbildung der Kutikula und die entsprechenden Proteine sind wahrscheinlich ebenfalls in Kutinsynthese oder -zusammenbau aktiv.

Der Transport der Kutinbestandteile findet wahrscheinlich durch den Transporter DESPERADO (WBC11; Panikashvili *et al.*, 2007; Bird *et al.*, 2007) statt, der sowohl für eine intakte Wachs- als auch Kutinbelegung wichtig zu sein scheint. Es ist allerdings noch nicht klar, ob die einzelnen Oligomere des Polymers intra- oder extrazellulär zusammengesetzt werden.

Der Transkriptionsfaktor SHN1/WIN1 spielt auch in der Kutinsynthese eine wichtige Rolle. Er hat einen Effekt auf Gene, die im Kutinmetabolismus wichtig sind, wie z.B. *LACS2*, *GPAT4* und *CYP86A4* (Kannangara *et al.*, 2007).

### 1.3. Transporteigenschaften der Kutikula

Die Transporteigenschaften der Kutikula wurden bereits bei verschiedenen Spezies untersucht. In den meisten Fällen wurde mit isolierten Kutikularmembranen gearbeitet (Kerler *et al.*, 1984; Chamel, 1986; Bukovac and Petracek, 1993; Coret *et al.*, 1993; Baur und Schönherr, 1995), die leicht zu handhaben sind und sich außerdem lange lagern lassen. Der größte Vorteil ist allerdings, dass sie durch die Abwesenheit von Stomata (durch selektive Auswahl der astomatären Blattoberseite von verschiedenen Spezies) auch für Messung der Wasserpermeabilität genutzt werden können. Außerdem können hier verbundene Stichproben untersucht werden, da eine Kinetik über mehrere Messzeitpunkte mit der gleichen Kutikularmembran möglich sind. Allerdings lassen sich nicht von allen Spezies Kutikularmembranen isolieren. So wurde auch mit intakten Blättern bereits erfolgreich Permeabilitäten bestimmt (Schönherr und Bukovac, 1978; Silcox und Holloway, 1986; Schreiber und Schönherr, 1992a und b und 1993). Diese Methode besitzt den Vorteil, dass sie als realitätsnäher gilt als die Experimente mit den isolierten Kutikularmembranen, wobei gezeigt werden konnte, dass die Permeabilitäten von isolierten Kutikularmembranen

und von intakten Blättern sich nicht signifikant voneinander unterscheiden (Kirsch *et al.*, 1997). Der Nachteil der intakten Blätter ist das Vorhandensein von Stomata, die verhindern, dass Wasserpermeabilitäten bestimmt werden können und außerdem kann hier nicht mit verbundenen Stichproben gearbeitet werden, was bei der statistischen Auswertung Nachteile bringt.

Bei *A. thaliana* wurde Permeabilität bisher über verschiedene Methoden bestimmt. Eine häufig verwendete Methode ist das *Chlorophyll Leaching* (Aharoni *et al.*, 2004; Lolle *et al.*, 1997; Schnurr *et al.*, 2004; Sieber *et al.*, 2000), bei der mit Ethanol (80%) das Chlorophyll der Blätter ausgewaschen wird. Die Färbung der Blätter mit dem hydrophilen Farbstoff Toluidin Blau wird ebenfalls genutzt (Tanaka *et al.*, 2004). Dieser bindet an das Pektin der Zellwand und zeigt eine blaue Färbung, wenn die Kutikula keine effektive Barriere für ihn darstellt. Als weitere Methoden werden Austrocknungsexperimente von einzelnen Organen (Blätter und Stängel) durchgeführt (Aharoni *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2003; Millar *et al.*, 1999). Außerdem wird die erhöhte Sensibilität gegenüber Herbiziden (Bessire *et al.*, 2007) und gegenüber Pathogenen (Bessire *et al.*, 2007; Mang *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2004) wie dem Pilz *Botrytis cinerea* und dem Bakterium *Pseudomonas syringae* getestet. Die postgenitalen Organfusionen einiger Mutanten an Blättern und Blüten zeigen eine Veränderung der Kutikula an (Lolle *et al.*, 1997; Sieber *et al.*, 2000; Yephremov *et al.*, 1999), die ermöglicht, dass zwei Gewebe miteinander fusionieren. Diesen Methoden fehlt klar ein quantitativer Charakter, durch den erst die Bestimmung von Leitwerten und die Vergleiche mit anderen Spezies und mit Mutanten aus verschiedenen Experimenten ermöglicht wird. So ist es dringend notwendig, dass ein Permeationsassay für *A. thaliana* erstellt wird, mit dem Permeabilität in Form von Leitwerten bestimmt werden kann (Kerstiens, 2006; Schreiber, 2010).

#### **1.4. Ziel dieser Arbeit**

Es soll ein Permeationsassay für intakte Blätter von *A. thaliana* erstellt werden, der den Vergleich von *A. thaliana* mit den in der Vergangenheit untersuchten isolierten Kutikularmembranen (z.B. *P. laurocerasus*) erlaubt. Hierfür soll die Aufnahme eines radioaktiv markierten Moleküls bestimmt werden und Leitwerte berechnet werden. Für die Experimente soll das systemische Fungizid <sup>14</sup>C-Epoxyconazol genutzt

werden, mit dem Aufnahmeexperimente, Desorptionsmessungen und Metabolisierungsmessungen durchgeführt werden sollen.

Von großem Interesse sind generell Permeationsdaten für Wasser, da die Versorgung der Pflanze mit diesem lebenswichtigen Molekül von ökologischer Bedeutung ist. Da eine Messung der Aufnahme von radioaktiv markiertem Wasser aufgrund der Stomata an intakten Blättern von *A. thaliana* nicht möglich ist, werden isolierte Kutikularmembranen von bereits etablierten Spezies (*P. laurocerasus*, *Citrus aurantium*, *Hedera helix* und *Capsicum annum*) gewählt, um durch Co-Permeationsexperimente den Zusammenhang zwischen der Durchlässigkeit von Epoxiconazol und Wasser herzustellen. Dieser Zusammenhang wurde bereits für andere Substanzen gezeigt (Niederl *et al.*, 1998) und soll hier für Epoxiconazol etabliert werden.

Der Permeationsassay erlaubt es, Permeabilität für verschiedene Mutanten zu bestimmen. Es sollen Eigenschaften der Barrieren der Kutikula-Mutanten von *A. thaliana* (*knockout*- und Überexpressionsmutanten sowie eigens hergestellte Mutanten, welche in ihren Wachs- und/oder Kutin-Eigenschaften beeinflusst sind) charakterisiert werden. Die chemische Zusammensetzung der Wachse und des Kutins dieser Mutanten sollen mit den Permeationsdaten in Verbindung gebracht werden, so dass die physiologischen Eigenschaften der Kutikula genauer verstanden werden können.

Das genauere Verständnis, welche Gene einen großen Einfluss auf die Permeabilität haben, wird für die Zukunft im Nutzpflanzenanbau interessant werden, um Pflanzen mit erhöhter Trockentoleranz oder Pathogenresistenz zu erstellen. Zusätzlich können diese Daten auch für das allgemeine Verständnis der Permeabilität von Nutzen sein, wenn neue Chemikalien zur Schädlingsbekämpfung entwickelt werden.

Für diesen Ansatz wurden Mutanten gewählt, die an verschiedenen Stellen im Wachssyntheseweg Defekte aufweisen. Es wurden Mutanten mit reduziertem Wachsgehalt gewählt. Hierzu zählen die Mutanten *wax2*, *cer3* und *yre*, die einen Defekt im Gen At5g57800 besitzen (Chen *et al.*, 2003; Rowland *et al.*, 2007), welches für ein Protein unbekannter Funktion kodiert. Die Mutante *cer5* besitzt einen Defekt im Gen At1g51500 (Pighin *et al.*, 2004; Bird, 2008), das für einen ABC-Transporter kodiert. Dieser ist wahrscheinlich für den Export der Wachskomponenten aus den Epidermiszellen zuständig. Die Mutante *cut1* besitzt einen Defekt im Gen

At1g68530 (Millar *et al.*, 1999; Fiebig *et al.*, 2000), das für ein Protein kodiert, welches im Elongationsprozeß involviert ist. In der Mutante kommt es zu einem Kettenlängeneffekt, bei dem sich die C<sub>24</sub>-Bestandteile anreichern. Ebenfalls im Elongationsprozeß involviert ist das Protein CER10 (Zheng *et al.*, 2005). Die entsprechende Mutante *cer10* mit einem Defekt im Gen At3g55360 zeigt keinen Kettenlängeneffekt, besitzt aber ebenfalls weniger Wachs.

Zusätzlich sollen auch Mutanten mit mehr Wachs untersucht werden. Hierfür wurde die Überexpressionsmutante für das Gen At1g15360 *shn1/win1* (Aharoni *et al.*, 2004; Broun *et al.*, 2004; Kannangara *et al.*, 2007) gewählt. Das entsprechende Protein gehört zu einer Gruppe von AP2/EREBP Transkriptionsfaktoren, die Effekte auf die Wachs- und Kutinsynthese besitzen. Die Mutante *shn3* (Aharoni *et al.*, 2004) ist ebenfalls eine Überexpressionsmutante für das Gen einer dieser Transkriptionsfaktoren (At5g25390) und besitzt genau wie *shn1* eine höhere Wachsbelegung. Als dritte Mutante mit erhöhter Wachsbelegung wurde *bdg* gewählt, die einen Defekt im Gen At1g64670 besitzt (Kurdyukov *et al.*, 2006b). Das zugehörige Protein sorgt wahrscheinlich für den Polymeraufbau der Kutikula und hat Effekte in der Wachs- und Kutinzusammensetzung.

Als letzte Mutante wurde *aberrant induction of type three genes1 (att1)* gewählt, die einen Defekt im Gen At4g00360 besitzt, welches für die Cytochrom-P<sub>450</sub>-Monooxygenase CYP86A2 kodiert, die als Fettsäureoxidase fungiert (Xiao *et al.*, 2004). Bei dieser Mutante gibt es keinen Effekt auf die Wachsbelegung, aber Veränderungen in Kutinmenge und -zusammensetzung.

Zusätzlich sollen noch eigene transgene Pflanzenlinien erstellt werden. Das Gen CYP703A2 soll unter Kontrolle des epidermisspezifischen Promotors<sub>CUT1</sub> und des konstitutiv exprimierten Promotors<sub>35S</sub> in Pflanzen eingebracht werden. CYP703A2 (Morant *et al.*, 2007) ist eine Cytochrom-P<sub>450</sub>-Monooxygenase, die eine *in-chain*-Hydroxylierung in Fettsäuren durchführt. Sie kommt in *A. thaliana* im Pollen vor und ist in der Sporopollenin-Synthese involviert. Das Gen CYP703A2 ist im Wildtyp nicht im Blatt exprimiert, so dass durch dessen Expression die Kutikula des Blattes verändert werden soll. Bei erfolgreicher Veränderung der Wachs- und/oder Kutinzusammensetzung kann überprüft werden, inwieweit sich diese Hydroxylierungen auf die Barriere auswirken.

---

## **2. Material und Methoden**

## 2.1. Radioaktive Methoden

### 2.1.1. Pflanzenmaterial für radioaktive Methoden

- *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand; Blatt)
- *Prunus laurocerasus* (Kirschlorbeer; Blatt)
- *Citrus aurantium* (Bitterorange; Blatt)
- *Hedera helix* (Efeu; Blatt)
- *Capsicum annuum* (Paprika; Frucht)

*A. thaliana* Wildtypen:

- Col-8 (*Columbia-8*, Salk-Institut)
- Col-0 (*Columbia-0*, L. Kunst, Kanada; Referenz: Rowland *et al.*, 2007)
- Ws (*Wassilewskija*, A. Aharoni, Israel; Referenz: Aharoni *et al.*, 2004)
- Ler (*Landsberg erecta*, H. Saedler, Köln; Referenz: Faust, 2006)

*A. thaliana* Mutanten:

- *shn1/win1* (Überexpression At1g15360; Referenz: Aharoni *et al.*, 2004)
- *shn3* (Überexpression At5g25390; Referenz: Aharoni *et al.*, 2004)
- *cer5* (*knockout* At1g51500; Referenz: Pighin *et al.*, 2004)
- *bdg* (*knockout* At1g64670; Referenz: Kurdyukov *et al.*, 2006)
- *cut1/cer6* (*knockout* At1g68530; Referenz: Millar *et al.*, 1999)
- *cer10* (*knockout* At3g55360; Referenz: Zheng *et al.*, 2005; Faust, 2006)
- *att1* (*knockout* At4g00360; Referenz: Xiao *et al.*, 2004)
- *wax2/cer3/yre* (*knockout* At5g57800; Referenz: Chen *et al.*, 2003; Rowland *et al.*, 2007; Kurata *et al.*, 2003)

#### 2.1.1.1. Ernte von *P. laurocerasus*, *C. aurantium*, *H. helix* und *C. annuum* und Isolierung der Kutikularmembranen

Blätter von *P. laurocerasus* und *H. helix* wurden im Sommer 2007 und 2008 in einer ländlichen Gegend außerhalb Bonns geerntet. Blätter von *C. aurantium* wurden von

Pflanzen in Töpfen geerntet. Früchte von *C. annuum* wurden in einem Lebensmittelladen gekauft.

Für die durchgeführten Experimente wurden Kutikularmembranen nach folgendem Protokoll isoliert (Schönherr und Riederer, 1986):

### Enzymlösung

10<sup>-2</sup> M Zitronensäuremonohydrat (Roth; Karlsruhe, Deutschland)

2 % Cellulase (Novozymes, Dänemark)

2 % Pektinase (Novozymes, Dänemark)

0,1 % NaN<sub>3</sub> Natriumazid (1M) (Roth; Karlsruhe, Deutschland)

pH-Wert mit KOH auf 3 einstellen

### Borax-Lösung

10<sup>-2</sup> M Natriumtetraborat (Fluka; Taufkirchen, Deutschland)

pH-Wert 9

Nachdem die abaxiale Seite der Blätter markiert wurde, wurden Blattscheiben mit dem Korkbohrer ausgestanzt. Die Gewebescheiben wurden mit Enzymlösung infiltriert und ein paar Tage in der Lösung inkubiert. Wenn die Zellwandreste von der Kutikularmembran abgelöst waren, konnten diese in Boraxpuffer überführt werden. Die Kutikularmembranen wurden unter Luftdruck getrocknet und in Petrischalen bei Raumtemperatur verwahrt.

### **2.1.1.2. Anzucht von *A. thaliana* auf Erde**

*A. thaliana* wurde auf Einheitserde (Floradur Typ1, Floragard, Oldenburg) in einer Klimakammer bei 22 °C, 100 µE m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> Lichtintensität und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h angezogen. Die Erde wurde zu Beginn mit Dünger (Flory 3 verde, Plante, Regenstauf) und dem Insektizid Confidor (Confidor Wg70, Bayer CropScience, Langenfeld) behandelt. Die Töpfe wurden für die ersten Tage mit einer Plastikhaube abgedeckt, um die Keimung der Samen durch eine höhere Luftfeuchtigkeit zu erleichtern.

### 2.1.2. Material und Herstellung radioaktiver Donorlösungen

Für die Aufnahmeexperimente mit *A. thaliana* wurde  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol (BASF, Ludwigshafen; Abb. 2.1.) verwendet, welches in milliQ<sup>TM</sup>-H<sub>2</sub>O gelöst wurde. Die Donorlösung wurde auf  $2 \cdot 10^{11}$  dpm·m<sup>3</sup> (dpm, *disintegrations per minute*, Zerfall pro Minute) eingestellt.

Für die Permeationsstudien mit *P. laurocerasus*, *C. aurantium*, *H. helix* und *C. annuum* wurden Donorlösungen für  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol ( $2 \cdot 10^{12}$  dpm·m<sup>-3</sup>) und  $^3\text{H}_2\text{O}$  ( $1 \cdot 10^{12}$  dpm·m<sup>-3</sup>; Hartmann Analytik, Braunschweig) erstellt.

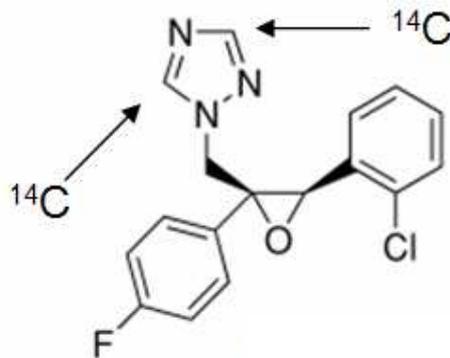


Abb. 2.1. **Schematische Darstellung von Epoxiconazol.** Mit den Pfeilen sind die radioaktiv markierten Kohlenstoffatome gekennzeichnet. (Bild modifiziert nach [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com))

### 2.1.3. Quantitativer Permeationsassay für intakte Blätter von *A. thaliana*

Frisch geerntete Blätter von *A. thaliana* wurden in eine radioaktive Donorlösung mit  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol (2.1.2.; 50 ml) gegeben und auf einer Rollbank (60 rpm) bei 25 °C inkubiert. Pro Versuch wurden neun Blätter eingesetzt und nach 5, 10 und 15 min jeweils drei Blätter aus der Donorlösung entfernt, kurz in Wasser getaucht, um oberflächlich haftenden Donor zu entfernen und dann noch kurz mit einem weichen Papier abgetrocknet. Aus den so beladenen Blättern wurden pro Zeitpunkt ca. 20 Blattscheiben (BS) mit einem Durchmesser von 5 mm ausgestanzt und jeweils eine BS in ein Szintillationsgefäß gegeben. Mit Soluene-350 (250 µl; Perkin Elmer LAS, Rodgau) wurden die BS für 3 h inkubiert und so das Gewebe zerstört, so dass die Radioaktivität in Lösung ging. Zu den Proben wurde Szintillationscocktail (Ultima

Gold XR, Perkin Elmer) gegeben und erneut für 1 h inkubiert und anschließend in einem Szintillationscounter (Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2800TR, Perkin Elmer) gemessen.

Wichtig für das Experiment ist die konstant bleibende Konzentration der Donorlösung, die vor und nach dem Experiment gemessen wurde. Aufgrund des großen Volumens an externem Donor und der kurzen Aufnahmezeiten blieben die Donorkonzentrationen konstant, obwohl messbare Mengen von radioaktiver Lösung in die Blätter diffundiert sind.

Menge an Radioaktivität per BS (dpm) wurde gegen die Inkubationszeit aufgetragen und eine Regressionsgrade konnte erstellt werden (Abb. 3.1.a). Der Leitwert  $P$  ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) kann Formel 2.1. und der Steigung der Regressionsgraden bestimmt werden:

$$P = \frac{F}{(\Delta c \cdot A)} \quad (\text{Formel 2.1.})$$

Der Fluß  $F$  (hier:  $\text{dpm}\cdot\text{min}^{-1}$ ) wird durch die treibende Kraft  $\Delta c$  ( $\text{dpm}\cdot\text{m}^{-3}$ ) und durch die Fläche  $A$  ( $39.3 \text{ mm}^2 = 39.3\cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ ) geteilt. Für die Fläche  $A$  muss beachtet werden, dass die Aufnahme auf beiden Seiten des Blattes stattgefunden hat. Für die treibende Kraft gilt die Konzentrationsdifferenz zwischen Donor (Donorlösung) und Receiver (das Innere des *Arabidopsis*-Blattes). Zur Berechnung wird die Donorkonzentration verwendet, da es dort keine Konzentrationsänderungen gibt. Der Leitwert wird in  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  und der Fehler als Standardabweichung (Sa) oder Vertrauensbereich (95 %) angegeben. Um zwei Leitwerte auf signifikante Unterschiede zu testen, muss zunächst die Verteilung der Rohdaten (Abb. 3.1.b) betrachtet werden. Diese wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test (mit dem Statistikprogramm R) und einem Probability Plot (mit SigmaPlot 10.0) auf Normalverteilung getestet. Der Shapiro-Wilk-Test zeigt die Irrtumswahrscheinlichkeit an, mit der eine Normalverteilung vorliegt (mit  $p < 0,05$  sind die Werte signifikant unterschiedlich von einer Gauß-Verteilung). Der Probability Plot ist eine graphische Methode, um einen Test auf Normalverteilung durchzuführen. Die Werte sollten bei einer Gauß-Verteilung auf einer Linie liegen.

Sind diese normal verteilt, kann der *t-test* (mit excel) verwendet werden. Liegt allerdings keine Gauß-Verteilung vor, wird der *Mann-Whitney U Test* verwendet (<http://elegans.swmed.edu/~leon/stats/utest.html>).

Für einen Test auf Infiltration wurde der Donorlösung 1 % Silwet L-77 hinzugefügt. Dieses sorgt für eine Herabsetzung der Oberflächenspannung auf weniger als 35 mN·m<sup>-1</sup> und führt so eine Infiltration der Stomata herbei.

#### 2.1.4. Desorptionsexperiment für *A. thaliana*

Die Blätter von *A. thaliana* wurden wie im Aufnahmeexperiment (2.1.3.) für 5, 10 und 15 min mit <sup>14</sup>C-Epoxiconazol beladen. Nach den Inkubationszeiten wurde das aufgenommene <sup>14</sup>C-Epoxiconazol wieder aus den Blättern ausgewaschen. Dies wurde in 20 ml H<sub>2</sub>O durchgeführt, welches regelmäßig gewechselt wurde (0,01, 1, 5, 15, 30, 60 und 120 min). In dem ersten Schritt (0,01 min) wurde die Oberflächenradioaktivität abgewaschen. Die Radioaktivität im Desorptionsmedium konnte gemessen werden und die Blätter wurden am Ende der Experimentreihe in Soluene-350 verdaut und die verbleibende Radioaktivität ermittelt.

Die Mengen an <sup>14</sup>C-Epoxiconazol wurden bestimmt, in dem die desorbierte Menge an Radioaktivität aufaddiert wurde. Hierfür wurde auch die verbleibende Radioaktivität im Blatt bedacht. Die Auftragung der relativen Werte gegen die Desorptionszeiten ergab eine nicht-lineare Desorptionskinetik.

Zusätzlich wurde eine Kompartiment-Analyse durchgeführt (*regression wizard* von SigmaPlot 10.0; Systat, Erkrath), wobei mit der Formel 2.2. zwei Kompartimente und Geschwindigkeitskonstanten mit einem guten Bestimmtheitsmaß (besser als 0,99) bestimmt wurden.

$$M_t/M_0 = C_1(1 - e^{-k_1 \cdot t}) + C_2(1 - e^{-k_2 \cdot t}) \quad (\text{Formel 2.2.})$$

C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> repräsentieren die relative Größe von zwei Kompartimenten von *Arabidopsis*-Blättern und k<sub>1</sub> und k<sub>2</sub> (min<sup>-1</sup>) repräsentieren die korrespondierenden Geschwindigkeitskonstanten von den zwei Kompartimenten.

### 2.1.5. Metabolisierungsexperiment

Ein kleines Becherglas mit Donorlösung und Blattmaterial (6 Blattscheiben, ein komplettes Blatt oder kein Blattmaterial) wurde offen in ein größeres Gefäß gestellt, welches verschlossen wurde, um den Verlust von  $^{14}\text{CO}_2$  zu verhindern (Abb. 2.2.). Potentiell entweichendes  $^{14}\text{CO}_2$  wird mit KOH zu  $\text{K}_2^{14}\text{CO}_3$  und  $\text{H}_2\text{O}$  umgesetzt. Die KOH-Lösung selbst ist durch das natürlich vorkommende Isotop  $^{40}\text{K}$  radioaktiv, so dass diese vorher gemessen wurde, um die Hintergrundradioaktivität zu bestimmen. Dann wurde nach verschiedenen Zeitabständen KOH-Lösung entnommen und diese nach Zugabe von Szintillationscocktail gemessen. Das Blattmaterial wurde mit Soluene-350 zersetzt und nach Zugabe von Szintillationscocktail gemessen.

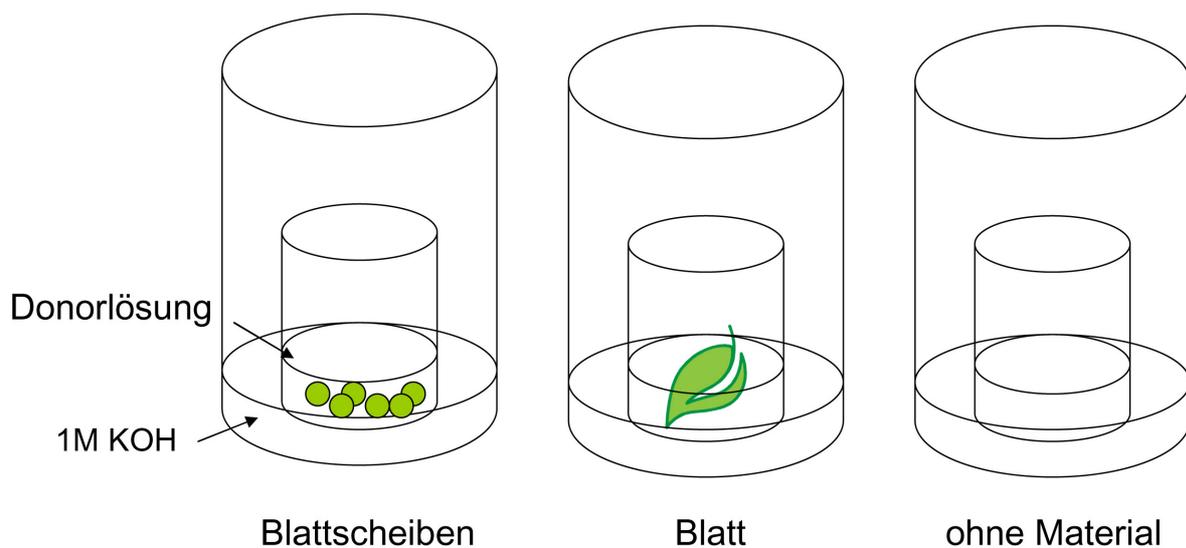


Abb. 2.2. **Aufbau des Metabolisierungsexperiments.** Ein kleines Becherglas mit Donorlösung und Blattmaterial wurde in einen abgeschlossenen Behälter mit KOH gestellt. Es wurde regelmäßig KOH entnommen und gemessen, ob Radioaktivität aufgenommen wurde.

### 2.1.6. Co-Permeationsexperiment für isolierte Kutikularmembranen von *P. laurocerasus*, *C. aurantium*, *H. helix* und *C. annuum*

Co-Permeabilität wurde bestimmt wie in Niederl *et al.*, 1998. Kutikularmembranen wurden von der Oberseite von *P. laurocerasus*, *C. aurantium*, und *H. helix* Blättern und der Frucht von *C. annuum* isoliert (2.1.1.1.) und wurden zwischen die zwei

Hälften der Transportkammer gespannt, so dass die physiologische Innenseite zum *Receiver*kompartiment und die physiologische Außenseite zum Donorkompartiment orientiert waren. Die Kontaktflächen der Kammern wurden vor dem Einsetzen der Kutikula mit Silikonfett bestrichen, um so für eine bessere Abdichtung zu sorgen und ein Auslaufen der Kammern zu vermeiden. Die beiden Hälften der Transportkammern wurden nach dem Zusammenbauen mit Klebeband fixiert. Auf der *Receiver*seite konnte durch eine verschließbare Öffnung die Lösung ausgetauscht werden. Hierfür wurde eine 1 ml Hamilton Spritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) verwendet.

Zu Beginn der Messung wurden 800 µl Donorlösung aus  $^3\text{H}_2\text{O}$  and  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol (2.1.2.) in das Donorkompartiment und 800 µl Phospholipid Suspension (PLS, 1 % Sojalecithin in Wasser; Roth, Karlsruhe) in das *Receiver*kompartiment gegeben. Das PLS bildet in wässriger Lösung Micellen aus und besitzt so ein lipophiles Kompartiment, das als Falle für das  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol wirkt. So konnte dessen Konzentration minimal und die treibende Kraft maximal gehalten werden.

Die Transportkammern wurden während des Experiments bei 25 °C auf einer Rollbank (60 rpm) inkubiert. Nach bestimmten Zeitabschnitten wurde die *Receiver*lösung entnommen und durch frische Lösung ersetzt. Die entnommene Lösung konnte nach Zugabe von 5 ml Szintillationscocktail im Szintillationscounter gemessen werden. Zusätzlich wurde die Donorkonzentration vor und nach dem Experiment bestimmt, um zu zeigen, dass es keine signifikanten Konzentrationsänderungen gegeben hat.

Für jede Kutikula und jeden Probenzeitpunkt wurden die Mengen von  $^3\text{H}$ -Wasser and  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol bestimmt und gegen den Probenzeitpunkt aufgetragen. Die so erstellten Regressionsgraden wurden genutzt, um den Leitwert mit Formel 2.1. zu bestimmen.

## **2.2. Bekannte Methoden der Permeabilitätsbestimmung bei *A. thaliana***

### **2.2.1. Trockenexperiment**

Die Blätter von vier Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen wurden abgetrennt und die Blätter eingescannt. So konnte eine Größenbestimmung der Fläche mit Hilfe von

Photoshop 7.0 stattfinden. Die Blätter wurden über Silicagel (Luftfeuchtigkeit 0 %) getrocknet und deren Gewichtsverlust mit der Waage dokumentiert.

### 2.2.2. Chlorophyll Leaching

Die Blätter von vier Wochen alten Pflanzen wurden abgetrennt und die Fläche zur Größenbestimmung gescannt und gewogen. Jeweils drei Parallelen mit zehn Blättern wurden in Gefäße gegeben und mit 80 % EtOH versetzt. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde 1 ml entfernt und im Photometer bei einer Absorption von 647 und 664 nm gemessen. Die Formel 2.3. wurde für die Bestimmung der Chlorophyll Menge verwendet.

$$\text{Chlorophyll Menge} \left( \frac{\text{mg}}{\text{l}} \right) = 17,76 \cdot A_{647} + 7,01 \cdot A_{664} \quad (\text{Formel 2.3.})$$

### 2.2.3. Toluidin Blau

Die Färbung mit Toluidin Blau (Toloniumchlorid, Abb. 2.3.) funktioniert durch den hydrophilen Charakter des Farbstoffes. Dieser bindet an das Pektin der Zellwand, wenn die Kutikula defekt ist und diesen Farbstoff ungehindert passieren lässt (Tanaka *et al.*, 2004).

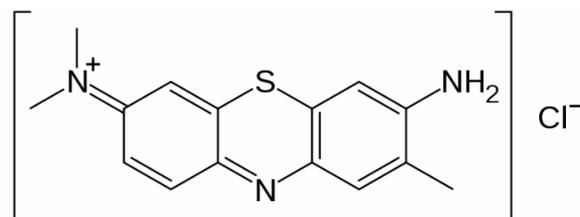


Abb. 2.3. **Schematische Darstellung der chemischen Struktur von Toluidin Blau.** Dieser hydrophile Farbstoff bindet an das Pektin der Zellwand, wenn eine defekte Kutikula ihn ungehindert passieren lässt.

Die Blätter werden 2 und 10 min in einer 0,05 % Toluidin-Blau-Lösung inkubiert und anschließend mit Leitungswasser abgewaschen. Danach wurden die Blätter unter dem Binokular betrachtet.

### **2.3.. Chemische Analyse von Wachs und Kutin mittels Gaschromatographie**

#### **2.3.1. Wachs-Extraktion von *A. thaliana* Blättern**

Um Wachse von Blättern zu extrahieren wurden diese für 10 s in Chloroform (für Analyse  $\geq 99$  %; Merck, Darmstadt) getaucht. Die Gläser, die für die Analytik verwendet wurden, mußten zuvor gut mit Chloroform gespült werden, um eventuelle Rückstände abzuwaschen. Es wurden fünf Parallelen mit je zehn Blättern angefertigt. Nachdem die Blätter in Chloroform getaucht wurden, wurden diese eingescannt und die Flächen mit Hilfe von Photoshop 7.0 (Adobe Systems GmbH, München) bestimmt. Die Blätter können für eine Kutinextraktion (2.3.2.) verwahrt werden.

Die Proben wurden direkt nach der Extraktion mit einem internen Standard versehen. Bei Wachsen wurde Tetracosan verwendet ( $C_{24}$ -Alkan; 10  $\mu$ g). Die Proben wurden in einem Stickstoff-Strom eingengt und nach der Derivatisierung (2.3.4.) per Gaschromatographie (2.3.5.) analysiert.

#### **2.3.2. Kutinextraktion von *A. thaliana* Blättern**

Für die Kutinanalysen wurden die Blättern zunächst für zwei Wochen in Chloroform-Methanol (1:1; v/v; MeOH pro analysi; Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)) inkubiert, welches mindestens fünffach gewechselt wurde, um so alle löslichen Lipide zu entfernen. Nachdem das Chloroform-Methanol-Gemisch entfernt wurde, wurden die Blätter unter dem Abzug und per Exsikkator getrocknet und deren Gewicht bestimmt. Anschließend konnten die Blätter für eine Umesterung (2.3.3.) genutzt werden.

### 2.3.3. Umesterung

Um ein Biopolymer wie Kutin zu untersuchen, muss es zunächst in seine monomeren Bestandteile zerlegt werden. Um die Esterbindungen zu spalten, können die Proben in einer säurekatalysierten Reaktion mit 1 N methanolischer Salzsäure (MeOH/HCl; 3 N; Supelco (Bellefonte, USA)) umgeestert werden. Die Monomere werden so mit Methanol verestert und so in kleine Stücke zerlegt. Die Umesterung erreicht man durch Zugabe von MeOH/HCl (2 ml) und einer Inkubationszeit von 2 h bei 80°C. Zu den Proben wurde erneut ein interner Standard hinzugegeben, in diesem Fall Dotriacontan (C<sub>32</sub>-Alkan; 10 µg). Die Monomere wurden durch zweifaches Extrahieren mit Hexan aus den Proben gewonnen. Hierfür wurde 2 ml Hexan (für Analyse ≥ 99 %; Merck (Darmstadt, Deutschland)) zu den Proben gegeben, stark gemischt und das Lösungsmittel vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die so gewonnene organische Phase wurde unter einem Stickstoff-Strom eingengt und derivatisiert (2.3.4.).

### 2.3.4. Derivatisierung

Um eine bessere Flüchtigkeit und Trennbarkeit der in den Proben enthaltenen Substanzen zu erhalten, werden hydrophile Gruppen maskiert. Dies geschieht durch die Überführung der Hydroxy- und Carboxygruppen in ihre korrespondierenden Trimethylsilylether oder -ester (Abb. 2.5.). So wird eine unerwünschte Reaktion mit der Säulenbeschichtung verhindert.

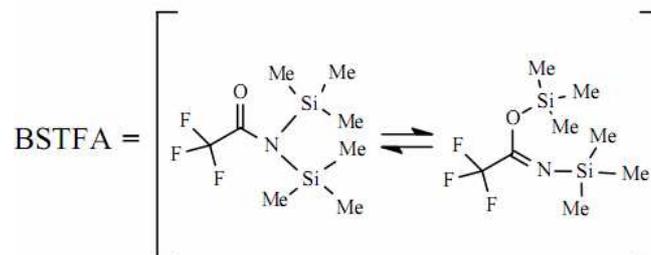


Abb. 2.4. **Derivatisierungsreagenz BSTFA** (N,O-Bistrimethylsilyltrifluoroacetamid). BSTFA überführt Hydroxy- und Carboxygruppen in ihre korrespondierenden Trimethylsilylether oder -ester.

Zu jeder Proben wurde 20 µl BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid ; Abb. 2.4; Macherey-Nagel, Düren) und 20 µl Pyridin (Puriss, absolut,  $\geq 0,005$  H<sub>2</sub>O; Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)) als Katalysator für die Reaktion hinzugegeben. Für die Derivatisierung wurden die Proben für 40 min bei 70°C inkubiert und im Anschluss gaschromatographisch und massenspektrometrisch (2.3.5.) untersucht.

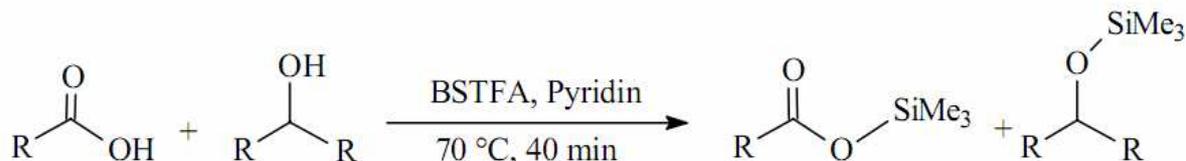


Abb. 2.5. **Darstellung der Derivatisierung.** In der Derivatisierungsreaktion werden für das GC schädliche hydrophile Gruppen maskiert, indem sie in ihre korrespondierenden Trimethylsilylether oder -ester überführt werden.

### 2.3.5. Gaschromatographie und Massenspektrometrie

Die Wachs- (2.3.1.) und Kutin-Proben (2.3.2.) wurden gaschromatographisch aufgetrennt und anschließend quantitativ und qualitativ charakterisiert.

Die Auftrennung der Substanzen eines Stoffgemisches erfolgt aufgrund der chemischen und physikalischen Eigenschaften dieser Substanzen und wird bei der Gaschromatographie durch molekülspezifische Siedepunkte und den Wechselwirkungen zwischen den verdampfenden Molekülen mit der stationären (Säule) und mobilen Phase (Trägergas) charakterisiert. Die einzelnen Komponenten einer Probe werden so zeitlich nach Unterschieden in ihrer Polarität und ihrer Größe getrennt.

#### 2.3.5.1. Quantitative Analyse mittels GC-FID

Die Quantifizierung der in der Probe enthaltenen Stoffe erfolgte mit einem Gaschromatographen (GC), an den ein Flammen-Ionisations-Detektor (FID) gekoppelt war. In diesem System werden die aufgetrennten Kohlenwasserstoffe in einer Wasserstoffflamme thermisch ionisiert. Die so freiwerdenden Ionen

verursachen im Detektor durch die dort angelegte Spannung einen Stromfluss. Dieser ist linear proportional zum Kohlenstoffgehalt der Substanz.

Bei dem hier verwendeten Gaschromatographen handelte es sich um das Model 6890N (Agilent Technologies, USA). Eine Kapillarsäule (DB-1, 30 m x 0,32 mm; 0,1 µm; J&W) diente als stationäre Phase und das Trägergas Wasserstoff (H<sub>2</sub>) als mobile Phase (Flussrate 2 ml·min<sup>-1</sup>). Es wurde 1 µl der Probe auf die Kapillarsäule (*on-column*) injiziert und das entsprechende Temperaturprogramm aus Tab. 2.1. verwendet.

Vor jeder Analysereihe wurde die Qualität der Kapillarsäule getestet. Hierfür wurde ein Gemisch aus einem langkettigen Alkan (Tetracosan; C<sub>24</sub>) und drei langkettigen Carbonsäuren (Nonacosansäure, Triacontansäure und Hentriacontansäure) in einem definierten Mengenverhältnis injiziert und diese Probe mit dem Programm Säurestandard (Tab. 2.1.) aufgetrennt. Die Säuren werden aufgrund ihres polaren Charakters leichter von Verschmutzungen der Säule zurückgehalten als das deutlich unpolare Alkan und so kann das Verhältnis von der Hentriacontansäure zu Tetracosan als ein Mittel für die Säulenverschmutzung dienen. Der Zahlenwert sollte hier unter 1,3 liegen und bei deutlich schlechteren Werten wurde Säulenpflege betrieben, die unter anderem Kürzen und Ausheizen der Säule und Spülen mit Chloroform umfassen konnte.

Tab. 2.1. **Temperaturprogramme der gaschromatographischen Analysen**

| Säurestandard            | Wachs                    | Kutin                     |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Injektion bei 50 °C      | Injektion bei 50 °C      | Injektion bei 50 °C       |
| 1 min bei 50 °C          | 2 min bei 50 °C          | 2 min bei 50 °C           |
| 40 °C pro min bis 200 °C | 40 °C pro min bis 200 °C | 1 0 °C pro min bis 150 °C |
| 1 min bei 200 °C         | 2 min bei 200 °C         | 1 min bei 150 °C          |
| 3 °C pro min bis 310 °C  | 3 °C pro min bis 310 °C  | 3 °C pro min bis 310 °C   |
| 15 min bei 310 °C        | 30 min bei 310 °C        | 15 min bei 310 °C         |

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Agilent ChemStation (Agilent Technologies, USA). Die Konzentration der Monomere konnte mit der Formel 2.4. berechnet werden. Für die Bestimmung der Konzentrationen der einzelnen Stoffe (x) wurde die bekannte zugegebene Menge des internen Standards (Std) verwendet.

Außerdem wurde dieser Wert noch auf das Trockengewicht (tg) oder die Fläche der Probe bezogen. Diese werden dann in  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  oder in  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}_{\text{tg}}^{-1}$  als Mittelwerte aus fünf Parallelen und deren Standardabweichung (Sa) angegeben. Sollen zwei Linien auf signifikante Unterschiede untersucht werden, wird ein *t-test* (mit excel) angewendet.

$$\text{Konz. von } x (\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}) = 10 \mu\text{g} \cdot \left( \frac{\text{Peakgröße}(x)}{\text{Peakgröße}(\text{Std})} \right) \cdot \text{Bezugsgröße} (\text{mg}_{\text{tg}} \text{ oder } \text{cm}^2)$$

(Formel 2.4.)

### 2.3.5.2. Qualitative Analyse mittels GC-MS

Die qualitative Analyse der Proben erfolgte mit einem GC, an welches ein Massenspektrometer (MS) gekoppelt war. Die im GC aufgetrennten Proben werden im MS durch Elektronenbeschuss (*Electron Impact*, EI) ionisiert. Es entstehen primär positive Ionen, die sehr instabil sind und so in für jedes Molekül typische Massenfragmente zerfallen. Diese Fragmente werden in einem statischen, elektrischen Feld beschleunigt und durchqueren dann ein durch einen Hexapol erzeugtes elektromagnetisches Feld. Die an diesem Hexapol angelegte Wechselspannung und deren schnelle und kontinuierliche Änderung ermöglichen, dass in einem bestimmten Zeitintervall nur Ionen einer bestimmten Masse das elektrische Feld bis zum Detektor selektiv passieren können. So entstehen die Massenspektren, die anhand bereits bekannter Spektren charakterisiert werden können.

Die Stoffauftrennung erfolgte wie in 2.3.5.1. nach einer 1  $\mu\text{l}$  Injektion (*on-column*) in einem 6890N Gaschromatographen (Agilent Technologies) mit gekoppeltem Massenspektrometer 5973 MS (Agilent Technologies). Als Trennsäule wurde eine DB-1MS-Säule (30 m x 0,32 mm; 0,1  $\mu\text{m}$ ; J&W) mit Helium als Trägergas (Flussrate 2  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ) verwendet.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software HP-Chemstation (Hewlett Packard Corporation, USA).

## 2.4. Molekularbiologische Materialien und Methoden

### 2.4.1. Materialien

Die Chemikalien wurden soweit nicht anders vermerkt von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen.

#### 2.4.1.1. Primer

Alle verwendeten Primer (Tab. 2.2.) wurden bei Invitrogen bestellt. Zur Berechnung der Hybridisierungstemperatur wurde die Formel 2.5. genutzt:

$$T_s [^{\circ}C] = \frac{69,3 + 41 (nG + nC)}{s} + \frac{650}{s} \quad (\text{Formel 2.5.})$$

Die Schmelztemperatur ( $T_s$ ) konnte mit der Anzahl der Guanine ( $nG$ ) und der Anzahl der Cytosine in der Nukleotidsequenz ( $nC$ ) und der Gesamtanzahl Basen des Primers ( $s$ ) bestimmt werden.

Aus der so errechneten Schmelztemperatur kann die Hybridisierungstemperatur bestimmt werden. Von der Temperatur des Primers mit der niedrigeren Schmelztemperatur wurden 2 °C abgezogen.

#### 2.4.1.2. Anzucht von Bakterien und Antibiotikakonzentrationen

Die verwendeten Bakterienstämme waren DH5 $\alpha$  für *E.coli* und GV3101 für *A. tumefaciens*. Die Bakterien wurden in Luria-Bertani-Medium (LB, Fluka) bei 37 °C und 220 rpm (*Escherischia coli*) oder 28 °C und 170 rpm (*Agrobacterium tumefaciens*) angezogen.

Die genutzten Antibiotika für *E. coli*, *A. tumefaciens* und *A. thaliana* und deren verwendeten Konzentrationen können der Tab. 2.3. entnommen werden.

Tab. 2.2. Primersequenzen

| Primername   | Sequenz (5' - 3')  |
|--|--|
| <u>Für die Klonierung von Promotor<sub>CUT1</sub> (mit Gateway-Adapttern und Schnittstellen)</u> |  |
| LS315 fwd-Primer   | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCT TCG ATATCG GTTGTTG                                     |
| LS448 rev-Primer   | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCGGCCGCNNNTCTAGAN<br>NNNCTCGAGCGTCGGAGAGTTTTAATGTATAATTG |
| <u>Klonierung von CYP703A2</u>   |  |
| LS458  | CTCGAGATGATTTTGGTGCTAGCCTCCCTC   |
| LS459  | GCGGCCGCTGTGTACAAATGAGCTGCCAATCG   |
| <u>Klonierung von CYP703A2 (für Überexpression)</u>  |  |
| LS522  | GatewayAdapter-ATGATTTTGGTGCTAGCCTCCCTC  |
| LS523  | GatewayAdapter-TGTGTACAAATGAGCTGCCAATCG  |
| <u>Primer zur Überprüfung der Konstrukte</u>   |  |
| LS516  | GCCTCTCCCCGCGCGTTGGCC  |
| LS517  | CCTTCACCTTCCCTCTCTCATC   |
| M13fwd   | GTAAAACGACGGCCAG   |
| M13rev   | CAGGAAACAGCTATGAC  |
| <u>Actin-Primer für RT-PCR</u>   |  |
| LS96   | GTGATGATGCCCCGAGAGC  |
| LS100  | GACCCGCAAGATCAAGACGA   |
| <u>Primer zum genotypisieren von CER5</u>  |  |
| LS376 (CER5_fwd)   | AAGTGAGAAAGGGAAGCGAAG  |
| LS377 (CER5_rev)   | AGAATGCGGTAACACACAAGG  |
| LS378 (LBb1.3)   | ATTTTGCCGATTTGGAAC   |
| <u>Primer zum genotypisieren von CUT1</u>  |  |
| LS070 (CUT1_fwd)   | CTATTGTCGCCGTTGAGC   |
| LS379 (CUT1_rev)   | TCCCCGAAAGATTGAAGC   |
| LS186 (Spm32)  | TAC GAA TAA GAG CGT CCA TTT TAG AGT GA   |

Tab. 2.3. Antibiotikakonzentrationen

|            | Konzentration<br>für <i>E. coli</i> | Konzentration<br>für <i>A. tumefaciens</i> | Konzentration<br>für <i>A. thaliana</i> |
|------------|-------------------------------------|--|---|
| Ampicillin | 100 µg/ml                           |  |   |
| Zeocin     | 50 µg/ml                            |  |   |
| Kanamycin  | 50 µg/ml                            | 50 µg/ml                                   |   |
| Rifampicin |                                     | 10 µg/ml                                   |   |
| Hygromycin |                                     |  | 30 ng/ml                                |

### 2.4.1.3. Anzucht *A. thaliana*

Die Pflanzen wurden wie in 2.1.1. auf Erde angezogen. Bei der Selektion auf MS-Medium wurde folgendes Medium verwendet. Hierfür mussten die Samen zunächst oberflächensterilisiert werden.

#### MS-Medium

|   |  |  |
|---|--|--|
| 20,63 mM NH <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> ;                  | 18,8 mM KNO <sub>3</sub> ;                     | 4,0 mM CaCl * 2 H <sub>2</sub> O;              |
| 3,1 mM MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O;              | 1,0 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ;       | 0,13 mM MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O;  |
| 0,03 mM ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O;             | 0,1 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ;        | 5 µM KJ;                                       |
| 1 µM Na <sub>2</sub> MnO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O; | 0,1 µM CaSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O; | 0,2 µM CaCl * 6 H <sub>2</sub> O;              |
| 43,8 mM Saccharose;   | 0,1 mM Na <sub>2</sub> EDTA;                   | 0,1 mM FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O; |
| 0,23 mM Myoinosit,  | 13 µM Glycin;                                  | 2 µM Nicotinamid;                              |
| 1 µM Vitamin B6;  | 74 nM Thiamin;                                 | 5,7 µM K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ;        |

Agar (0,7 % w/v);

⇒ pH-Wert auf pH 5,7 einstellen und autoklavieren

#### Lösung zur Oberflächensterilisation von Samen

- 97 % Ethanol                      25 ml
- 12 % NaHClO                      4 ml
- H<sub>2</sub>O-Dest.                          21 ml

Die Samen wurden für eine Oberflächensterilisation in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und für 5 min in der Sterilisationslösung inkubiert. Anschließend wurden die

Proben 3 fach mit Ethanol gewaschen und unter der Sterilbank getrocknet. Die Samen wurden über Nacht bei 4 °C gelagert (Stratifikation) und am nächsten Tag auf MS-Platten mit Hygromycin (Tab. 2.3.) gestreut. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen, um Austrocknung und Kontamination mit Bakterien oder Pilzen zu vermeiden.

### 2.4.2. Allgemeine molekularbiologische und mikrobiologische Methoden

#### 2.4.2.1. Methode zur Isolierung genomischer DNA aus Blättern von *A. thaliana*

##### CTAB-Isolationspuffer

- Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) 2 % (w/v)
- 2-Mercaptoethanol 0,2 % (w/v)
- NaCl 1,4 M
- Tris-Cl (pH=8) 100 mM
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 20 mM

##### CTAB-Waschpuffer

- 97 % Ethanol 76 % (v/v)
- Ammoniumacetat 10 mM

##### TE-Puffer

- Tris-Cl (pH=7,4) 10 mM
- EDTA 1 mM

Blätter von zwei bis vier Wochen alten Pflanzen wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend mit einem Pistill zu einem Pulver zerrieben. Nach Zugabe von CTAB-Isolationspuffer (100 µl) wurden die Proben für 30 min unter gelegentlichem Rühren bei 60 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben wurde 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) zugegeben und die Proben 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch 100 µl gekühltes Isopropanol eine Fällung durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von

30 min wurde erneut 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Probe dreifach mit 100 µl CTAB-Waschpuffer gewaschen und jeweils anschließend für 5 min zentrifugiert, beim letzten Waschschrift für 10 min. Nach der Trocknung des Pellets wurde die Probe in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit einem Nanodrop oder mit einem Photometer mit Hilfe der Formel 2.6..

$$\text{Konzentration (ng/}\mu\text{l)} = \text{OD}_{260} \cdot 50 \text{ (für DNA; 40 für RNA) Verdünnungsfaktor}$$

(Formel 2.6.)

### 2.4.2.2. RNA Extraktion

Die RNA-Extraktion zur Expressionsanalyse wurde mit dem Kit NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Plant (Macherey & Nagel, Düren) durchgeführt.

### 2.4.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die PCR wurden zwei verschiedene Polymerasen genutzt. Für die Klonierung der Konstrukte wurde eine iproof-Polymerase (BioRad, München) und für alle anderen PCRs wurde eine Tfi-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. In Tab. 2.4. und 2.5. sind die Zusammensetzungen der PCR-Reaktionen aufgelistet.

Der Thermocycler (Primus 25; MWG-Biotech, Ebersberg oder Primus 96 advanced; PEQLAB-Biotechnologie, Erlangen) wurde mit den entsprechenden Daten programmiert. Für eine Standardreaktion mit der Tfi-Polymerase wurde zunächst bei 94 °C 2 min denaturiert. Danach folgten 25 bis 35 Zyklen mit den folgenden Segmenten: 30 s bei 94 °C Denaturierung, 30 s bei ~56 °C (je nach Primer) Primerhybridisierung und 1 min Elongation bei 68 °C pro 1000 Basenpaare (bp) des erwarteten Fragments. Zum Schluss folgten noch 10 min bei 68 °C.

Tab. 2.4. Zusammensetzung einer PCR-Reaktion mit der Tfi-Polymerase

| Reagenz                       | Menge [ $\mu$ l] |
|-------------------------------|------------------|
| 5x PCR-Reaktionspuffer        | 5                |
| MgCl <sub>2</sub> (50 mM)     | 0,75             |
| dNTPs (10 mM)                 | 0,5              |
| Primer                        | je 0,25          |
| Tfi-Polymerase (5 U/ $\mu$ l) | 0,25             |
| DNA-Template                  | ~ 10ng           |
| H <sub>2</sub> O              | auf 25           |
| <hr/>                         |                  |
| Total                         | 25               |

Für eine PCR mit der iproof-Polymerase wurde bei 98 °C 30 s denaturiert. Danach folgten 35 Zyklen mit den Segmenten: 10 s bei 98 °C Denaturierung, 30 s bei ~56 °C (je nach Primer) Primerhybridisierung und 1 min Elongation bei 72 °C. Zum Schluss folgten noch 10 min bei 72 °C.

Tab. 2.5. Zusammensetzung einer PCR-Reaktion mit der iproof-Polymerase

| Reagenz             | Menge [ $\mu$ l] |
|---------------------|------------------|
| 5x iProof HF Puffer | 10               |
| dNTPs               | 1                |
| Primer              | 0,25             |
| iProof-Polymerase   | 0,5              |
| DNA Template        | ~ 10 ng          |
| H <sub>2</sub> O    | auf 50           |
| <hr/>               |                  |
| Total               | 50               |

#### 2.4.2.4. Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Für die RT-PCR wurde das SuperScript™ III One-Step RT-PCR-Kit (Invitrogen) mit einer Platinum Tag DNA Polymerase verwendet. Es wurden 100 ng RNA pro Reaktion eingesetzt (Tab. 2.6.). Das konstitutiv exprimierte Gen Aktin wurde als Kontrolle verwendet.

Im Thermocycler fand zunächst ein cDNA-Synthese Schritt statt, der eine Inkubation für 30 min bei 55 °C erforderte. Es erfolgte eine initiale Denaturierung für 3 min bei 94 °C und dann schlossen sich 30 Zyklen mit folgenden Segmenten an: 30 s Denaturierung bei 94°C, dann die Primerhybridisierung bei ~56°C (je nach Primer) für 30 s und eine Elongation bei 68 °C und 1 min pro 1000 bp. Eine finale Elongation fand für 10 min und 68 °C statt.

Tab. 2.6. Zusammensetzung einer RT-PCR-Reaktion

| Reagenz                              | Menge [µl] |
|--------------------------------------|------------|
| 2x Reaktionsmix (Invitrogen)         | 2,5        |
| Primer (50pmol/µl)                   | je 0,25    |
| SuperScript™ III RT/Platinum Taq-Mix | 0,25       |
| RNA                                  | ~100ng     |
| Wasser                               | auf 25     |
| Total                                | 25         |

#### 2.4.2.5. Verdau mit Restriktionsenzymen

Restriktionsenzyme erkennen und schneiden an einer für jedes Enzym spezifischen Sequenz in der DNA. Durch diese Methode können erstellte Plasmide verifiziert werden, weil sie durch den Verdau mit einem Enzym ein typisches Muster auf dem Gel zeigen. Für den Verdau wurden 200 ng DNA eingesetzt und mit entsprechender Menge Puffer (2 µl) und Enzym (1 µl; 1 U) bei 37 °C (oder entsprechender anderer optimaler Temperatur für das Enzym) für 1 h inkubiert.

Die für diese Arbeit verwendeten Enzyme wurden bei Fermentas (St. Leon-Rot) bestellt (Tab. 2.7.).

Tab. 2.7. Restriktionsenzyme und verwendete Puffer

| Restriktionsenzym | Erkennungssequenz                    | Puffer |
|-------------------|--------------------------------------|--------|
| EcoRI             | 5' G AATT C 3'<br>3' C TTAA G 5'     | EcoRI  |
| EcoRV             | 5' GAT ATC 3'<br>3' CTA TAG 5'       | rot    |
| HindIII           | 5' A AGCTT 3'<br>3' TTCGA A 5'       | rot    |
| NcoI              | 5' C CATG G 3'<br>3' G GTAC C 5'     | tango  |
| NheI              | 5' G CTAG C 3'<br>3' C GATC G 5'     | tango  |
| NotI              | 5' GC GGCC GC 3'<br>3' CG CCGG CG 5' | orange |
| XbaI              | 5' T CTAG A 3'<br>3' A GATC T 5'     | tango  |
| XhoI              | 5' C TCGA G 3'<br>3' G AGCT C 5'     | rot    |

#### 2.4.2.6. Gelelektrophorese

Gelladepuffer (6 x)      Bromphenolblau 0,1% (w/v)  
                                  Saccharose 40 % (w/v)

TAE-Puffer (50 x)      242 g Tris-HCl pH 8  
                                  57,1 ml Eisessig  
                                  100 ml EDTA (0.5 M) pH 8  
                                  Rest dH<sub>2</sub>O (auf 1 l)

Die DNA-Fragmente wurden durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Agarose-Gel wirkt in diesem Fall als Molekularsieb und trennt die Fragmente anhand ihrer Größe auf. In der Regel wurden 1 %ige Gele (Agarose in 1 x TAE-Puffer) verwendet, die mit 0,05 % Ethidiumbromid versehen waren. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit einer entsprechenden Menge Gelladepuffer (6 x) versetzt, wodurch eine höhere Dichte der Proben erreicht wird und diese somit leichter in die

Taschen pipettiert werden konnten. Als Größenreferenz wurde eine 100 bp-DNA-Leiter *extended* (Carl Roth, Karlsruhe) für Fragmente unter 5 kb (Kilobasen) hinzugegeben. Für Fragmente, die größer als 5 kb waren, wurde die 1 kb Leiter genutzt (Carl Roth). Die Auftrennung erfolgte in TAE-Puffer (1 x) bei einer elektrischen Spannung von 80 V und einer Stromstärke von 150 mA. Nach der Auftrennung wurden die Gele unter UV-Licht fotografiert.

### 2.4.2.7. Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli*

#### SOB-Medium

- Trypton 20 g·l<sup>-1</sup>
- Hefeextrakt 5 g·l<sup>-1</sup>
- NaCl 0,5 g·l<sup>-1</sup>
- KCl 2,5 mM

⇒ pH auf 7 einstellen und autoklavieren

Vor Benutzung werden noch 5 ml einer sterilen 2 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung hinzugegeben.

#### TB-Puffer

- Pipes 10 mM
- CaCl 15 mM
- KCl 250 mM

⇒ in dH<sub>2</sub>O lösen

⇒ pH auf 6,7 einstellen

- MnCl<sub>2</sub> 55 mM

⇒ steril filtrieren; Lagerung bei 4 °C

#### TB-DMSO-Puffer

TB-Puffer (s.o.)

7 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)

#### LB-Platten

LB-Medium + Agar

*E. coli* (Stamm DH5a) wurden über Nacht auf einer LB-Platte ohne Antibiotikum bei 37 °C inkubiert. Mit 10 bis 12 der so gewachsenen Kolonien wurden 250 ml SOB-Medium in einem 2 l Erlenmeyerkolben angeimpft und diese bei 18 °C und 170 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 (nach ca. 42 h) angezogen. Wurde diese Dichte erreicht, wurde die Flüssigkultur für 10 min in Eiswasser gestellt und dann bei 4 °C 10 min bei 2500 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in kalten und steril filtrierten TB-Puffer (80 ml) resuspendiert und erneut für 10 min in Eiswasser verwahrt. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 4 °C für 10 min bei 2500 xg wurde der Überstand wiederum verworfen und die Pellets in TB-DMSO-Puffer (20 ml) resuspendiert. Nach einer dritten Inkubation für 10 min im Eiswasser wurden 200 µl Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C verwahrt.

Nach der Herstellung neuer kompetenter Zellen wurde die Transformationseffizienz bestimmt. Hierfür wurden 10 ng pUC-Plasmid transformiert (2.4.2.8.). In diesem Fall wurde nicht der 1 ml Transformationsansatz ausplattiert, sondern dieser noch verdünnt, hierfür wurden 10 µl entnommen und mit 990 µl SOC-Medium gemischt. Von diesem 1 ml wurden dann 10 µl, 100 µl und der Rest ausplattiert. Die Transformationseffizienz wurde dann nach Formel 2.7. berechnet. Es wurde eine Transformationseffizienz von  $1 \cdot 10^7$  erreicht.

$$\text{Transformationseffizienz} = \left( \frac{\text{CFU auf Platte}}{\text{pg DNA}} \right) \cdot 10^6 \text{ pg} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \left( \frac{\text{Volumen}_{\text{Transformation}}}{\text{Volumen}_{\text{Ausplattierung}}} \right) \cdot \text{Verdünnung}$$

(Formel 2.7.)

#### 2.4.2.8. Transformation von *E. coli* durch Hitzeschock

SOC-Medium

SOB-Medium

0,01 mM MgCl<sub>2</sub>

0,02 mM Glukose (steril filtriert)

⇒ pH auf 7 einstellen

### Luria Bertani-Platten

LB-Medium + Agar

Antibiotikum (Tab. 2.3.)

Chemisch kompetente *E.coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 10 ng Plasmid versehen. Nach einer Inkubation im Eiswasser für 30 min wurde ein Hitzeschock für 30 s im Wasserbad bei 42 °C durchgeführt und die Zellen erneut für 5 min auf Eis gegeben. Nach Zugabe von 800 µl SOC-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt und im Anschluss auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum (Tab. 2.6.) ausgestrichen (10 µl, 100 µl, Rest) und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### **2.4.2.9. Transformation von *A. tumefaciens***

Chemisch kompetente Zellen von *A. tumefaciens* wurden auf Eis aufgetaut und mit ~1 µg Plasmid vermischt. Nach einer Inkubation für je 5 min in Eiswasser und in flüssigem Stickstoff folgte ein Hitzeschock für 5 min bei 37 °C. Nach der Zugabe von 800 µl LB wurden die Zellen für 3 h bei 28 °C und 170 rpm inkubiert. Nach dem Austrich von 20 µl, 200 µl und dem Rest des Transformationsansatzes auf LB-Platten mit Rifampicin und Kanamycin (Tab. 2.6.) wurden diese für 48 h bei 28 °C inkubiert.

#### **2.4.2.10. Flüssigkulturen und Miniprep**

Um eine größere Menge des Plasmids zu erhalten, wurden Flüssigkulturen (5 ml LB-Medium + Antibiotikum) von *E. coli* angesetzt und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm (für *A. tumefaciens* 28 °C, 170 rpm) inkubiert. Am nächsten Morgen war dann eine optische Dichte von 2 bis 4 erreicht und es konnte eine Plasmidpräparation (Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega, Mannheim) durchgeführt werden. Hierfür wurden 1,5 ml der Bakteriensuspension pelletiert und entsprechend dem Protokoll gearbeitet. Die Konzentrationsbestimmung fand mit einem Nanodrop (PeQ-Lab Biotechnologie, Erlangen) statt.

#### 2.4.2.11. Glycerin-Stocks

Zur Langzeitlagerung der erzeugten *E. coli* und *A. tumefaciens* Klone wurden 700 µl der Bakterienkultur und 300 µl Glycerin (50 %) gemischt und diese Probe dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dieser Behandlung können die Klone bei -80 °C verwahrt werden.

#### 2.4.3. Die Klonierung von DNA-Fragmenten und Herstellung transgener Pflanzenlinien

Für die Klonierung von *CYP703A2* (At1g01280) unter Kontrolle des epidermisspezifischen Promotor<sub>*CUT1*</sub> wurde eine Mischung aus einer TA-Klonierung, der klassischen Klonierung durch Restriktionsenzyme und Ligation und dem Gateway<sup>®</sup>-System verwendet (Abb. 2.6.).

Außerdem wurde ein Konstrukt mit *CYP703A2* erstellt, das unter Kontrolle des Promotor<sub>35S</sub> stand. Hierfür wurde das Gateway<sup>®</sup>-System verwendet (Abb. 2.7.).

##### 2.4.3.1. TA-Klonierung

Die Methode der TA-Klonierung basiert auf der Entdeckung, dass die Taq-Polymerase keine Fragmente mit glatten Enden erzeugt, sondern einen Überhang von einer Base (in der Regel ein Adenosin (A)) erzeugt. Diese Fragmente lassen sich so einfach in einen Vektor mit einem Thymidin-Überhang einbringen.

Zunächst wurde das gewünschte Gen mit Hilfe der iproof-Polymerase amplifiziert und in diesem Schritt Schnittstellen angehängt. Es wurde je eine Schnittstelle vor und eine hinter das Gen (von verschiedenen Enzymen) gesetzt, so konnte dann später die Richtung bestimmt werden, in der das Fragment in den aufgeschnittenen Vektor eingebracht wurde.

Da die iproof-Polymerase keine A-Überhänge produziert, wurde den Fragmenten ein A nachträglich angehängt. Dieser Schritt wird *A-Tailing* genannt und bedeutet eine Inkubation für 30 min bei 70 °C mit der Tfi-Polymerase.

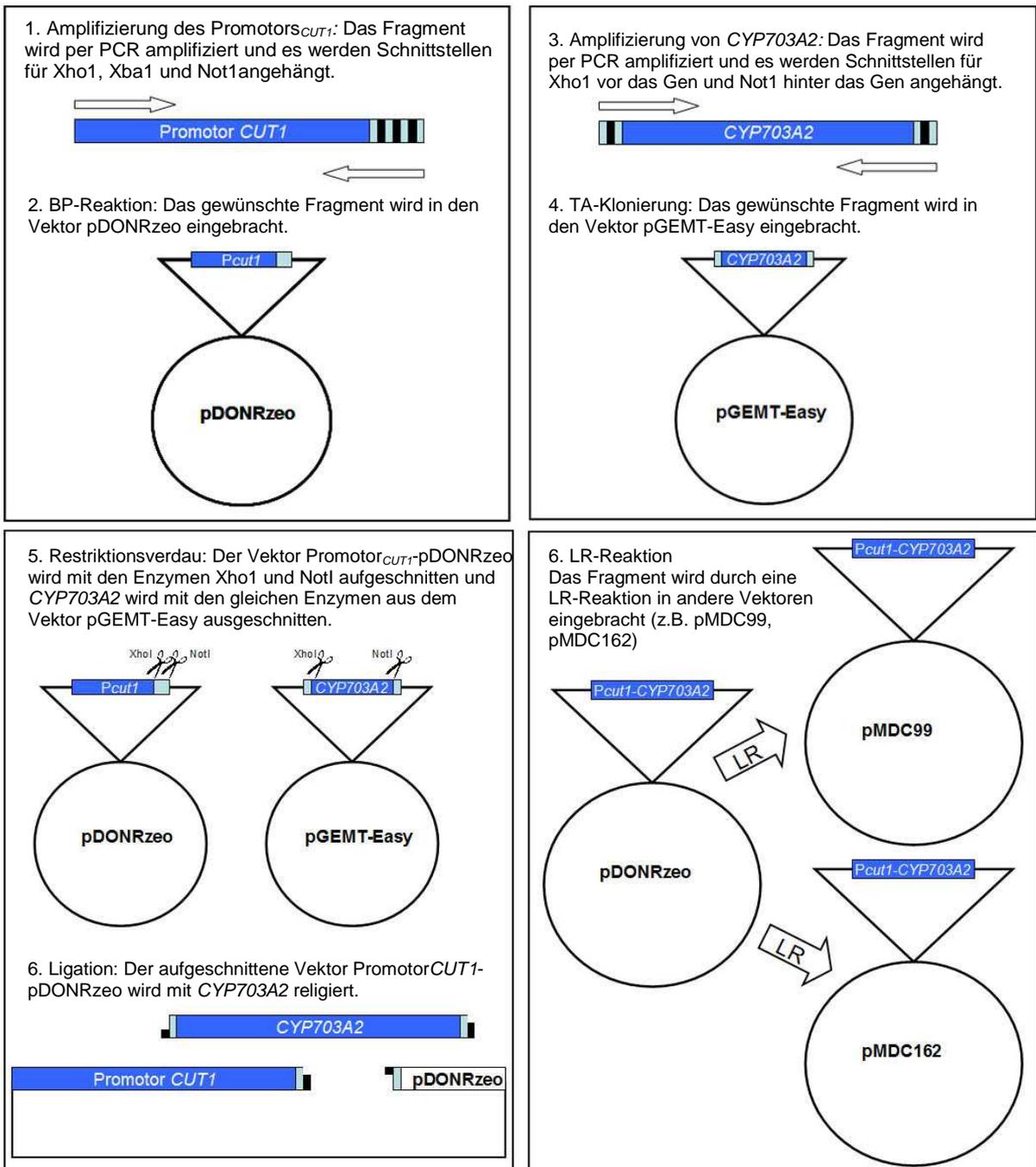


Abb. 2.6. **Schema für Klonierung.** Für die Klonierung von CYP703A2 unter Kontrolle des epidermisspezifischen Promotors<sub>CUT1</sub> ( $P_{CUT1}$ ) wurde eine Mischung aus einer TA-Klonierung, der klassischen Klonierung durch Restriktionsenzyme und Ligation und dem Gateway<sup>®</sup>-System verwendet

Im Anschluss an das *A-Tailing* konnte die TA-Klonierung (Kit: pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System I, Promega, Mannheim) in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy stattfinden. Hierfür wurde eine entsprechende Menge *Template*-DNA (25 ng) mit dem Vektor (50 ng) vermischt und mit entsprechendem Puffer und einer Ligase über Nacht bei 4 °C

inkubiert. Der Ansatz konnte anschließend in Bakterien transformiert werden. Für die Transformation in *E. coli* bietet der pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektor eine sehr angenehme Eigenschaft. Positive Kolonien können anhand einer Blau-Weiß-Selektion erkannt werden. Diese Methode beruht auf der Unterbrechung des lacZ'-Gens, sollte das gewünschte Fragment inseriert werden, wodurch das ebenfalls zu den Platten hinzugegebene X-Gal (+ IPTG) nicht mehr in einen blauen Farbstoff umgesetzt werden kann. Positive Kolonien erscheinen so weiß. Von den auf LB-Platten mit dem Antibiotikum Ampicillin gewachsenen Kolonien konnten Flüssigkulturen erstellt werden, aus denen dann durch ein Miniprep das Plasmid (2.4.2.10.) gewonnen werden konnte. Die Konzentrationbestimmung erfolgte mit einem Nanodrop (pEQ-Lab). Nach der Verifizierung des Plasmids durch einen Verdau mit Restriktionsenzymen (2.4.2.5.) konnte das Konstrukt zum Sequenzieren (4base-lab, Reutlingen) geschickt werden und die Sequenz mit der Datenbank verglichen werden.

### 2.4.3.2. Rekombinationsvermitteltes Klonieren mit Hilfe des Gateway<sup>®</sup>-Systems

Das Gateway<sup>®</sup>-System bedient sich der Strategie des Bakteriophagen *lambda*, der sich mit dieser Rekombinationsmethode in das Genom des Bakteriums *E. coli* einbaut. Die Voraussetzung sind spezifische Erkennungsstellen an der DNA, die sogenannten *attachment*-sites (*att*-sites) und spezielle Proteine von *lambda* und *E. coli*.

Das Gateway<sup>®</sup>-System besitzt den großen Vorteil, dass jedes Fragment, das bereits in einen Donorvektor kloniert wurde, in beliebig viele Destinationsvektoren weiter kloniert werden kann. So kann das gleiche Fragment mit Expressionsvektoren, Überexpressionsvektoren und in Verbindung mit Reportergenen verbunden werden (Curtis und Grossniklaus, 2003).

Um ein Konstrukt aus dem epidermisspezifischen Promotor<sub>CUT1</sub> und den gewünschten Genen zu erstellen, wurde zunächst der Promotor mit Hilfe der iproof-Polymerase amplifiziert. In der durchgeführten PCR wurden neben den *att*-sites auch drei Restriktionsschnittstellen an den Promotor angehängt, so dass das gewünschte Gen per Restriktionsverdau angehängt werden konnte.

Um das Gen *CYP703A2* später in einen Überexpressionsvektor zu klonieren wurde diesem Gen ebenfalls in einer PCR die *att*-sites angehängt.

In der nachfolgenden BP-Reaktion (Abb. 2.6.) rekombinieren die *attB*-Sequenzen an den beiden Fragmenten mit den *attP*-Sequenzen des Donor-Vektors pDONRzeo. Dadurch entsteht ein als Entry-Vektor bezeichnetes Konstrukt mit *attL*-sites, welche sich aus Teilen der rekombinierten *attB*- und der *attP*-Sites zusammensetzen. Für diese Reaktion werden die *lambda*-Integrase (Int) und der *E. coli* "Integration Host"-Faktor (IHF) benötigt. Die Vektorkarten der Entry-Klone sind in Abb. 8.1. und 8.5. im Anhang zu sehen.

In einem zweiten Schritt, der sogenannten LR-Reaktion (Abb. 2.6.) konnte das gewünschte Gen oder Fragment vom Donor-Vektor in den Destinationsvektor (z.B. pMDC99, pMDC32) transferiert werden. Hierfür wurde neben der Int und dem IHF auch eine *lambda*-Excisionase (Xis) benötigt.

Dabei wird der Erfolg der Rekombination auch durch eine negative Selektion kontrolliert. Die Vektoren, die keine Rekombination durchführen, behalten das *ccdB*-Gen der Gateway-Kassette, welches für einen Gyrase-Inhibitor kodiert. Dieser ist für die Bakterien toxisch, wodurch vermieden wird, dass Bakterien überleben, die nur den nichtrekombinierten Vektor ohne das gewünschte Fragment aufnehmen. Zudem unterscheiden sich die Donor- und Destinationsvektoren in ihrer Antibiotikaresistenz, was im Fall der LR-Reaktion eine Selektion der Destinationsvektoren ermöglicht, ohne dass die Donor-Vektoren zuvor entfernt werden müssen. Die Vektorkarten der fertigen Konstrukte sind in Abb. 8.4. und 8.6. im Anhang zu sehen.

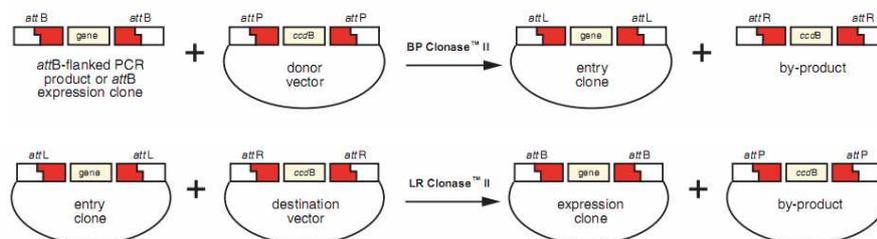


Abb. 2.7. **Schematische Darstellung des rekombinationsvermittelten Klonierens nach Gateway.**

In der oberen Reihe wird die BP-Reaktion dargestellt, in der das gewünschte Gen in den Donor-Vektor eingebracht wird. In der unteren Reihe ist die LR-Reaktion dargestellt, in der das Gen vom Donor-Vektor in den Destinationsvektor transferiert wird.

Protokoll:

Nachdem das Fragment per PCR mit der iproof-Polymerase vermehrt wurde, wurde der BP-Ansatz (Gateway® BP Clonase II Enzyme Mix; Invitrogen, USA) wie in Tab. 2.8. zusammengestellt:

Tab. 2.8. **Zusammensetzung der BP-Reaktion**

| Komponenten                   | Menge [µl] |
|-------------------------------|------------|
| attB-PCR-Produkt (~15-150 ng) | 1 - 7      |
| Donor Vektor (150 ng)         | 1          |
| TE-Puffer                     | auf 8      |
| Total                         | 8          |

Der BP-Enzym-Mix wurde für 2 min auf Eis inkubiert, gut gemischt und dann 2µl zum Ansatz hinzugegeben. Anschließend wurde die Probe über Nacht bei 25 °C inkubiert und am nächsten Tag 1 µl der Proteinase K hinzugegeben und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Der BP-Ansatz wurde in Bakterien transformiert (2.4.2.8.; 2 µl), mittels Flüssigkultur vermehrt und das Plasmid per Plasmidextraktion (2.4.2.10.) gewonnen. Durch einen Restriktionsverdau (2.4.2.5.) konnte das Konstrukt verifiziert werden und das Fragment konnte zum Sequenzieren geschickt werden, um die Sequenz mit der Datenbank zu vergleichen.

Für den LR-Ansatz (Gateway® LR Clonase II Enzyme Mix; Invitrogen, USA) wurden die Komponenten in Tab. 2.9. zusammengegeben.

Um die ng Mengen der Vektoren (Ng) zu bestimmen, die für eine LR-Reaktion eingesetzt werden sollen, wurde Formel 2.8. verwendet. Hierfür muss die gewünschte Menge (in *fmol*) der beiden Vektoren (x) (Tab. 2.9.) und die Menge der Basenpaare (N) der beiden Vektoren in die Formel 2.8. eingesetzt werden.

$$Ng = (x \text{ fmol})(N) \left( \frac{660 \text{ fg}}{\text{fmol}} \right) \left( \frac{1 \text{ ng}}{10^6 \text{ fg}} \right) \quad (\text{Formel 2.8.})$$

Tab. 2.9. Zusammensetzung der LR-Reaktion

| Komponenten                           | Menge [ $\mu$ l] |
|---------------------------------------|------------------|
| <i>Entry</i> -Vektor (10 fmol)        | x                |
| <i>Destinations</i> -Vektor (20 fmol) | x                |
| TE-Puffer                             | auf 8            |
| Total                                 | 8                |

Der LR-Enzym-Mix wurde für 2 min auf Eis inkubiert, gut gemischt und dann 2  $\mu$ l zum Ansatz hinzugegeben. Anschließend wurde die Probe über Nacht bei 25 °C inkubiert und am nächsten Tag 1  $\mu$ l der Proteinase K hinzugegeben und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Der LR-Ansatz wurde in Bakterien transformiert (2.4.2.8.; Kanamycin-Resistenz der verwendeten *Destinations*-Vektoren), per Flüssigkultur vermehrt und nach einer Plasmidextraktion (2.4.2.10.) durch einen Restriktionsverdau (2.4.2.5.) verifiziert.

In der vorliegenden Arbeit wurden *Destinations*-Vektoren der pMDC-Reihe, die am Institut für Pflanzenbiologie, Zürich, entwickelt wurden, genutzt (Curtis und Grossniklaus, 2003).

#### 2.4.3.4. Transformation von *A. thaliana* mittels *Floral Dip*-Methode

##### Inokulationsmedium:

5 % Saccharose

0,05 % Silwet L-77

Wasser

Für die Transformation von *A. thaliana* wurden *A. tumefaciens*-Kulturen angezogen. Nach der Transformation von *A. tumefaciens* (2.4.2.9.) wurde für eine Flüssigkultur 10 ml LB-Medium verwendet und diese über Nacht bei 28 °C und 170 rpm inkubiert. Diese Kultur diente als Vorkultur, mit der die Hauptkultur, bestehend aus 300 ml LB, angeimpft wurde. Diese wurde erneut über Nacht bei 28 °C und 170 rpm inkubiert.

Da *A. tumefaciens* viel Luft benötigt, wurde die Kultur in zwei 500 ml-Schikanekolben aufgeteilt.

Die Hauptkultur wurde in Zentrifugationsgefäße überführt und für 15 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die Pellets wurden in insgesamt 200 ml Inokulationsmedium resuspendiert und in einem Becherglas gesammelt.

Für die Transformation wurden vier bis sechs Pflanzentöpfe mit drei bis vier Wochen alten Pflanzen verwendet, deren Infloreszenzen für zweimal 10 s in die Inokulationslösung getaucht wurden. Anschließend wurden sie gut angefeuchtet und in einer mit Plastik ausgekleideten Anzuchtsbox mit einer transparenten Plastikfolie luftdicht verpackt. Nach zwei bis drei Tagen wurden die Pflanzen wieder aufgestellt, gewässert und bis zur vollständigen Samenreife weitergezogen. Die Samen wurden geerntet und anschließend auf sterilem MS-Medium mit Hygromycin-Selektion angezogen (2.4.1.3.).

#### **2.4.3.4. Überprüfung der transgenen Linien**

Für die Überprüfung der erstellten transgenen Linien wurden DNA und RNA mit dem Kit NucleoSpin® TriPrep (Macherey&Nagel, Düren) extrahiert, bei dem beide Nukleinsäuren in einer Anwendung isoliert werden konnten. Die DNA-Probe wurde dann genutzt, um mit einer PCR (2.4.2.3.) die Anwesenheit des transformierten Konstrukts zu überprüfen und die RNA wurde nach einer Konzentrationsbestimmung mit dem Nanodrop für eine RT-PCR (2.4.2.4.) genutzt.

---

### **3. Ergebnisse**

### 3.1. Permeationsassay für intakte Blätter von *A. thaliana*

#### 3.1.1. Verteilung der Häufigkeiten von $^{14}\text{C}$ -Epoconazol Permeation in Blätter von *A. thaliana*

Wenn die Menge an  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol, die im Blatt von *A. thaliana* gemessen wurde, als Funktion gegen die Zeit aufgetragen wird, ergibt sich eine Regression positiver Steigung und eine gute Linearität ( $r^2 = 0,96$ ) (Abb. 3.1.A). Trotz allem zeigt sich eine hohe Variabilität, wenn man die Blattscheiben betrachtet. Um diese Variabilität genauer zu betrachten wurde eine Häufigkeitsverteilung mit allen 830 Blattscheiben erstellt (Abb. 3.1.B). Diese Verteilung ist rechtsschief, was durch 14 % der Blattscheiben ausgelöst wird, die eine höhere Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol zeigen als der Rest. Dies spiegelt sich auch in einem *Probability Plot* mit allen 830 Blattscheiben wider, der folgerichtig nicht linear ist (Abb. 3.1.C).

Werden diese 14 % der Blattscheiben aus der Berechnung ausgeschlossen, zeigt sich eine deutlich kleinere Variabilität in der Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol (Abb. 3.1.D) und dadurch konnte auch die Linearität verbessert werden ( $r^2 = 0,99$ ). Diese Häufigkeitsverteilung glich viel mehr einer Gauß-Verteilungskurve (Abb. 3.1.E) und es konnte auch eine deutlich bessere Linearität im *Probability Plot* gezeigt werden (Abb. 3.1.F).

Der Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung bestätigt diese Daten. Die Häufigkeitsverteilung in 3.1.E unterscheidet sich nicht signifikant von einer Gauß-Verteilung ( $p = 0,53$ ), während dies für 3.1.B nicht gezeigt werden konnte ( $p = 8,14 \cdot 10^{-10}$ ).

#### 3.1.2. Leitwertberechnung

Der Leitwert für die Permeation von  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol wurde mit Hilfe der Steigungen der Regressionsgeraden durch die Mittelwerte von Abb. 3.1.A und D mit der Formel 2.1. berechnet. Für Columbia-8 mit allen 830 Werten wurde ein Leitwert von  $4,88 \cdot 10^{-8} \pm 8,72 \cdot 10^{-9} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  (95 % Vertrauensbereich) und für die Col-8-Werte, die der Gauß-Verteilung entsprechen, wurde ein Leitwert von  $3,60 \cdot 10^{-8} \pm 3,4 \cdot 10^{-9} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  (95 % Vertrauensbereich) berechnet.

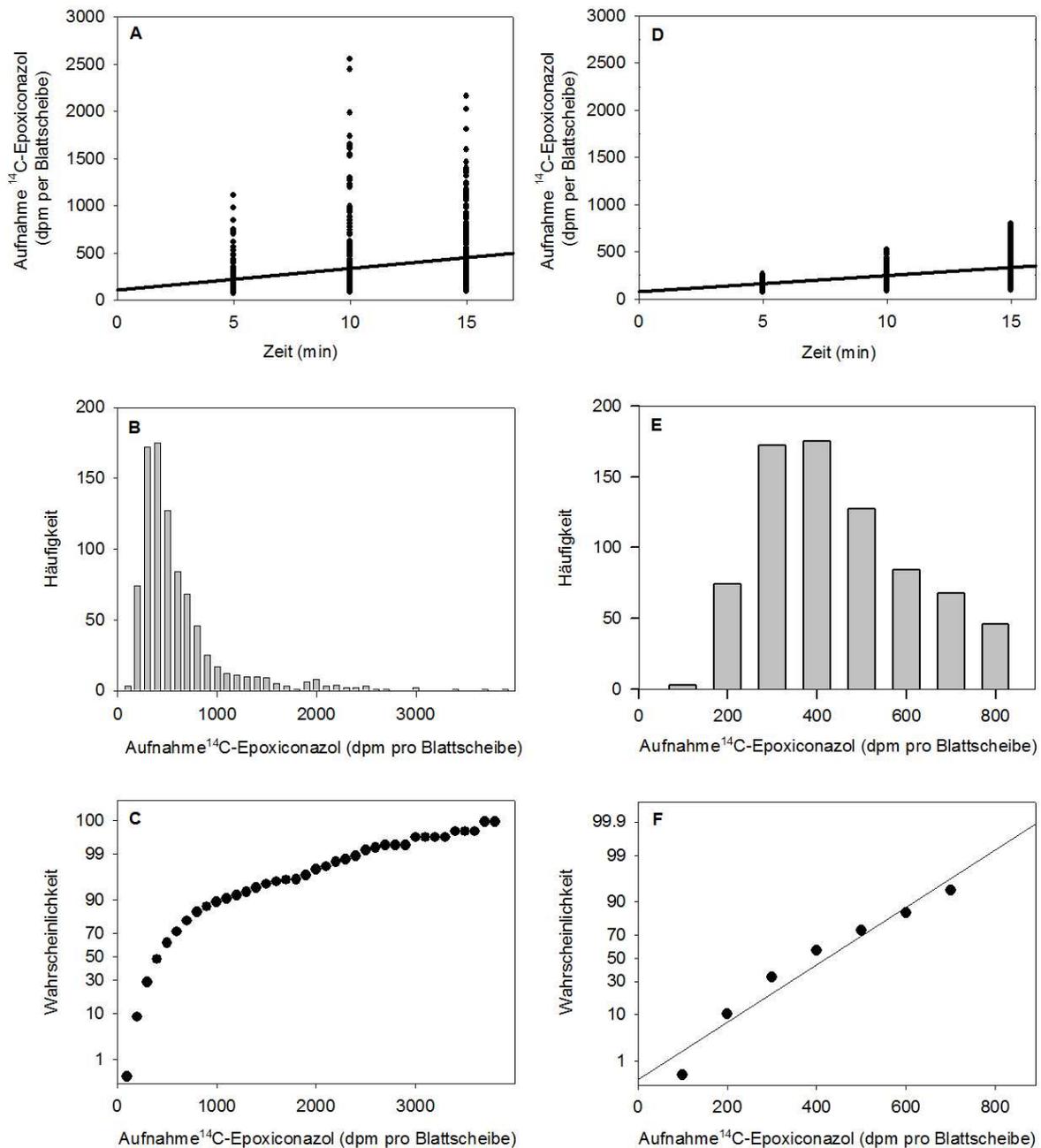


Abb. 3.1. **Permeationsassay für Blätter von *A. thaliana*** (A) Aufnahmekinetik für  $^{14}\text{C}$ -Epoiconazol (dpm) pro Blattscheibe als Funktion gegen die Beladungszeit (min) für Columbia-8 Blattscheiben; Zu den Zeitpunkten wurden 276 (5 min), 277 (10 min) und 277 (15 min) Blattscheiben untersucht. Die Regressionsgrade wurde an die Mittelwerte angepasst. (B) Häufigkeitsverteilung von der  $^{14}\text{C}$ -Epoiconazol-Aufnahme für alle Blattscheiben aus A. Alle Werte wurden auf den Zeitpunkt 15 min normiert und in Klassen von 100 dpm pro Blattscheibe eingeteilt; (C) *Probability Plot* für alle Werte aus B; (D) Aufnahmekinetik von  $^{14}\text{C}$ -Epoiconazol in Col-8 Blätter nachdem 14 % der rechtsschiefen Werte (alle über 800 dpm pro Blattscheibe) entfernt wurden. Zu den Zeitpunkten wurden 254 (5 min), 241 (10 min) und 256 (15 min) Blattscheiben untersucht. Die Regressionsgrade wurde an die Mittelwerte angepasst. (E) Häufigkeitsverteilung von der  $^{14}\text{C}$ -Epoiconazol-Aufnahme für alle Blattscheiben aus D. (F) *Probability Plot* für alle Werte aus E.

Der Leitwert nahm um 25 % ab, wenn 14 % der Werte nicht mit einberechnet wurden. Da durch einen *t*-test gezeigt werden konnte, dass die Werte signifikant unterschiedlich voneinander sind, ist die Verwendung des Mittelwertes statistisch nicht korrekt. Hier muss der Median verwendet werden. Der so errechnete Leitwert lag bei  $2,79 \cdot 10^{-8} \pm 6,35 \cdot 10^{-9} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  (95 % Vertrauensbereich). Die Darstellungsform der Aufnahmekinetiken durch einzelne Blattscheiben erfolgt daher durch Boxplots (3.3.).

### 3.1.3. Desorption von $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol aus dem Blatt von *A. thaliana*

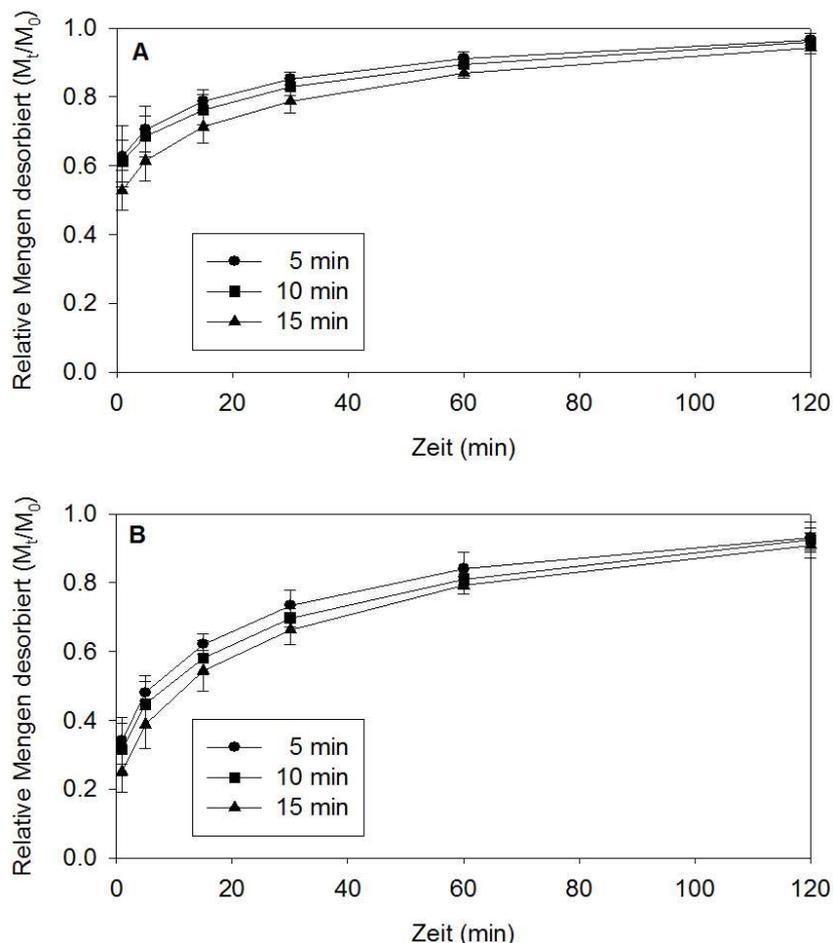


Abb. 3.2. Desorption von  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol aus dem Blatt von *A. thaliana*. Blätter von *A. thaliana* (Col-8) wurden für 5, 10 und 15 min mit  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol beladen. Desorptionskinetiken zeigen relative Mengen ( $M_t/M_0$ ), die desorbiert wurden, gegen die Desorptionszeiten (1, 5, 10, 15, 30, 60 und 120 min). Das Experiment wurde einmal unter Einbeziehung der Oberflächenradioaktivität (A), die in der ersten Sekunde abgewaschen wird, und einmal unter Ausschluss dieser Oberflächenradioaktivität (B) aufgetragen. Die Kinetik in a steigt deutlich schneller an als in b, aber bei beiden ist nach 60 min 80 % ausgewaschen. Die Datenpunkte spiegeln Mittelwerte ( $n = 3$ )  $\pm$  Standardabweichung (Sa) wider.

Die Desorption von  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol aus dem Blatt von *A. thaliana* wurde nach einer Beladung der Blätter mit  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol für 5, 10 und 15 min bestimmt. Die Desorptionskinetik war nicht linear und nach 2 h war nahezu alles  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol wieder aus dem Blatt desorbiert (Abb. 3.2.).

In dem Experiment wurden die Blätter nach der Beladung für 1 s in Wasser getaucht, um Donorreste, die an der Oberfläche haften, zu entfernen. Die Berechnungen wurden unter Einbeziehung und unter Ausschluss dieser so ermittelten Oberflächenradioaktivität durchgeführt. In der Abbildung sieht man, dass die Kinetiken in 3.2.A deutlich schneller ansteigen als in 3.2.B.

Eine Kompartiment-Analyse (mit Sigma Plot) ergab für beide Ansätze zwei Kompartimente ( $C_1$  und  $C_2$ ) und zwei Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  und  $k_2$  (Tab. 3.1.). Mit zunehmender Beladungszeit der Blätter mit  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol nahm  $C_1$  ab und  $C_2$  zu (Tab. 3.1.). Die Geschwindigkeitskonstanten waren unabhängig von der Beladungszeit, aber  $k_1$  war deutlich größer als  $k_2$  (Tab. 3.1.).

**Tab. 3.1. Kompartiment-Analyse der Desorptionskinetiken von  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol aus Blättern von *A. thaliana*.** Die Blätter wurden 5, 10 und 15 min mit  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol beladen und für 120 min desorbiert. Kompartiment-Analyse mit der Formel 2.2. ergab 2 Kompartimente  $C_1$  und  $C_2$  und den korrespondierenden Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  und  $k_2$  (in  $\text{min}^{-1} \pm \text{Sa}$ ). Die Berechnungen wurden unter Einbeziehung und unter Ausschluss der Oberflächenradioaktivität, die innerhalb der ersten Sekunde abgewaschen wurde, durchgeführt.

| Beladungszeit (min)                                     | $C_1 \pm \text{Sa}$ | $C_2 \pm \text{Sa}$ | $k_1 (\text{min}^{-1}) \pm \text{Sa}$ | $k_2 (\text{min}^{-1}) \pm \text{Sa}$ |
|---|---------------------|---------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| <u>unter Einbeziehung der Oberflächenradioaktivität</u> |                     |                     |                                       |                                       |
| 5   | $0,63 \pm 0,03$     | $0,33 \pm 0,03$     | $59,7 \pm 9,7$                        | $0,04 \pm 0,01$                       |
| 10  | $0,62 \pm 0,03$     | $0,34 \pm 0,03$     | $59,4 \pm 10,0$                       | $0,03 \pm 0,01$                       |
| 15  | $0,53 \pm 0,03$     | $0,40 \pm 0,05$     | $59,2 \pm 13,2$                       | $0,03 \pm 0,01$                       |
| <u>unter Ausschluss der Oberflächenradioaktivität</u>   |                     |                     |                                       |                                       |
| 5   | $0,41 \pm 0,03$     | $0,52 \pm 0,03$     | $1,54 \pm 0,47$                       | $0,03 \pm 0,01$                       |
| 10  | $0,39 \pm 0,03$     | $0,55 \pm 0,05$     | $1,49 \pm 0,50$                       | $0,02 \pm 0,01$                       |
| 15  | $0,32 \pm 0,05$     | $0,60 \pm 0,05$     | $1,29 \pm 0,54$                       | $0,03 \pm 0,01$                       |

### 3.1.4. Metabolismus von Epoxiconazol

Die Möglichkeit, dass Epoxiconazol im intakten Blatt von *A. thaliana* einem Metabolismus unterworfen ist, bei dem  $^{14}\text{CO}_2$  entsteht, wurde in ein Experiment überprüft, in dem die  $\text{CO}_2$ -bindende Eigenschaft von KOH genutzt wurde. Die Entstehung von  $^{14}\text{CO}_2$  wäre insofern ein Problem, da dieses entweichen und so die Messdaten verfälschen würde.

**Tab. 3.2. Überprüfung des Metabolismus der Substanz  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol nach 24 h Inkubation.** Angegeben ist der Prozentsatz der Substanz in den Kompartimenten Donor (nach der Messung), Blatt und KOH bezogen auf die Anfangsdonorkonzentration (100 %). Der Donor wurde dreimal entnommen und gemessen, der angegebene Wert entspricht MW  $\pm$  Sa.

| Kompartiment  | Blattscheiben  | Blatt          | ohne Blattmaterial |
|---------------|----------------|----------------|--------------------|
| Donor nachher | 96 % $\pm$ 2 % | 90 % $\pm$ 3 % | 101 % $\pm$ 3 %    |
| KOH-Lösung    | 0 %            | 0 %            | 0 %                |
| Blattmaterial | 7 %            | 8 %            | 0 %                |

Die meiste Radioaktivität verblieb nach 24 h im Donor und ein Teil wurde in die Blattscheiben bzw. in das intakte Blatt aufgenommen. Innerhalb der gemessenen Zeit war kein  $^{14}\text{C}$  in der KOH-Lösung nachzuweisen (Tab. 3.2.).

### 3.1.5. Überprüfung der *A. thaliana* Blätter auf Bakterien- und Pilzbewuchs

Auch der Befall der Blätter mit Bakterien und Pilzen kann zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen, da diese den radioaktiven Stoff aufnehmen könnten. Ein solcher Befall muss ausgeschlossen werden. Hierfür wurde ein Blattabdruck von *A. thaliana* aus der Klimakammer und eines *H. helix* Blattes aus dem Freiland auf LB-Medium angefertigt. Auf der Platte von *H. helix* waren nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C Bakterienkolonien und ein Pilzbewuchs zu erkennen, wohingegen die Platten von *A. thaliana* frei von Bakterien- und Pilzbewuchs waren (Abb. 3.3.).

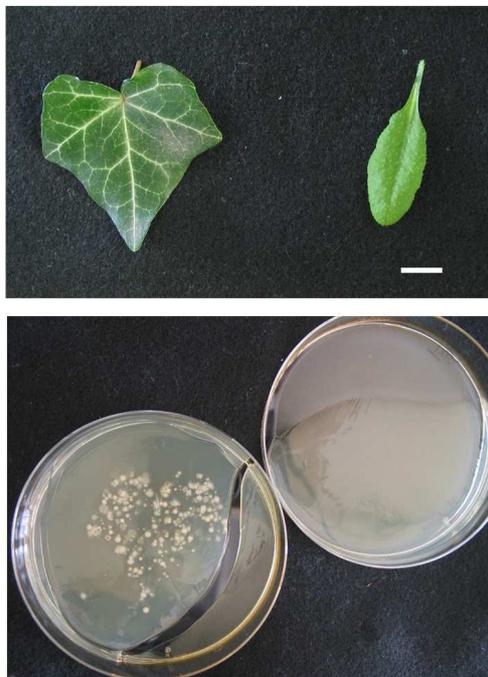


Abb. 3.3. **Blattabdrücke von *A. thaliana* und *H. helix* auf LB-Agar.** Ein Blatt von *H. helix*, das im Umfeld des Instituts gesammelt wurde, und ein *A. thaliana* Blatt aus der Klimakammer wurden auf einer Agarplatte aufgedrückt und diese anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Platte von *H. helix* zeigte Bakterien- und Pilzwachstum (linke Platte), die Platte von *A. thaliana* zeigte keinen Befall (rechte Platte). Der Größenbalken entspricht 1 cm.

### 3.1.6. Permeationsassay mit Silwet

Um durch ein Experiment zu zeigen, dass es in dem Permeationsassay nicht zu einer Infiltration kommt, wurde ein Experiment durchgeführt, in dem der Donorlösung Silwet L-77 zugefügt wurde. Silwet L-77 ist ein nicht-ionisches Netzmittel und reduziert die Oberflächenspannung deutlich. So wird eine stärkere Benetzung erzielt und die Infiltration der Stomata. In dem Diagramm (Abb. 3.4.) wird die Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol pro Blattscheibe gegen die Zeit (min) aufgetragen. Die Infiltration der Blätter erfolgte sofort und schnell, so dass anschließend nur noch ein gleich bleibender Wert gemessen werden konnte.

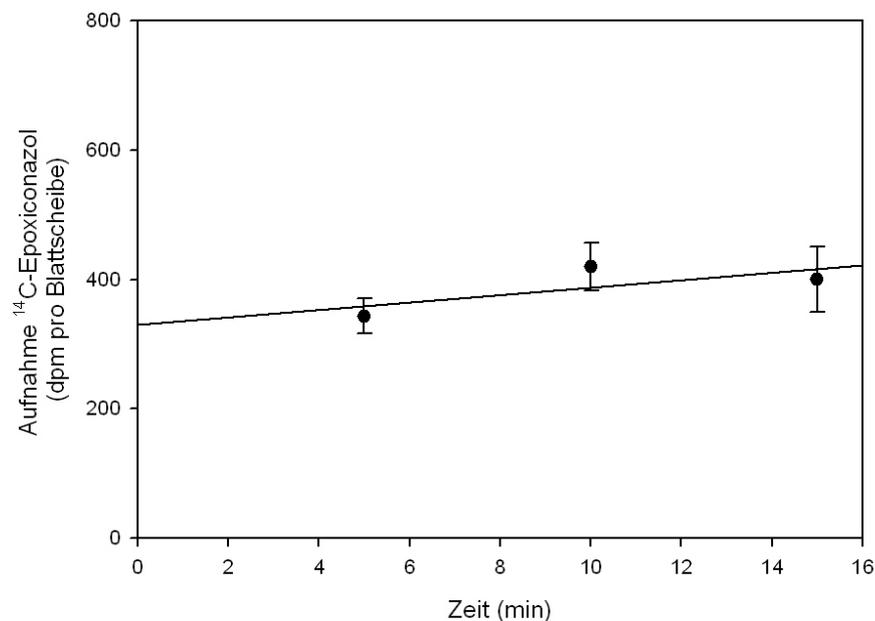


Abb. 3.4. **Permeation von  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol mit Silwet.** Permeation von  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol für Col-8 mit Zugabe von Silwet; In dem Diagramm wurde die Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol (dpm) pro Blattscheibe gegen die Zeit (min) aufgetragen.

### 3.1.7. Austrocknung von *A. thaliana* Blättern

Es wurde ein Experiment durchgeführt, in dem der Wasserverlust für *A. thaliana* (Col-8) Blätter bestimmt wurde. Die Blätter wurden bei 25 °C und auf Silicagel getrocknet, was für eine maximal treibende Kraft sorgt. Der Wasserverlust wurde über 8 h mit der Waage dokumentiert (Abb. 3.5.). Innerhalb der ersten 30 min fällt das Gewicht noch am stärksten. In diesen ersten 30 min schließen die Stomata. Danach stellt sich eine fast lineare Kinetik ein. Der Wasserverlust verlangsamt sich nach ungefähr 6 h und nach 24 h waren die Blätter komplett ausgetrocknet.

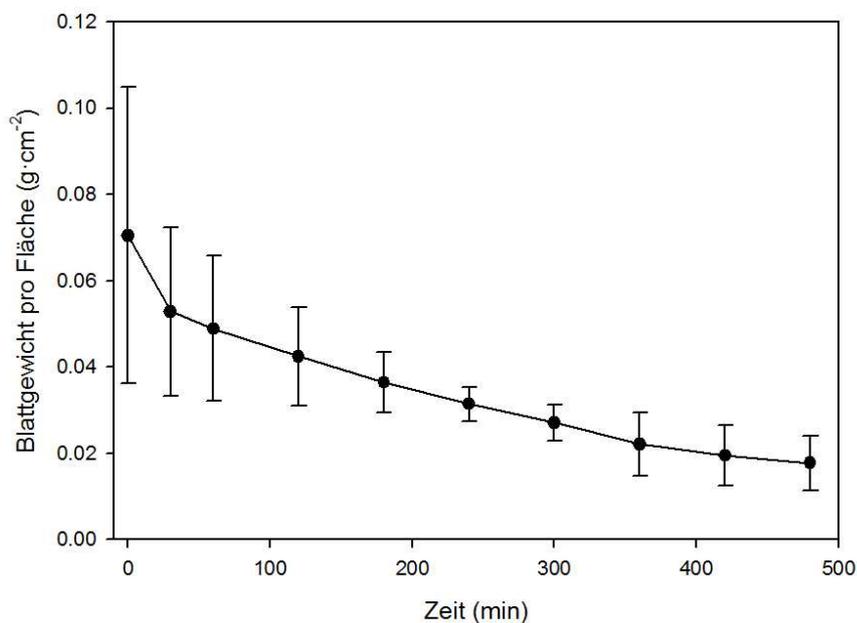


Abb. 3.5. **Austrocknung von *A. thaliana* (Col-8) Blättern.** Das Gewicht (g) der Blätter pro Fläche (cm<sup>2</sup>) wurde gegen die Zeit (min) aufgetragen. In den ersten 30 min war der Wasserverlust am stärksten, danach stellt sich eine fast lineare Kinetik ein. Nach 6 h verlangsamt sich der Gewichtsverlust und nach 24 h waren die Blätter komplett ausgetrocknet.

### 3.2. Co-Permeabilität von $^{14}\text{C}$ -Epoconazol und $^3\text{H}_2\text{O}$ für die isolierte Kutikula von *P. laurocerasus*, *C. aurantium*, *H. helix* und *C. annuum*

Isolierte Kutikulamembranen von verschiedenen Spezies wurden genutzt um die kutikuläre Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol und  $^3\text{H}_2\text{O}$  simultan zu messen. Experimente dieser Art wurden bereits von Niederl *et al.*, 1998 durchgeführt, in denen eine hohe Korrelation der Leitwerte von organischen Substanzen mit den Leitwerten von Wasser gezeigt werden konnten. Die hier durchgeführten Experimente zeigen eine lineare Abhängigkeit zwischen der Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol und  $^3\text{H}_2\text{O}$ . Die Leitwerte werden in  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  und mit 95 % Vertrauensbereichen angegeben.

#### 3.2.1. *P. laurocerasus*

Die Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol und  $^3\text{H}_2\text{O}$  verlief linear (Abb. 3.4.A). Wurden alle Werte der  $^3\text{H}_2\text{O}$ -Permeation von allen neun Kutikularmembranen zu allen Messzeitpunkten als Funktion gegen die Messwerte der  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol-Permeation aufgetragen, ergab sich eine deutliche Korrelation (Abb. 3.4.B). Diese Korrelation konnte durch die Auftragung der Einzelleitwerte für  $^3\text{H}_2\text{O}$  aller neun Kutikularmembranen gegen die Leitwerte für  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol gestützt werden (Abb. 3.4.C).

Die durch Abb. 3.4.C erstellte Regressionsgrade und so errechnete Formel 3.1. gibt die Beziehung zwischen den Leitwerten für  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol und für  $^3\text{H}_2\text{O}$  für *P. laurocerasus* wider.

$$P_{^3\text{H}_2\text{O}} = 2,88 \cdot P_{^{14}\text{C-Epoconazol}} + 9,7 \cdot 10^{-11} \quad (\text{Formel 3.1.})$$

Die Permeabilitäten der einzelnen Kutikularmembranen waren bei beiden Substanzen durch eine hohe Variabilität geprägt. Die höchsten Werte unterschieden sich von den niedrigsten um einen Faktor von 10. Die errechneten Leitwerte lagen bei  $1,4 \cdot 10^{-10} \pm 1,0 \cdot 10^{-10} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  für  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol and  $5,0 \cdot 10^{-10} \pm 3,0 \cdot 10^{-10} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  für  $^3\text{H}_2\text{O}$ .

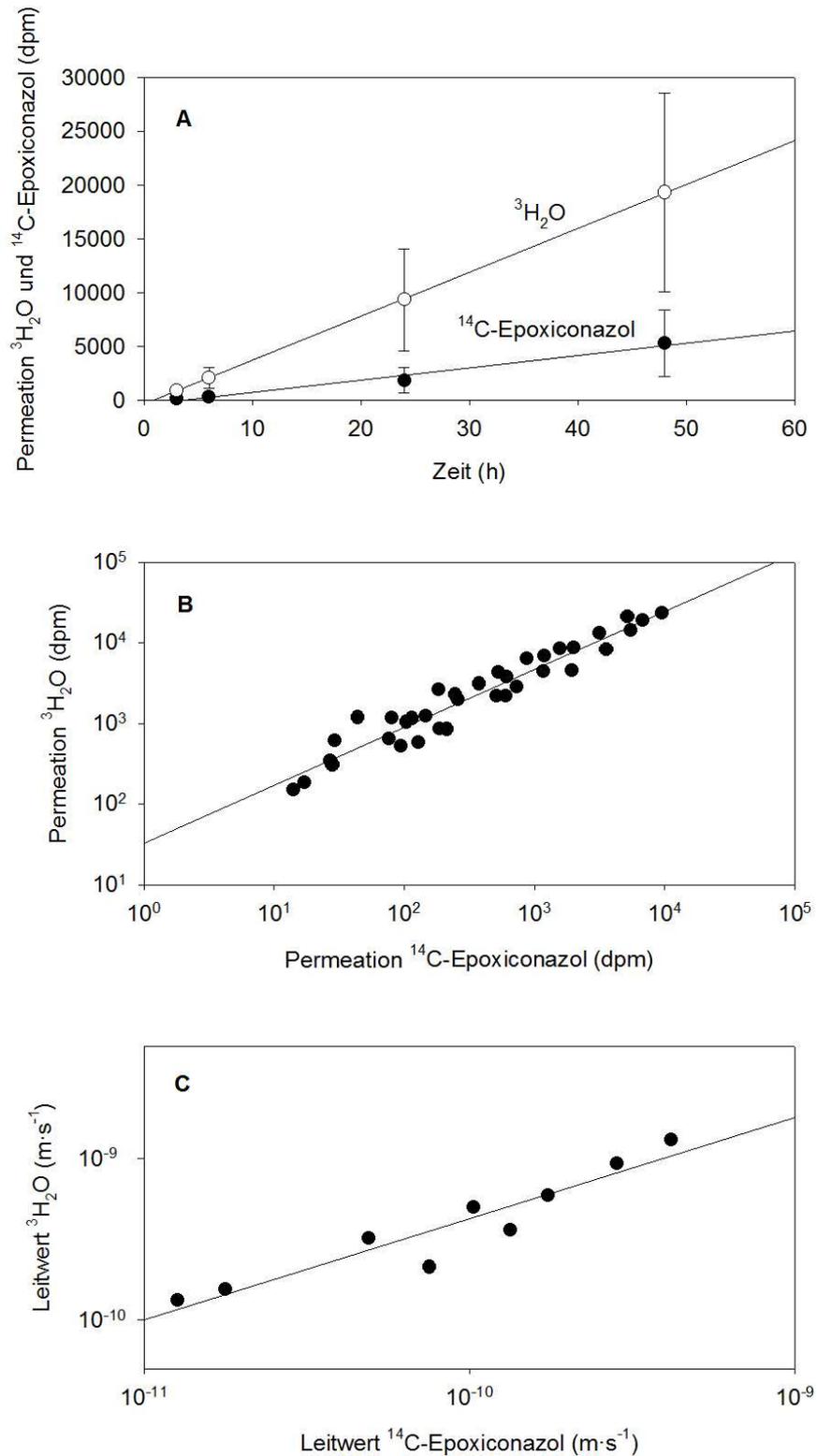


Abb. 3.6. Co-Permeation von  $^3\text{H}_2\text{O}$  und  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol durch die *P. laurocerasus* Kutikula. (A) Auftragung von Mengen an  $^3\text{H}_2\text{O}$  und  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol als Funktion der Zeit ( $r^2 = 0,98$  für  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol und  $r^2 = 0,99$  für  $^3\text{H}_2\text{O}$ ). Die Datenpunkte zeigen Mittelwerte mit Vertrauensbereichen (95 %); (B) Korrelation der einzelnen Messwerte ( $r^2 = 0,93$ ); (C) Korrelation der Leitwerte von  $^3\text{H}_2\text{O}$  und  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol ( $r^2 = 0,97$ ).

### 3.2.2. *C. aurantium*

Die Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol und  $^3\text{H}_2\text{O}$  verlief bei *C. aurantium* ebenfalls linear (Abb. 3.7.A). Deutlich zu erkennen war allerdings die höhere Aufnahme der radioaktiven Substanzen im Vergleich mit *P. laurocerasus*, welche sich auch in deutlich höheren Leitwerten widerspiegelt. Die errechneten Leitwerte lagen bei  $1,6 \cdot 10^{-9} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1} \pm 2,7 \cdot 10^{-10}$  für  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol und  $3,9 \cdot 10^{-9} \pm 8,0 \cdot 10^{-10} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  für  $^3\text{H}_2\text{O}$ . Auch hier konnte eine deutliche Korrelation der Einzelmesswerte jeder Kutikularmembran zu jedem Messzeitpunkt für  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol und  $^3\text{H}_2\text{O}$  (Abb. 3.7.B) und der Auftragung der Einzelleitwerte von  $^3\text{H}_2\text{O}$  aller elf Kutikularmembranen gegen die Leitwerte der  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol gezeigt werden (Abb. 3.7.C).

Die durch Abb. 3.7.C errechnete Formel (3.2.) zeigt, dass die Beziehung zwischen der Permeation von  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol und  $^3\text{H}_2\text{O}$  für *C. aurantium* der von *P. laurocerasus* ähnelt.

$$P_{^3\text{H}_2\text{O}} = 2,37 \cdot P_{^{14}\text{C-Epoxyconazol}} + 8 \cdot 10^{-11} \quad (\text{Formel 3.2.})$$

### 3.2.3. *H. helix*

Die Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol und  $^3\text{H}_2\text{O}$  verlief bei der Kutikula von *H. helix* ebenfalls linear (Abb. 3.8.A), wobei bei für  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol zunächst eine Anlaufzeit von 24h benötigt wurde, bevor die Linearität erreicht wurde.

Die errechneten Leitwerte lagen bei  $8,3 \cdot 10^{-10} \pm 1,5 \cdot 10^{-9} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  für  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol und  $5,6 \cdot 10^{-10} \pm 1,1 \cdot 10^{-9} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  für  $^3\text{H}_2\text{O}$ .

Auch hier wurde eine Korrelation der Einzelmesswerte jeder Kutikula zu jedem Messzeitpunkt erstellt (Abb. 3.8.C) und die Einzelleitwerte von  $^3\text{H}_2\text{O}$  gegen die Leitwerte von  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol (Abb. 3.8.B) aufgetragen. Auch hier konnte so eine Formel erstellt werden, die das Verhältnis der Leitwerte für  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol und  $^3\text{H}_2\text{O}$  untereinander beschreibt (Formel 3.3.)

$$P_{^3\text{H}_2\text{O}} = 1,82 \cdot P_{^{14}\text{C-Epoxyconazol}} + 1 \cdot 10^{-10} \quad (\text{Formel 3.3.})$$

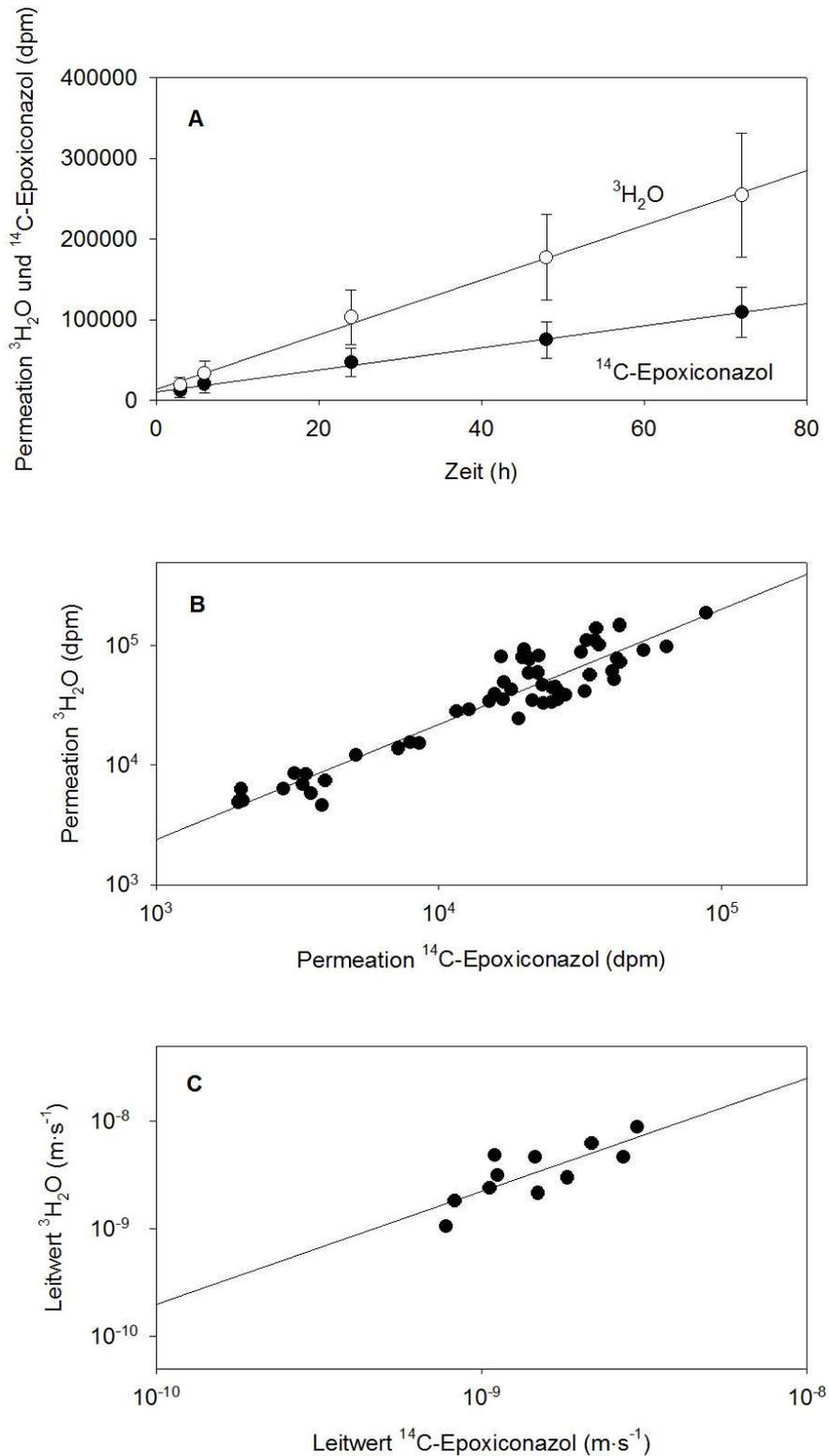


Abb. 3.7. **Co-Permeation von  $^3\text{H}_2\text{O}$  und  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol durch die *C. aurantium* Kutikula.** (A) Auftragung von Mengen an  $^3\text{H}_2\text{O}$  und  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol als Funktion der Zeit ( $r^2 = 0,99$  für  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol und  $r^2 = 0,99$  für  $^3\text{H}_2\text{O}$ ). Die Datenpunkte zeigen Mittelwerte mit Vertrauensbereichen (95 %); (B) Korrelation der einzelnen Messwerte ( $r^2 = 0,88$ ); (C) Korrelation der Leitwerte von  $^3\text{H}_2\text{O}$  und  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol ( $r^2 = 0,65$ )

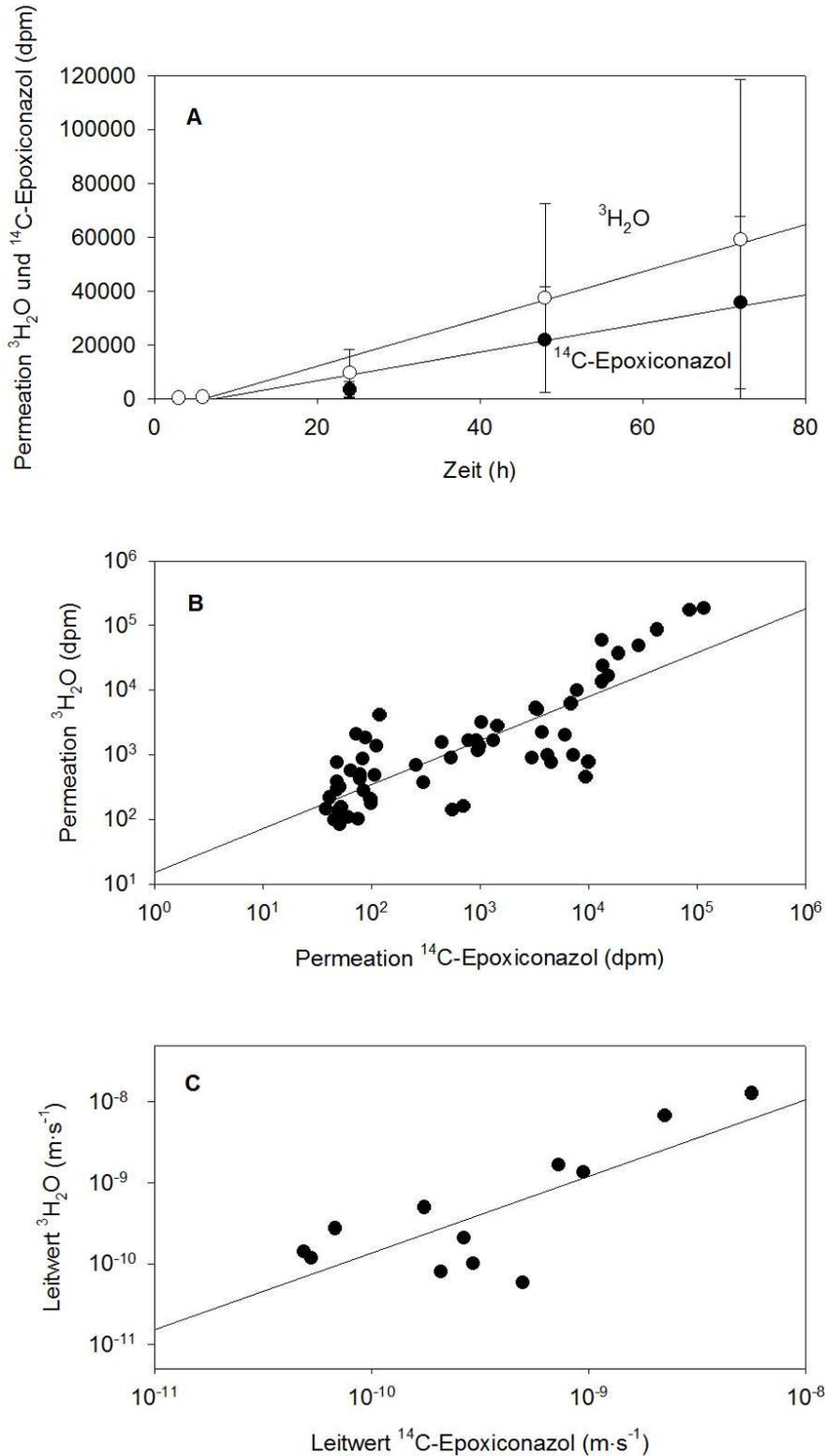


Abb. 3.8. **Co-Permeation von  $^3\text{H}_2\text{O}$  und  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol durch die *H. helix* Kutikula.** (A) Auftragung von Mengen an  $^3\text{H}_2\text{O}$  und  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol als Funktion der Zeit ( $r^2 = 0,96$  für  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol und  $r^2 = 0,98$  für  $^3\text{H}_2\text{O}$ ). Die Datenpunkte zeigen Mittelwerte mit Vertrauensbereichen (95 %); (B) Korrelation der einzelnen Messwerte ( $r^2 = 0,67$ ); (C) Korrelation der Leitwerte von  $^3\text{H}_2\text{O}$  und  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol ( $r^2 = 0,97$ ).

### 3.2.4. *C. annuum*

Die Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol und  $^3\text{H}_2\text{O}$  verlief bei der Kutikula von *C. annuum* linear (Abb. 3.9.A). Allerdings nahm die Donorkonzentration von  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol während des Experimentes stark ab auf 22 % ( $\pm 7$  %, Sa) der ursprünglichen Konzentration, so dass keine Leitwerte berechnet werden dürfen. Hier konnte allerdings gezeigt werden, dass 31 % ( $\pm 9$  %, Sa) der Anfangsdonorkonzentration in der Kutikula verblieben. Dieser Wert war bei den anderen Spezies deutlich niedriger (*P. laurocerasus* 8 % ( $\pm 4$  %, Sa) *C. aurantium* 6 % ( $\pm 4$  %, Sa); *H. helix* 9 % ( $\pm 4$  %, Sa)).

Die Leitwerte wurden trotz allem berechnet und zur Berechnung wurde die Donorkonzentration nach dem Experiment verwendet. Die so errechneten Leitwerte lagen bei  $5,5 \cdot 10^{-8} \pm 3,3 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  für  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol und  $8 \cdot 10^{-9} \pm 2,2 \cdot 10^{-9} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  für  $^3\text{H}_2\text{O}$ .

Auch hier wurde eine Korrelation der Einzelmesswerte jeder Kutikula zu jedem Messzeitpunkt erstellt (Abb. 3.9.C) und die Einzelleitwerte von  $^3\text{H}_2\text{O}$  gegen die Leitwerte von  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol aufgetragen (Abb. 3.9.B). Hier konnte keine klare Korrelation erstellt werden ( $r^2 = 0,0007$ ). So wurden die hier erstellten Daten aus der Gesamtbetrachtung der Co-Permeabilität von  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol und  $^3\text{H}_2\text{O}$  vernachlässigt.

### 3.2.5. Gesamtbetrachtung Co-Permeabilität $^3\text{H}_2\text{O}$ und $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol

Die Leitwerte für  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol und für  $^3\text{H}_2\text{O}$  zeigten für *P. laurocerasus*, *C. aurantium* und *H. helix* alle eine sehr ähnliche Korrelation (Formel 3.1., 3.2. und 3.3.). Um eine genauere Gleichung für eine Vorhersage der Wasserpermeabilität für *A. thaliana* zu erlangen, wurden alle drei Spezies gemeinsam in einem Diagramm dargestellt (3.10.A und B). Auch hier zeigte sich eine gute Korrelation, wurden die Leitwerte für  $^3\text{H}_2\text{O}$  gegen die Leitwerte von  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol aufgetragen (Abb. 3.10.A). Eine gute Korrelation konnte auch mit den Einzelmesswerten erreicht werden (Abb. 3.10.B).

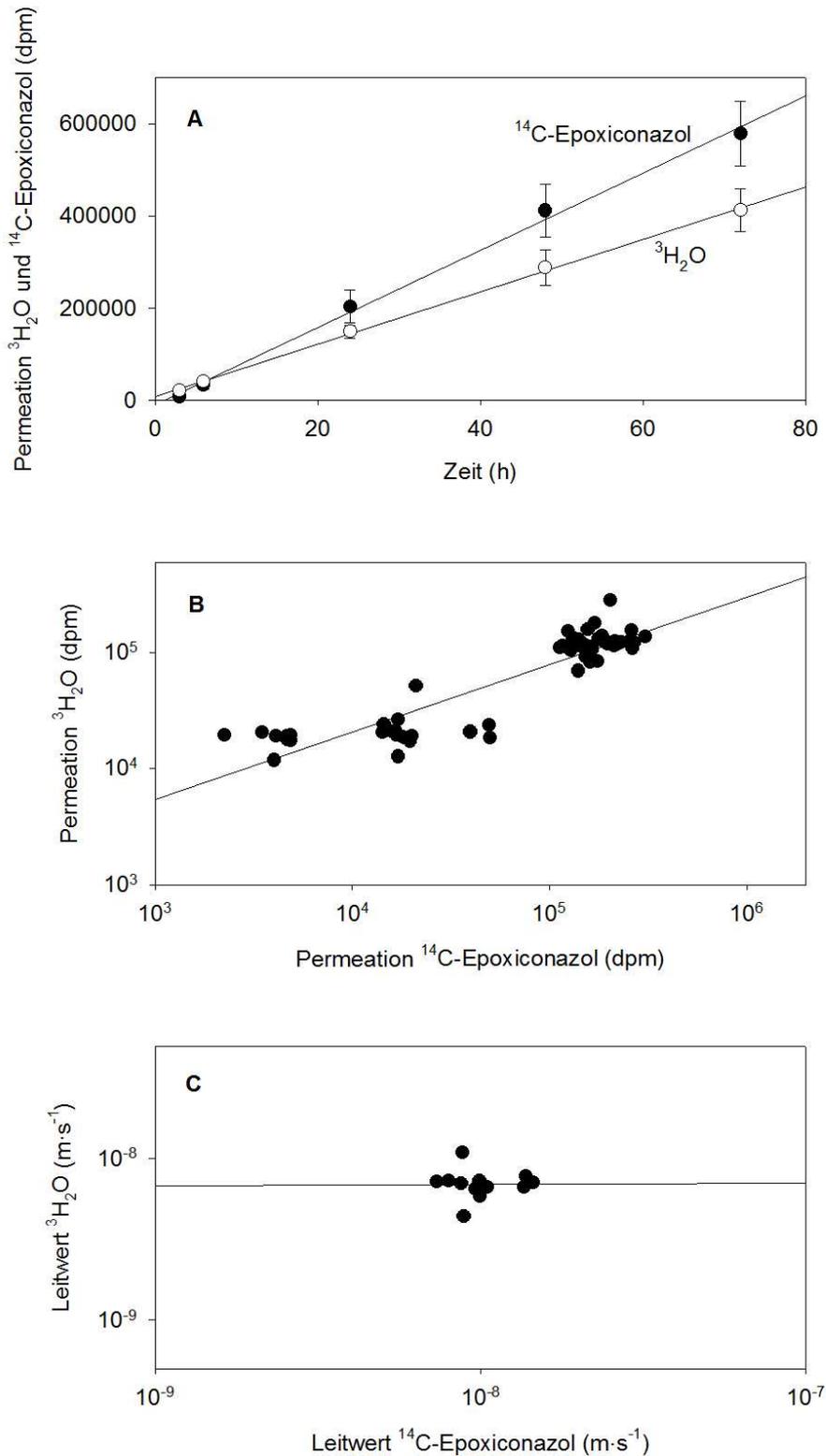


Abb. 3.9. **Co-Permeation von  $^3\text{H}_2\text{O}$  und  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol durch die *C. annuum* Kutikula.** (A) Auftragung von Mengen an  $^3\text{H}_2\text{O}$  und  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol als Funktion der Zeit ( $r^2 = 0,99$  für  $^{14}\text{C}$  Epoxiconazol und  $r^2 = 0,99$  für  $^3\text{H}_2\text{O}$ ) Fehlerbalken geben 95 % Vertrauensbereiche an; (B) Korrelation der einzelnen Messwerte ( $r^2 = 0,83$ ); (C) Korrelation der Leitwerte von  $^3\text{H}_2\text{O}$  und  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol ( $r^2 = 0,0007$ ).

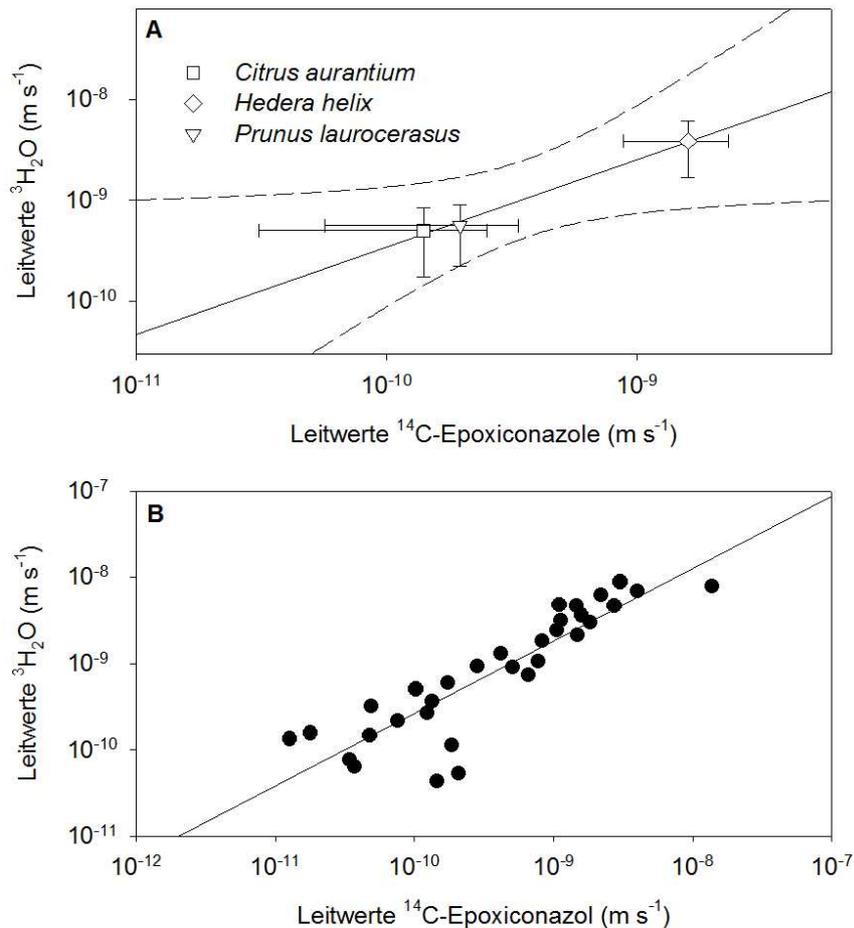


Abb 3.10. **Korrelation der Leitwerte der Kutikula von *P. laurocerasus*, *C. aurantium* und *H. helix* für Epoxiconazol und Wasser.** (A) Mittelwerte der Leitwerte aus den Einzelexperimenten mit acht, elf und zwölf Kutikularmembranen mit Vertrauensbereichen (95 %) ( $r^2 = 0,99$ ) (B) Einzelleitwerte aus den Einzelexperimenten ( $r^2 = 0,85$ )

Die durch Abb. 3.10.A erstellte Regressionsgrade und so errechnete Formel 3.4. gibt die Beziehung zwischen der Permeation von  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol und  $^3\text{H}_2\text{O}$  für die Kutikula von *P. laurocerasus*, *C. aurantium* und *H. helix* wider.

$$P_{\text{H}_2\text{O}} = 2,3 \cdot P_{\text{C-Epoxiconazol}} + 9,7 \cdot 10^{-11} \quad (\text{Formel 3.4.})$$

Diese Formel kann verwendet werden, um die Permeabilität für  $^3\text{H}_2\text{O}$  aus der Permeabilität für  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol für andere Spezies vorherzusagen. So können z.B. auch Vorhersagen über die Wasserpermeabilität für die Kutikula von *A. thaliana* gemacht werden, bei der durch die Anwesenheit von Stomata eine direkte Messung der Wasserpermeabilität nicht möglich ist.

### 3.2.6. Permeation von $^{14}\text{C}$ -Epoconazol in das intakte Blatt von *P. laurocerasus*

Die Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol wurde auch für das intakte Blatt von *P. laurocerasus* bestimmt (Abb. 3.11.). Hierfür wurden Blattscheiben in Permeationskammern gespannt und mit Donor versetzt. Die Diagramme zeigen die Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol (dpm) pro Blattscheibe gegen die Zeit (h) und die Regressionsgeraden durch die Mittelwerte zeigen eine positive Steigung und eine gute Linearität ( $r^2 = 0,98$  für adaxiale Seite und  $r^2 = 0,99$  für die abaxiale Seite). Die berechneten Leitwerte ergaben  $4,22 \cdot 10^{-10} \pm 1,07 \cdot 10^{-10} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  für die Blattoberseite und  $5,76 \cdot 10^{-10} \pm 7,14 \cdot 10^{-11} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  für die Blattunterseite.

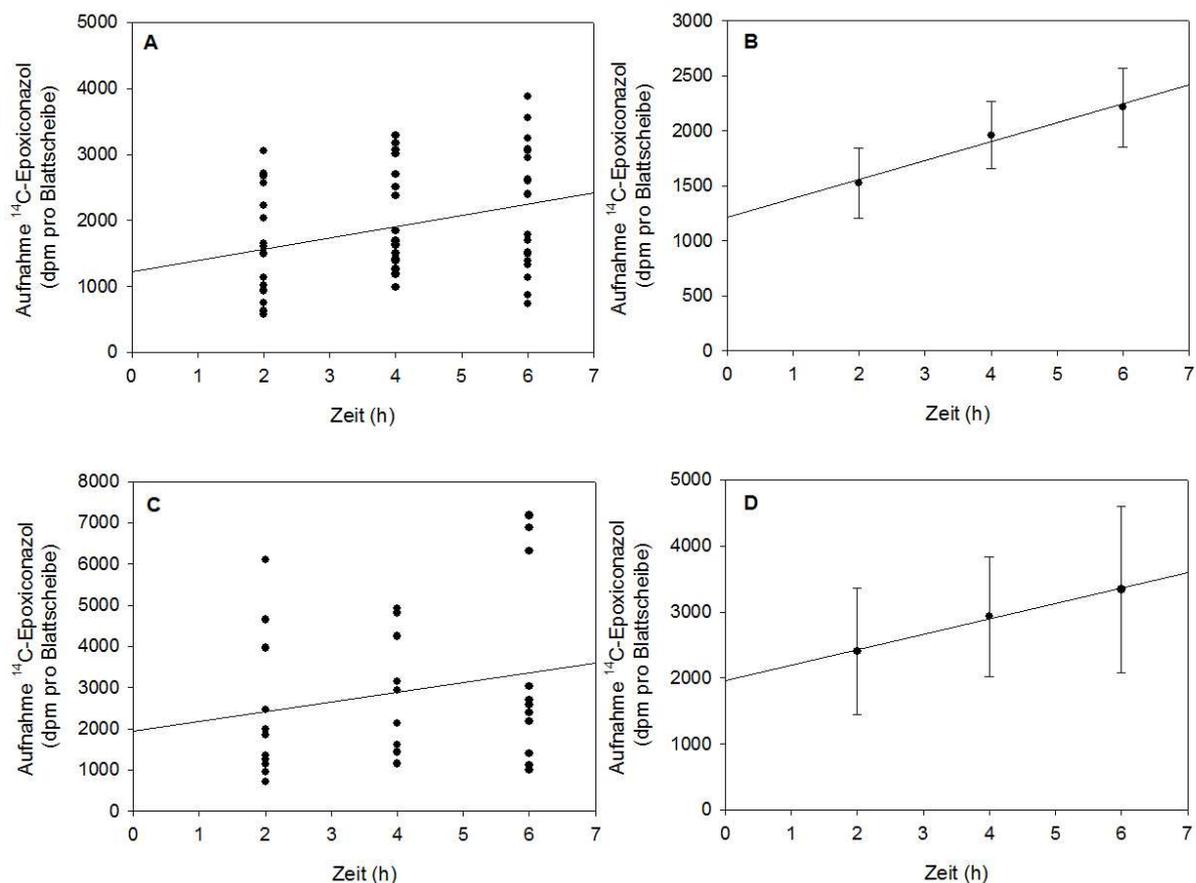


Abb 3.11. **Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol in das Blatt von *P. laurocerasus*.** Die Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol (dpm) pro Blattscheibe wurde gegen die Zeit (h) aufgetragen. (A) und (B) adaxiale Blattseite (oben), Darstellung aller verwendeten 58 Blattscheiben in (A) und Darstellung der Mittelwerte mit Vertrauensbereichen (95 %) in (B); (C) und (D) abaxiale Blattseite (unten), Darstellung aller verwendeten 31 Blattscheiben (C) und Darstellung der Mittelwerte mit Vertrauensbereichen (95 %) in (D).

### 3.3. Kutikula-Mutanten von *A. thaliana*: Permeabilität und Wachs- und Kutinzusammensetzung

Der in 3.1. beschriebene Permeationsassay wurde verwendet, um die verschiedenen Kutikula-Mutanten von *A. thaliana* auf ihre Durchlässigkeit zu überprüfen (Leitwerte  $\pm$  Sa). Gleichzeitig sollen durch chemische Analysen deren Wachs- und Kutinzusammensetzung (Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (Sa)) untersucht werden, um Hinweise darauf zu finden, welche Eigenschaften der Kutikula wichtig für die Barriere zur Außenwelt sind.

#### 3.3.1. Permeabilität und Wachsbelegung der Wildtypen

Durch die Auswahl der verschiedenen Mutanten wurde die Analyse von vier Wildtypen von *A. thaliana* notwendig.

##### Permeabilität von den Wildtypen Col-8, Col-0, Ler und Ws

Neben Col-8 (Abb. 3.1.A und Abb. 3.12.A) wurden auch die Wildtypen Col-0, Ler und Ws auf ihre Permeabilität untersucht (Abb. 3.12.B, C und D). In den gezeigten Diagrammen (Abb. 3.12.A - D) wird die Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol (dpm) pro Blattscheibe gegen die gemessene Zeit (min) aufgetragen. Die Regressionsgerade, die durch die Mediane angepasst wurde, ergab bei allen Wildtypen eine positive Steigung und ein hohes Bestimmtheitsmaß für Col-8 ( $r^2 = 0,99$ ), für Col-0 ( $r^2 = 0,99$ ) und für Ws  $r^2 = 0,97$  (Abb. 3.12.A, B und D). Nur Ler ( $r^2 = 0,21$ ) hatte ein schlechtes Bestimmtheitsmaß (Abb. 3.12.C). Die mit den Steigungen errechneten Leitwerte ergaben für Col-8  $2,79 \cdot 10^{-8} \pm 3,78 \cdot 10^{-9} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  (erstellt mit 830 Blattscheiben), für Col-0  $5,52 \cdot 10^{-9} \pm 9,85 \cdot 10^{-10} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  (erstellt mit 353 Blattscheiben), für Ler  $1,74 \cdot 10^{-7} \pm 5,92 \cdot 10^{-7} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  (erstellt mit 100 Blattscheiben) und für Ws  $1,39 \cdot 10^{-7} \pm 4,13 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  (erstellt mit 440 Blattscheiben). Schon die verschiedenen Wildtypen zeigten eine ganz unterschiedliche Permeabilität, die um einen Faktor 30 variierte.

Die Aufnahmekinetiken der Wildtypen werden in den Abbildungen der Mutanten (Abb. 3.13. - 3.23.) erneut zur Verdeutlichung als gestrichelte Linie gezeigt.

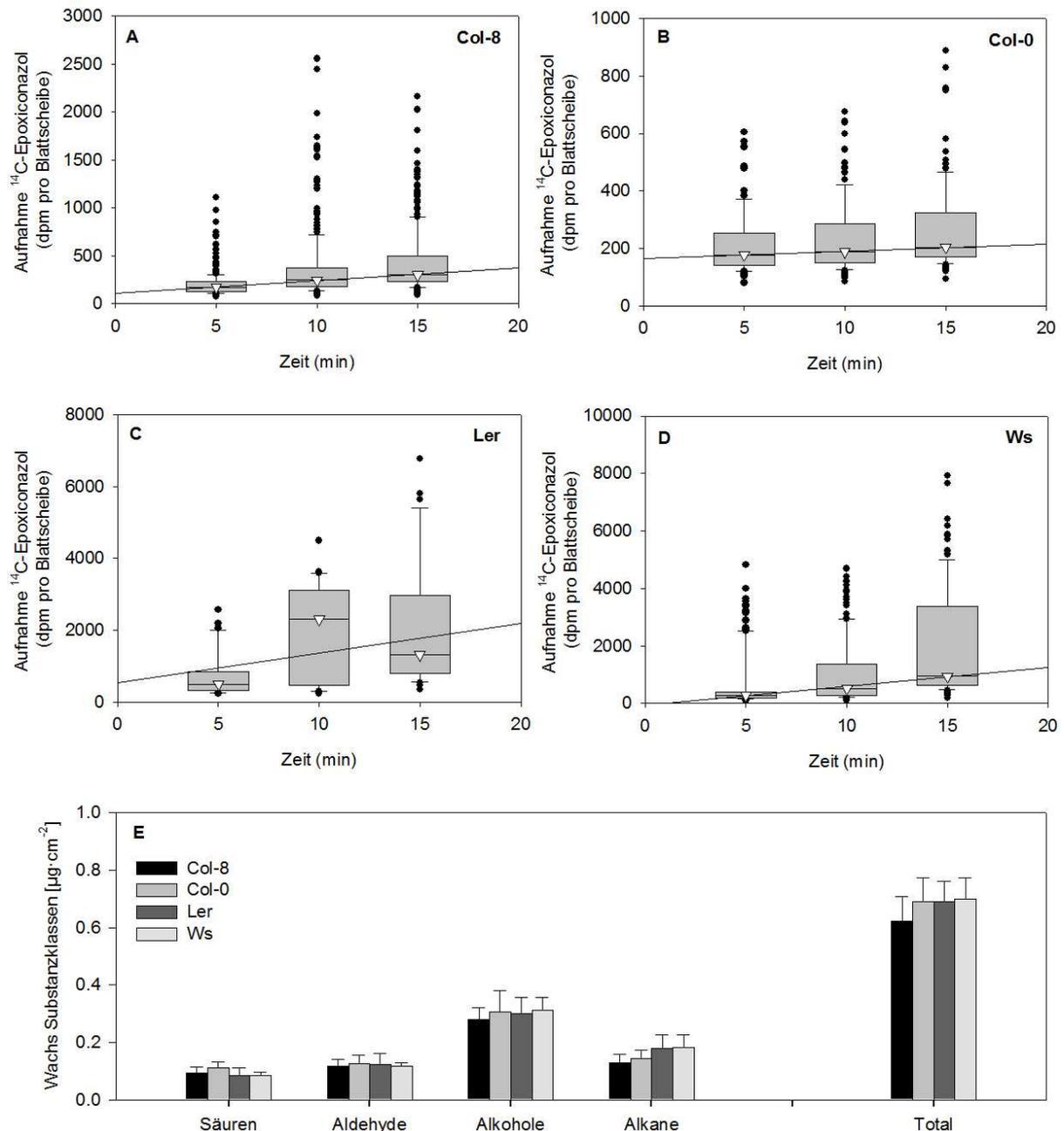


Abb. 3.12. **Permeation von  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol und Wachsbelegung für Wildtypen von *A. thaliana*.** Permeation von  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol für Col-8 (A), Col-0 (B), Ler (C) und Ws (D). In dem Diagramm wurde die Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol (dpm) pro Blattscheibe gegen die Zeit (min) aufgetragen. Die Regressionsgrade wurde durch die Mediane angepasst. (E) Wachsbelegung (Substanzklassen und Gesamtwachs) der vier Wildtypen ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) ( $n = 5$ ,  $\text{MW} \pm \text{Sa}$ ).

### Wachsbelegung der Wildtypen

In der Wachsanalytik zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (*t-test*) zwischen den verschiedenen Wildtypen (Abb. 3.12.E; Tab. Anhang 8.1.1. und 8.1.2.). Die Gesamtwachsmenge betrug für Col-8  $0,62 \pm 0,09 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , für Col-0  $0,69 \pm$

0,08  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , für Ler  $0,69 \pm 0,07 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  und für Ws  $0,70 \pm 0,07 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Die Mengen der Substanzklassen Säuren, Aldehyde, Alkohole und Alkane waren nicht signifikant voneinander verschieden.

### 3.3.2. Permeabilität, Wachs- und Kutinzusammensetzung von *wax2*, *cer3* und *yre*

Bei den *knockout* Mutanten *wax2* (kompletter *knockout*), *cer3* (partieller *knockout*) und *yre* (kompletter *knockout*) handelt es sich um drei Allele desselben Gens. Die Funktion des entsprechenden Proteins ist noch weitestgehend unbekannt. Bekannt sind die Auswirkungen auf die Wachsmenge, die in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert ist (Chen *et al.*, 2003; Rowland *et al.*, 2007; Kurata *et al.*, 2003).

#### Permeabilität *wax2*, *cer3* und *yre*

Die mit den Aufnahmekinetiken (Abb. 3.13.A für *wax2* und 3.14.A für *cer3* und 3.14.B für *yre*) erstellten Regressionsgeraden ergaben eine positive Steigung und eine Linearität für *wax2* von  $r^2 = 0,98$ , für *cer3* von  $r^2 = 0,99$  und für *yre* von  $r^2 = 0,84$ .

Die Graphen der Mutanten zeigten eine deutlich höhere Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol als die Wildtypen, was sich auch in den errechneten Leitwerten widerspiegelt. Der Leitwert für *wax2* betrug  $5,12 \cdot 10^{-7} \pm 1,34 \cdot 10^{-7} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  (erstellt mit 240 Blattscheiben) der korrespondierende Wildtyp Col-8 hatte einen Leitwert von  $2,79 \cdot 10^{-8} \pm 3,78 \cdot 10^{-9} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  (siehe 3.3.1.). Dies war ein deutlicher Anstieg der Permeabilität um den Faktor 18.

Diese Daten wurden durch die berechneten Leitwerte für *cer3* von  $3,78 \cdot 10^{-7} \pm 7,22 \cdot 10^{-9} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  (erstellt mit 114 Blattscheiben) und *yre* von  $2,34 \cdot 10^{-7} \pm 1,80 \cdot 10^{-7} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  (erstellt mit 218 Blattscheiben) im Vergleich mit ihrem korrespondierenden Wildtyp Col-0  $5,52 \cdot 10^{-9} \pm 9,85 \cdot 10^{-10} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  (siehe 3.3.1.) bestätigt. Der Effekt ist hier sogar noch stärker, die Permeabilität steigt in den Mutanten um einen Faktor 68 bzw. 42.

Eine weitere Beobachtung ist der Schnitt mit der y-Achse in den Diagrammen für *wax2*, *cer3* und *yre*. Bei allen drei Mutanten wird diese bei einem hohen Wert ( $y \sim 1000 \text{ dpm}$  pro Blattscheibe) geschnitten.

### Wachsbelegung der wax2-Mutante

Die Wachsbelegung der Blätter der wax2-Mutante war im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert (Abb. 3.13.B und C, Tab. Anhang 8.2.1.). Die Gesamtwachsbelegung betrug für den Wildtyp Col-8  $0,65 \pm 0,08 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  und für die Mutante wax2  $0,14 \pm 0,03 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Die Mutante hatte nur 21 % der Wachsbelegung des Wildtypen (*t-test*, mit einer Wahrscheinlichkeit von >99 % signifikant unterschiedlich vom Wildtyp;  $p < 0,01$ ). Die zwei Hauptkomponenten der Wachszusammensetzung beim Wildtyp waren der C<sub>32</sub>-Alkohol und das C<sub>31</sub>-Alkan, in der Mutante waren diese beiden Substanzen kaum oder gar nicht vorhanden. Die Hauptbestandteile der Wachszusammensetzung in der Mutante waren die C<sub>26</sub>-Säure und der C<sub>28</sub>-Alkohol (Abb. 3.13.B), deren absoluten Mengen aber die entsprechenden Mengen beim Wildtyp unterschritten.

Bei Betrachtung der einzelnen Substanzklassen (Abb. 3.13.C) fiel auf, dass die größte Reduktion bei den Aldehyden ( $0,127 \pm 0,021 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  im Wildtyp) und Alkanen ( $0,170 \pm 0,013 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  im Wildtyp) stattfand, bei denen die absoluten Werte auf  $0 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  fielen und die somit um 100% im Vergleich zum Wildtyp reduziert sind (*t-test*:  $p < 0,01$ ). Die Menge der Säuren fiel bei wax2 um 25 % (von  $0,108 \pm 0,017 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  in Col-8 auf  $0,082 \pm 0,024 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; *t-test*: mit einer Wahrscheinlichkeit von >95 % signifikant unterschiedlich vom Wildtyp;  $p < 0,05$ ). Die Alkohole waren um 78 % (von  $0,240 \pm 0,030 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  in Col-8 auf  $0,054 \pm 0,006 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , *t-test*:  $p < 0,01$ ) reduziert.

### Kutinanalyse der wax2-Mutante

Für Kutinanalysen gibt es zwei Bezugsgrößen, die häufig genutzt werden, dies ist zum einen die Fläche und zum anderen das Trockengewicht der totalextrahierten Blätter. In dieser Arbeit wurden die Werte für beide Bezugsgrößen bestimmt. Da die Permeabilität und die Wachsbelegung auch in Bezug zur Oberfläche gesetzt werden, wird in der Darstellung auch die Bezugsgröße Fläche gewählt. Trockengewicht ist keine unproblematische Bezugsgröße, da in diesem Fall eine unterschiedliche Dicke der Blätter zwischen Wildtyp und Mutante bereits zu einer Veränderung in der Kutinmenge führen würde, die im Bezug zur Fläche nicht gemessen würde. Das Gewicht wurde in dieser Arbeit bestimmt, um mit Veröffentlichungen vergleichen zu können, die dieses als Bezugsgröße gewählt haben.

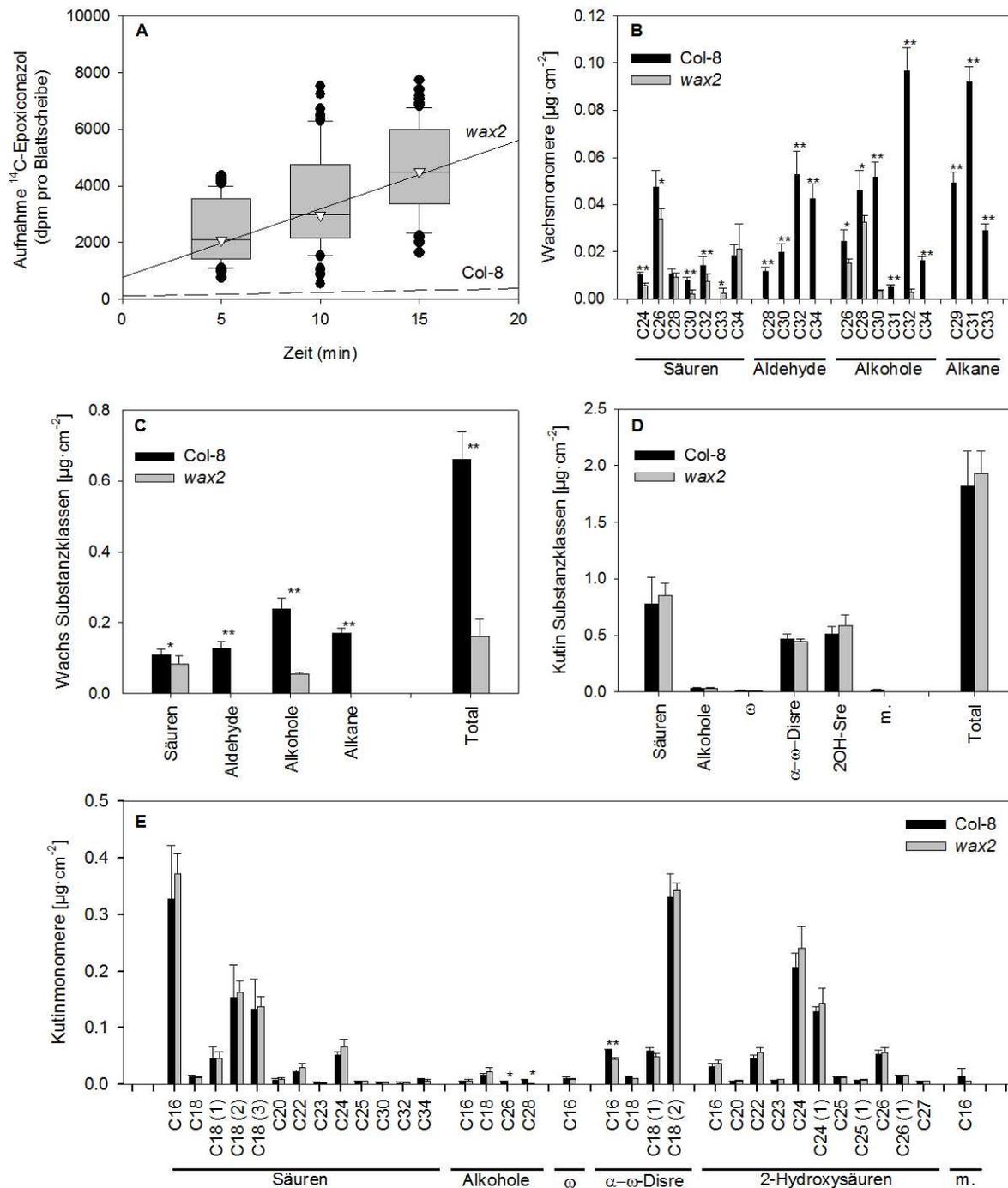


Abb. 3.13. Permeation von  $^{14}\text{C}$ -Epoixiconazol und Wachs- und Kutinzusammensetzung für *wax2*. (A) Permeation von  $^{14}\text{C}$ -Epoixiconazol für *wax2* im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Col-8; Aufnahmekinetik von  $^{14}\text{C}$ -Epoixiconazol (dpm) pro Blattscheibe als Funktion der Zeit (min); (B) und (C) Wachsbelegung ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) der Blätter von *wax2*, Absolute Verteilung der einzelnen Substanzen im Vergleich zum Wildtyp Col-8 (B) und der Substanzklassen und die Gesamtmenge Wachs für *wax2* (C) ( $n = 5$ ; MW  $\pm$  Sa); (D) und (E) Kutinzusammensetzung ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) von *wax2*, Absolute Verteilung der einzelnen Substanzen im Vergleich zum Wildtyp Col-8 (E) und der Substanzklassen und die Gesamtmenge Kutin für *wax2* (D) ( $n = 3$ ; MW  $\pm$  Sa) mit  $\omega = \omega$ -Hydroxysäure,  $\alpha$ - $\omega$ -Disre =  $\alpha$ - $\omega$ -Disäure, 2OH-Sre = 2-Hydroxysäure, m. = C<sub>16-9/10-16</sub>-Dihydroxysäure (*midchain*); \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (*t-test*)

Zusätzlich muss beachtet werden, dass die hier aufgeführte  $C_{16-9/10-16}$ -Dihydroxysäure mit der  $C_{18-(1)}-\omega$ -Hydroxysäure bei der Auftrennung im Gaschromatographen koeluiert. Die  $C_{18-(1)}-\omega$ -Hydroxysäure kommt allerdings nur in sehr kleiner Menge vor, so dass die  $C_{16-9/10-16}$ -Dihydroxysäure den Hauptteil dieses Peaks ausmacht. Dieser Peak wurde nur als  $C_{16-9/10-16}$ -Dihydroxysäure bezeichnet.

Die Hauptkomponenten bei Wildtyp und Mutante sind neben der  $C_{16}$ -Säure die  $C_{18-(2)}$ -Disäure und die  $C_{24-2}$ -Hydroxysäure (Abb. 3.13.E). Die Gesamtkutinmenge betrug für den Wildtyp Col-8  $1,82 \pm 0,31 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  und für *wax2*  $1,93 \pm 0,20 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  (Abb. 3.13.D; Tab. Anhang 8.2.2.). Diese Werte waren nicht signifikant unterschiedlich (*t-test*). Die einzelnen Substanzklassen zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Signifikant war nur die Reduktion der Monomere  $C_{16}$ - $\alpha$ - $\omega$ -Disäure ( $p < 0,01$ ) und der Alkohole mit der Kettenlänge  $C_{26}$  und  $C_{28}$  (beide  $p < 0,05$ ).

Ein ähnliches, aber nicht komplett gleiches Bild zeigte sich bei der Betrachtung der Kutinmenge bezogen auf das Gewicht (Menge Substanz ( $\mu\text{g}$ ) bezogen auf mg Trockengewicht der totalextrahierten Blätter ( $\text{mg}_{\text{tg}}$ )). Die Gesamtkutinmenge betrug für den Wildtyp Col-8  $3,29 \pm 0,22 \mu\text{g}\cdot\text{mg}_{\text{tg}}^{-1}$  und für *wax2*  $3,04 \pm 0,21 \mu\text{g}\cdot\text{mg}_{\text{tg}}^{-1}$  und zeigte somit auch hier keine signifikante Änderung in der Menge. Die zwei Alkohole, die auch schon in der Analyse bezogen auf die Fläche aufgefallen sind, zeigten auch hier eine signifikante Änderung ( $C_{26}$  mit  $p < 0,05$  und  $C_{28}$  mit  $p < 0,01$ ).

In der Betrachtung der Substanzklassen fiel auf, dass sich eine signifikante Änderung bei den  $\alpha$ - $\omega$ -Disäuren abspielt. Hier fand eine Reduktion um 16 % (*t-test*,  $p < 0,05$ ) statt. Die einzelnen  $\alpha$ - $\omega$ -Disäuren waren unterschiedlich stark betroffen, wobei die  $C_{16}$ - und  $C_{18}$ - $\alpha$ - $\omega$ -Disäure beide mit einem Verlust von 36 % am stärksten betroffen waren ( $C_{16}$ - $\alpha$ - $\omega$ -Disäure mit  $p < 0,05$  (*t-test*);  $C_{18}$ - $\alpha$ - $\omega$ -Disäure mit  $p < 0,01$  (*t-test*)). Die  $C_{18-(1)}$ - $\alpha$ - $\omega$ -Disäure wurde um 29 % reduziert (*t-test*,  $p < 0,05$ ) und die  $C_{18-(2)}$ - $\alpha$ - $\omega$ -Disäure um 10 % (*t-test*,  $p < 0,05$ ). Trotz der signifikanten Änderungen wirkte sich dies nicht auf die Gesamtkutinmenge aus.

#### Wachsbelegung *cer3* und *yre*

Die Wachsbelegung von *cer3* und *yre*-Blättern war im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert (Abb. 3.14.C - F; Tabelle Anhang 8.2.3. und 8.2.4.). Hier wurde deutlich, dass die absoluten Mengen in jeder Analyse durch die erneute Anzucht variieren können und dass es immer auf den Vergleich zum Wildtyp ankommt. So lag hier die

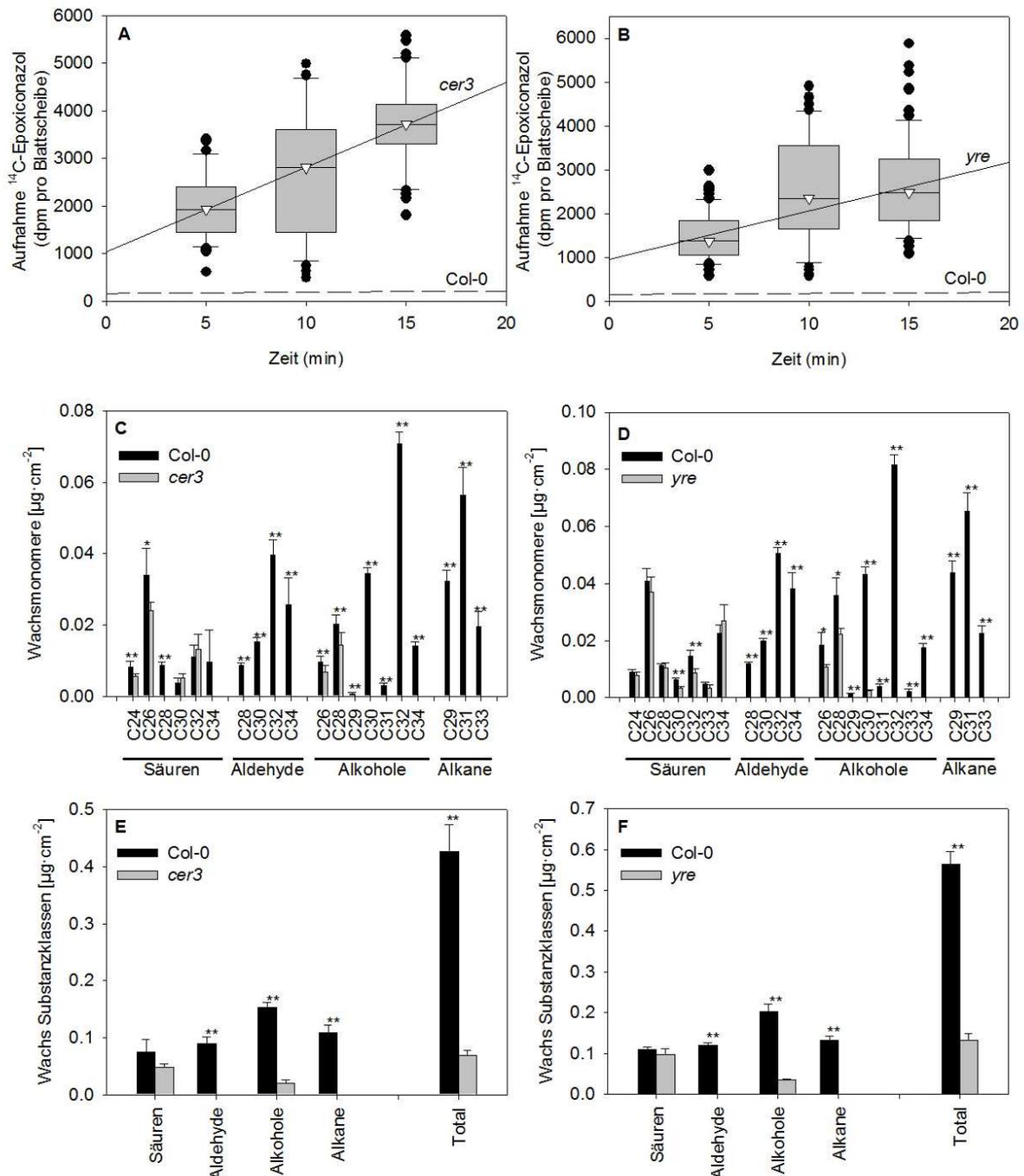


Abb. 3.14. Permeation von  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol und Wachsbelegung der Blätter von *cer3* und *yre*. Permeation von  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol für *cer3* (A) und *yre* (B) im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Col-0; Aufnahmekinetik von  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol (dpm) pro Blattscheibe als Funktion der Zeit (min); Wachsbelegung der Blätter von *cer3* und *yre* ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) (C) - (F). Absolute Verteilung der einzelnen Substanzen für *cer3* (C) und *yre* (D) im Vergleich zum Wildtyp Col-0 und der Substanzklassen und die Gesamtmenge Wachs für *cer3* (E) und *yre* (F) (n = 5; MW  $\pm$  Sa); \* p < 0,05; \*\*p < 0,01 (t-test)

absolute Menge Wachs beim Wildtyp Col-0 bei der *cer3*-Analyse (Abb. 3.14.C und E) bei  $0,43 \pm 0,05 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  und bei der *yre*-Analyse (Abb. 3.14.D und F) bei  $0,56 \pm 0,03 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Die absolute Wachsmenge für *cer3* betrug  $0,07 \pm 0,01 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  und für *yre*  $0,13 \pm 0,02 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Hier hatte eine starke Reduktion des Wachsgehaltes stattgefunden, so dass *cer3* nur noch auf 16 % und *yre* auf 23 % der Menge vom Wildtyp-Wachs kam (Vergleichswert *wax2* ist 21 %).

Bei der Betrachtung der einzelnen Substanzklassen zeigte sich diese Reduktion zwar auch leicht in den Säuren (allerdings nicht signifikant), aber ganz besonders in den Aldehyden, Alkoholen und Alkanen, die sowohl in *cer3* als auch in *yre* eine signifikante Reduktion zeigten (*t-test*,  $p < 0,01$ ). Aldehyde ( $0,089 \pm 0,013 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  bzw.  $0,120 \pm 0,007 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  in den Wildtypen) und Alkane ( $0,108 \pm 0,014 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  bzw.  $0,132 \pm 0,012 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  in den Wildtypen) wurden sowohl bei *cer3* als auch bei *yre* um 100 % im Vergleich zum Wildtyp reduziert, die absoluten Werte betragen  $0 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Bei den Säuren kam es zu einer Reduktion um 13 % bei *yre* (von  $0,109 \pm 0,006 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  auf  $0,096 \pm 0,015 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) und um 36 % bei *cer3* (von  $0,075 \pm 0,022 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  im Wildtyp auf  $0,048 \pm 0,007 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ), bei den Alkoholen um 83 % bei *yre* (von  $0,203 \pm 0,018 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  auf  $0,036 \pm 0,003 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) und um 86 % bei *cer3* (von  $0,153 \pm 0,010 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  auf  $0,021 \pm 0,005 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ).

### 3.3.3. Permeabilität, Wachs- und Kutinzusammensetzung von *cer5*

Die Mutante *cer5* besitzt einen Defekt in dem Gen für einen ABC-Transporter, der in der Plasmamembran lokalisiert ist und für den Export von Wachs zur Kutikula benötigt wird (Pighin *et al.*, 2004).

#### Bestätigung des *knockout* für *cer5*

Nach erfolgreicher Genotypisierung wurde durch eine RT-PCR die Abwesenheit des *CER5*-Transkripts in der Mutante *cer5-2* (SALK\_036776) gezeigt (Abb. 3.15.).

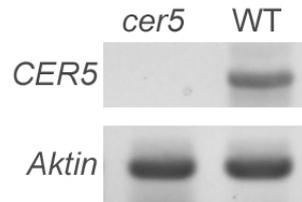


Abb. 3.15. **RT-PCR *cer5*** Agarosegelelektrophoresebild der RT-PCR zur Bestätigung des *knockout* von *CER5* in Blättern der *cer5*-Mutante im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Col-8. Die RNA wurde aus einem Blatt von 25 Tage alten Pflanzen extrahiert und es wurden 50 ng für eine Reaktion eingesetzt. Als Kontrolle wurde das konstitutiv exprimierte Gen *Aktin* amplifiziert.

### Permeabilität *cer5*

Die Regressionsgerade der Aufnahmekinetik zeigte eine positive Steigung und eine Linearität von  $r^2 = 0,95$  für *cer5* (Abb. 3.16.A). Der Leitwert betrug von  $4,29 \cdot 10^{-8} \pm 2,12 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  (erstellt mit 174 Blattscheiben). Die Steigung der Regressionsgerade unterschied sich kaum von der Steigung der Regressionsgerade des korrespondierenden Wildtypen Col-8, was sich auch in einem sehr ähnlichen Leitwert zeigte. Dieser unterschied sich nur um den Faktor 1,5 von dem Leitwert von Col-8 (3.3.1.). Dieser Unterschied war trotz allem signifikant (*Mann-Whitney U-Test*;  $p < 0,001$ ).

### Wachsanalytik *cer5*

Die Wachsbelegung der *cer5*-Blätter war im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert (Abb. 3.16.B und C; Tab. Anhang 8.2.5.). Der Wildtyp Col-8 besaß in dieser Analyse eine absolute Wachsmenge von  $0,24 \pm 0,04 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  und die Mutante *cer5*  $0,13 \pm 0,01 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ . In der Mutante fand eine signifikante Reduktion der Gesamtwachsmenge um 46 % statt (*t-test*,  $p < 0,05$ ).

Bei Betrachtung der einzelnen Substanzklassen (Abb 3.16.B) fiel auf, dass in dieser Mutante keine signifikante Änderung der Alkane stattfand (wie es bei *wax2* der Fall war), sondern der absolute Gehalt auf gleichem Niveau blieb (im Vergleich zum WT 105%; Col-8  $0,077 \pm 0,010 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ; *cer5*  $0,075 \pm 0,006 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ). Die Aldehyde waren um 61% reduziert, was allerdings statistisch nicht gestützt werden konnte (Col-8  $0,023 \pm 0,014 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ; *cer5*  $0,008 \pm 0,002 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ). Die großen und signifikanten Änderungen fanden bei den Säuren und den Alkoholen statt. In der Mutante *cer5* fand eine Reduktion um 72% bei den Säuren (*t-test*,  $p < 0,05$ ; Col-8

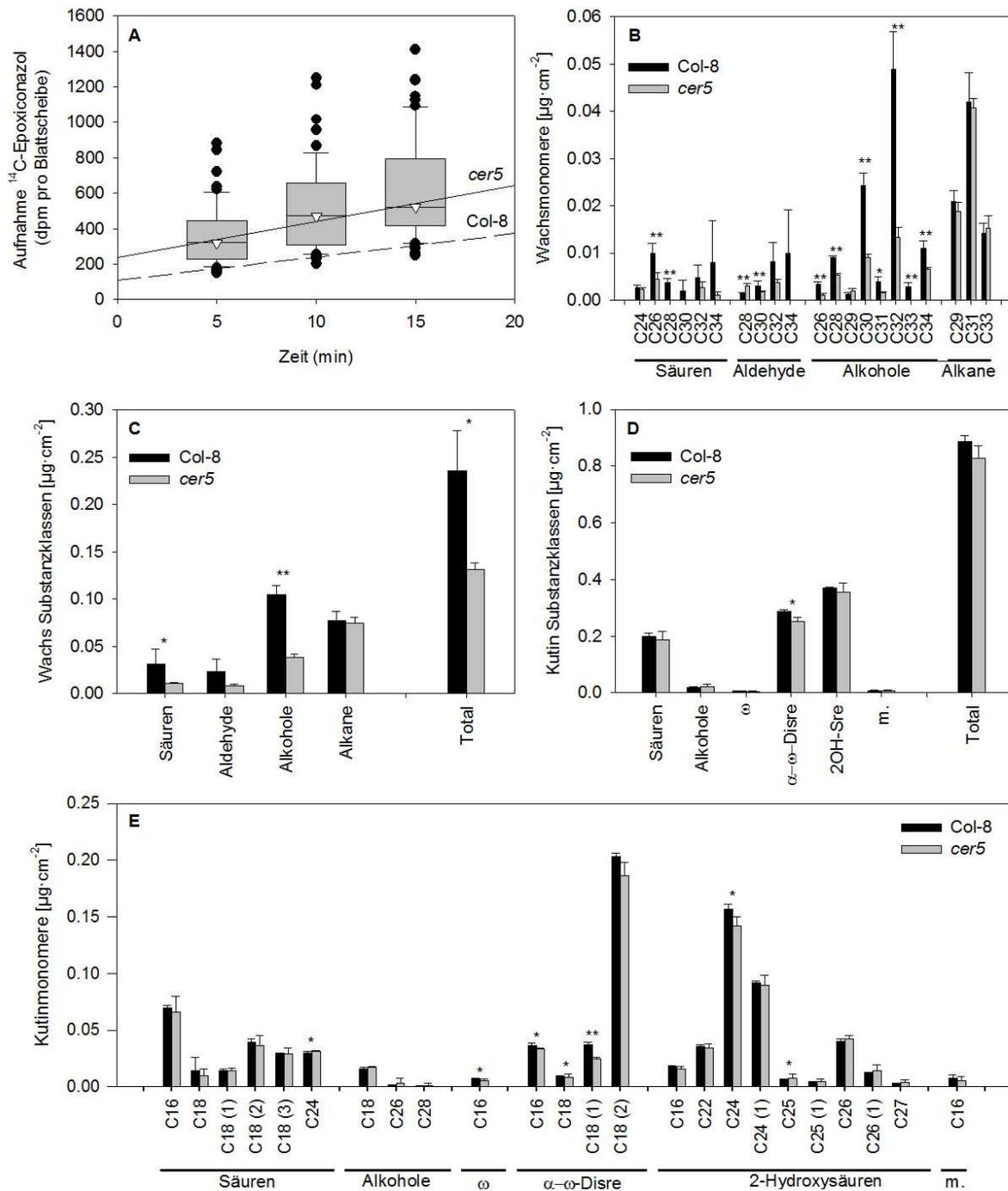


Abb. 3.16. **Permeation von  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol und Wachs- und Kutinzusammensetzung für *cer5*.** (A) Permeation von  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol für *cer5* im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Col-8; Aufnahmekinetik von  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol (dpm) pro Blattscheibe als Funktion der Zeit (min); (B) und (C) Wachsbelegung ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) der Blätter von *cer5*, Absolute Verteilung der einzelnen Substanzen im Vergleich zum Wildtyp Col-8 (B) und der Substanzklassen und die Gesamtmenge Wachs für *cer5* (C) ( $n = 5$ ; MW  $\pm$  Sa); (D) und (E) Kutinzusammensetzung ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) von *cer5*, Absolute Verteilung der einzelnen Substanzen im Vergleich zum Wildtyp Col-8 (E) und der Substanzklassen und die Gesamtmenge Kutin für *cer5* (D) ( $n = 3$ ; MW  $\pm$  Sa) mit  $\omega$  =  $\omega$ -Hydroxysäure,  $\alpha$ - $\omega$ -Disre =  $\alpha$ - $\omega$ -Disäure, 2OH-Sre = 2-Hydroxysäure, m. =  $\text{C}_{16-9/10-16}$ -Dihydroxysäure (*midchain*); \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (*t-test*)

0,031 ± 0,016 µg·cm<sup>-2</sup>, Sa; *cer5* 0,010 ± 0,001 µg·cm<sup>-2</sup>) und um 59% bei den Alkoholen (*t-test*,  $p < 0,01$ ; Col-8 0,105 ± 0,010 µg·cm<sup>-2</sup>; *cer5* 0,038 ± 0,003 µg·cm<sup>-2</sup>) statt.

#### Kutinanalyse von *cer5*

Die Kutinmenge von *cer5* war nicht signifikant unterschiedlich von der Kutinmenge des korrespondierenden Wildtyp Col-8 (Abb. 3.16.D und E; Tab. Anhang 8.2.6.). Die Gesamtkutinmenge von Col-8 betrug 0,89 ± 0,02 µg·cm<sup>-2</sup> und die von *cer5* betrug 0,83 ± 0,04 µg·cm<sup>-2</sup>.

Auch bei Betrachtung der Substanzklassen fielen keine größeren Änderungen zwischen Wildtyp und Mutante auf. Säuren, Alkohole, ω-Hydroxysäuren, 2-Hydroxysäuren und die C<sub>16-9/10-16</sub>-Dihydroxysäure sind alle nicht signifikant unterschiedlich zwischen Wildtyp und Mutante. Der einzige signifikante Unterschied (*t-test*,  $p < 0,05$ ) war bei den α-ω-Disäuren (0,286 ± 0,007 µg·cm<sup>-2</sup> in Col-8, 0,252 ± 0,015 µg·cm<sup>-2</sup> in *cer5*) zu erkennen, die in der Mutante um 12 % reduziert wurden. Dieser Effekt war so minimal, dass er sich nicht in der Gesamtkutinmenge widerspiegelte.

Ein sehr ähnliches Bild zeigte sich auch in der Kutinzusammensetzung in Bezug auf das Trockengewicht der totalextrahierten Blätter (Tab. Anhang 8.2.6.). Die einzige signifikante Änderung erschien in der Menge der α-ω-Disäuren. Auch in Bezug auf das Trockengewicht wirkte sich dies nicht auf den Gesamtkutingehalt aus.

#### **3.3.4. Permeabilität, Wachs- und Kutinzusammensetzung von *cut1***

Um den Einfluss der mittleren Kettenlänge zu bestimmen bietet sich die Untersuchung einer Kettenlängen-Mutante an. Die Elongase CUT1 ist dafür bekannt wachsspezifisch C<sub>24</sub>-Säuren zu verlängern (Millar *et al.*, 1999).

#### Bestätigung des *knockout* für *cut1*

Für die verwendete Mutante (SM\_3\_42068) wurde nach erfolgreicher Genotypisierung durch eine RT-PCR die Abwesenheit des *CUT1*-Transkripts gezeigt (Abb. 3.17.).

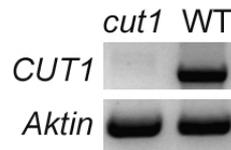


Abb. 3.17. **RT-PCR *cut1*** Agarosegelelektrophorese der RT-PCR zur Bestätigung des *knockout* von *CUT1* in Blättern der *cut1*-Mutante. Die RNA wurde aus einem Blatt von 25 Tage alten Pflanzen extrahiert und es wurden 100 ng für eine Reaktion eingesetzt. Das konstitutiv exprimierte Gen *Aktin* wurde als Kontrolle genutzt.

### Permeabilität *cut1*

Die Aufnahmekinetik von  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol pro Blattscheibe als Funktion der Zeit ergab eine positive Steigung und eine hohe Linearität für *cut1* ( $r^2 = 0,99$ ) (Abb. 3.18.A). Der ermittelte Leitwert  $7,59 \cdot 10^{-7} \pm 1,10 \cdot 10^{-7} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  (erstellt mit 123 Blattscheiben) war um den Faktor 27 höher als der Leitwert vom korrespondierenden Wildtyp Col-8 (3.3.1.). Bei dieser Mutante konnte eine neue Beobachtung gemacht werden. In dem Diagramm zeigte der Graph einen Schnittpunkt mit der y-Achse im negativen Bereich. Dies deutete darauf hin, dass es hier zunächst zu einer sogenannten Anlaufphase kam, bevor die Aufnahme über die Kutikula vonstatten geht. Dies konnte auch bei den *H. helix* Co-Permeationsexperimenten beobachtet werden (Abb. 3.8.A).

### Wachsbelegung *cut1*

Die Mutante *cut1* wies im Vergleich mit ihrem korrespondierenden Wildtyp weniger Wachs auf den Blättern auf (Abb. 3.18.B und C und Tab. Anhang 8.2.7.). Der Wildtyp Col-8 verfügte in dieser Analyse über  $0,34 \pm 0,05 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  und die Mutante über  $0,16 \pm 0,03 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  Wachs. Dies erwies sich als eine signifikante Reduktion um 52 % (*t-test*,  $p < 0,01$ ).

Bei Betrachtung der einzelnen Substanzklassen konnte erfasst werden, dass außer bei den Säuren, deren Menge sich nicht signifikant vom Wildtyp unterschied (116 % der Wildtypmenge, von  $0,028 \pm 0,011 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  auf  $0,033 \pm 0,003 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in der Mutante), alle Substanzklassen stark reduziert waren. Dies galt besonders für die Aldehyde, deren Menge um 87 % heruntersetzt war (von  $0,046 \pm 0,013 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  auf  $0,006 \pm 0,001 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ; *t-test*,  $p < 0,01$ ). Aber auch die Alkohole (um 49 %; von  $0,151 \pm 0,022 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  auf  $0,077 \pm 0,016 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ; *t-test*,  $p < 0,01$ ) und die Alkane (um

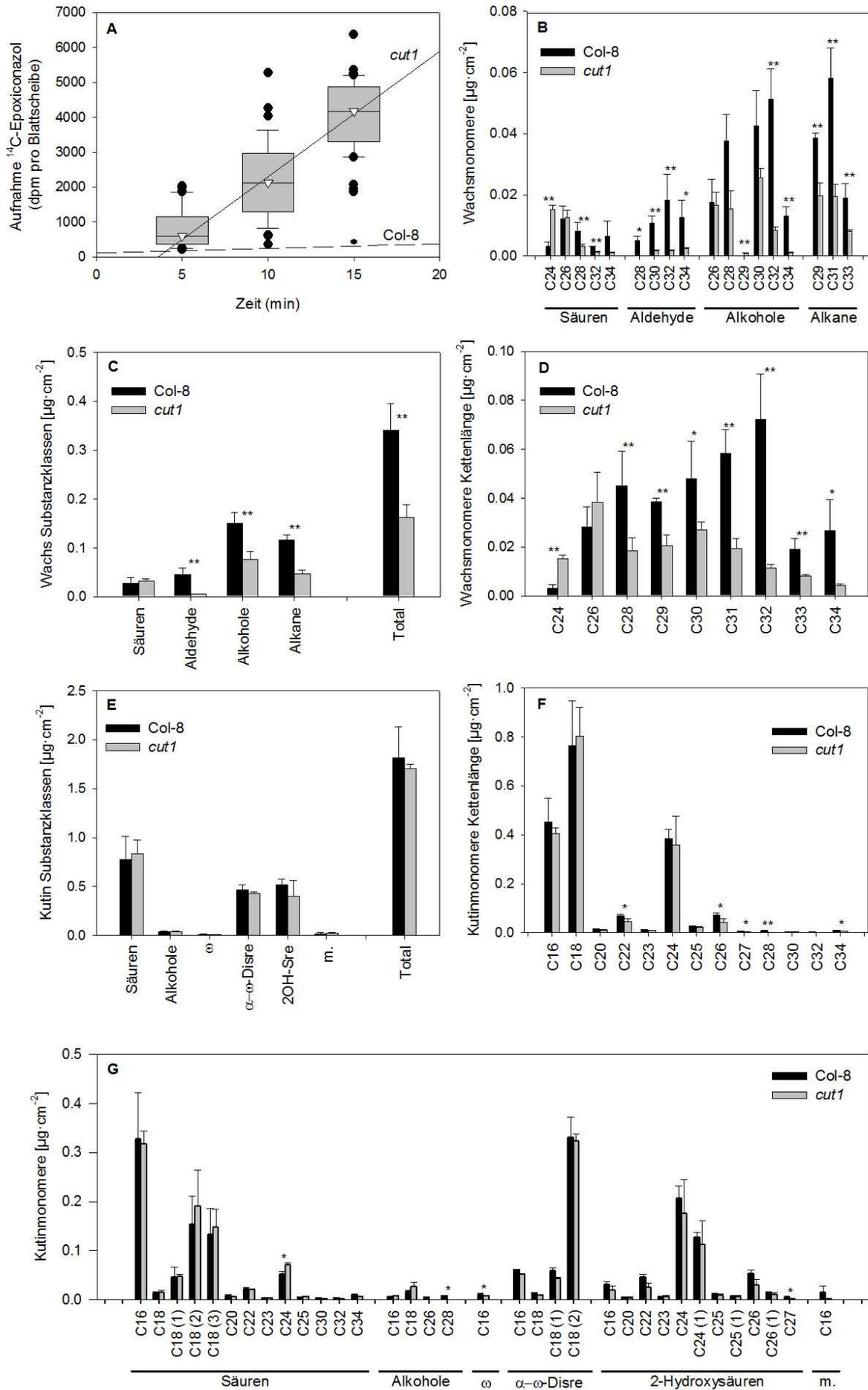


Abb. 3.18. **Permeation von  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol und Wachs- und Kutinzusammensetzung für *cut1*.** (A) Permeation von  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol für *cut1* im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Col-8; Aufnahmekinetik von  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol (dpm) pro Blattscheibe als Funktion der Zeit (min); (B), (C) und (D) Wachsbelegung ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) von *cut1*, Absolute Verteilung der einzelnen Substanzen im Vergleich zum Wildtyp Col-8 (B), der Substanzklassen und die Gesamtmenge Wachs für *cut1* (C) und die Kettenlängenverteilung (D) ( $n = 5$ ;  $\text{MW} \pm \text{Sa}$ ); (E), (F) und (G) Kutinzusammensetzung ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) von *cut1*, Absolute Verteilung der einzelnen Substanzen im Vergleich zum Wildtyp Columbia-8 (G) und der Substanzklassen und die Gesamtmenge Kutin für *cut1* (E) und die Kettenlängenverteilung (F) ( $n = 3$ ;  $\text{MW} \pm \text{Sa}$ ) mit  $\omega = \omega$ -Hydroxysäure,  $\alpha\text{-}\omega$ -Disre =  $\alpha\text{-}\omega$ -Disäure, 2OH-Sre = 2-Hydroxysäure, m. =  $\text{C}_{16-9/10-16}$ -Dihydroxysäure (*midchain*) und die Kettenlängenverteilung in (F); \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (*t-test*)

59 %; von  $0,116 \pm 0,011 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  auf  $0,047 \pm 0,006 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; *t-test*,  $p < 0,01$ ) wiesen eine Reduktion auf.

Bei der Betrachtung der Kettenlängenverteilung der Mutante *cut1* im Vergleich zum Wildtyp erwies sich ein Anstieg der  $\text{C}_{24}$ -Bestandteilen auf 487% im Vergleich zur Wildtypmenge (von  $0,0031 \pm 0,0015 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  im WT auf  $0,0151 \pm 0,0015 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  in *cut1*) als signifikant (*t-test*,  $p < 0,01$ ). Die Menge der  $\text{C}_{26}$ -Bestandteile war ebenfalls leicht erhöht auf 135 % (von  $0,0283 \pm 0,0083 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  auf  $0,0382 \pm 0,0124 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; dieser Unterschied war statistisch knapp nicht gestützt; *t-test*,  $p = 0,06$ ). Die Bestandteile  $\text{C}_{28}$ - $\text{C}_{34}$  nahmen alle deutlich ab (siehe Tab. 3.3.).

### Kutinanalyse von *cut1*

In dieser Analyse wurde erneut als Bezugsgröße sowohl die Fläche der extrahierten Blätter als auch das Trockengewicht der Probe bedacht. Die Hauptsubstanzen waren neben der  $\text{C}_{16}$ -Säure die  $\text{C}_{18(2)}\text{-}\alpha\text{-}\omega$ -Disäure und die  $\text{C}_{24}$ -2-Hydroxysäure. Die Darstellung in Abb. 3.18.E, F und G zeigt die Analyse von Kutin in Bezug auf die Fläche. Die Gesamtkutinmenge betrug für den Wildtyp Col-8  $1,82 \pm 0,31 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  und für *cut1*  $1,70 \pm 0,05 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  (Abb. 3.18.E und Tab. Anhang 8.2.8.). Diese zwei Werte waren nicht signifikant unterschiedlich (*t-test*). Auch bei den einzelnen Substanzklassen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Wie auch schon bei *wax2* konnte auch hier in der Betrachtung der Substanzklassen bezogen auf das Trockengewicht eine signifikante Änderung (*t-test*,  $p < 0,05$ ) bei den  $\alpha\text{-}\omega$ -Disäuren erkannt werden. Hier stellte sich eine Reduktion von 15 % ( $0,84 \pm 0,01 \mu\text{g}\cdot\text{mg}_{\text{tg}}^{-1}$  im Wildtyp auf  $0,72 \pm 0,04 \mu\text{g}\cdot\text{mg}_{\text{tg}}^{-1}$  in *cut1*) dar. Die einzelnen

$\alpha$ - $\omega$ -Disäuren waren unterschiedlich stark betroffen. Während die C<sub>16</sub>- $\alpha$ - $\omega$ -Disäure um 29 % reduziert wurde, wurde die C<sub>18</sub>- $\alpha$ - $\omega$ -Disäure mit einer Reduktion um 37 % am stärksten betroffen (*t-test*,  $p < 0,01$ ). Die C<sub>18(1)</sub>- $\alpha$ - $\omega$ -Disäure wurde um 33 % reduziert (*t-test*,  $p < 0,05$ ). Die Reduktion der C<sub>18(2)</sub>- $\alpha$ - $\omega$ -Disäure um 10 % konnte statistisch nicht gestützt werden.

Wie auch schon beim Wachs wurde hier auch eine Betrachtung der Kettenlängenverteilung vorgenommen (Abb. 3.18.F), in der allerdings keine deutlichen Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante erkannt werden konnten. Zwar gibt es eine signifikante Änderung bei C<sub>22</sub>, C<sub>26</sub>, C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub> und C<sub>34</sub> zu erkennen, allerdings ist hier bei allen nur eine leichte Reduktion zu erkennen, die sich nicht auf die Gesamtkutinmenge auswirkt.

Tab. 3.3. **Kettenlängenverteilung im Blattwachs der *cut1*-Mutante im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Col-8.** Es wird die Menge der vorkommenden Monomere ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) pro Kettenlänge C<sub>24</sub> - C<sub>34</sub> angegeben ( $n = 5$ ; MW  $\pm$  Sa). Die Prozentangaben beziehen sich auf die jeweilige Kettenlänge des Wildtypen (100 %). Das Signifikanzniveau wird als p-Wert angegeben, wobei nur die Kettenlänge C<sub>26</sub> keine signifikante Änderung zeigt.

| Kettenlänge | Wildtyp<br>[ $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ] | <i>cut1</i><br>[ $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ] | Vergleich mit Wildtyp<br>[%] | Signifikanz-<br>niveau (p) |
|-------------|---|---|------------------------------|----------------------------|
| C24         | 0,003 $\pm$ 0,002                               | 0,015 $\pm$ 0,002                                   | 487                          | $p < 0,01$                 |
| C26         | 0,028 $\pm$ 0,008                               | 0,038 $\pm$ 0,012                                   | 135                          | $p = 0,06$                 |
| C28         | 0,045 $\pm$ 0,014                               | 0,018 $\pm$ 0,005                                   | 41                           | $p < 0,01$                 |
| C29         | 0,039 $\pm$ 0,002                               | 0,020 $\pm$ 0,004                                   | 53                           | $p < 0,01$                 |
| C30         | 0,048 $\pm$ 0,015                               | 0,027 $\pm$ 0,003                                   | 57                           | $p < 0,05$                 |
| C31         | 0,058 $\pm$ 0,010                               | 0,019 $\pm$ 0,004                                   | 33                           | $p < 0,01$                 |
| C32         | 0,072 $\pm$ 0,018                               | 0,011 $\pm$ 0,002                                   | 16                           | $p < 0,01$                 |
| C33         | 0,019 $\pm$ 0,005                               | 0,008 $\pm$ 0,001                                   | 42                           | $p < 0,01$                 |
| C34         | 0,027 $\pm$ 0,013                               | 0,004 $\pm$ 0,001                                   | 16                           | $p < 0,05$                 |

### 3.3.5. Permeabilität, Wachs- und Kutinzusammensetzung von *cer10*

*cer10* besitzt einen Defekt in einem Gen, das für eine Enoyl-CoA-Reduktase (ECR) kodiert. Ein Defekt in diesem Gen führt zu einer starken Reduktion der Wachskomponenten in der Sprossachse um 60% (Zheng *et al.*, 2005).

#### Permeabilität *cer10*

Im durchgeführten Permeationsassay wurde *cer10* zusammen mit dem korrespondierenden Wildtyp Ler untersucht. Die Aufnahmekinetik für *cer10* zeigte eine positive Steigung mit einer hohen Linearität ( $r^2 = 0,98$ ) (Abb. 3.19.A). Der errechnete Leitwert für *cer10* lag bei  $1,48 \cdot 10^{-7} \pm 3,33 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  (erstellt mit 155 Blattscheiben). Dieser unterschied sich nur um den Faktor 1,2 vom Leitwert des korrespondierenden Wildtypen Ler (3.3.1.). Dieser Unterschied war signifikant (*Mann-Whitney U-Test*;  $p < 0,01$ ).

#### Wachsanalyse *cer10*

Die Wachsbelegung der Blätter war in der Mutante *cer10* im Vergleich zum Wildtyp erniedrigt (Abb. 3.19.B und C; Tab. Anhang 8.2.9.). Die Wachsmenge in *cer10* war um 26 % im Vergleich zum Wildtyp reduziert (von  $0,59 \pm 0,06 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  im Wildtyp auf  $0,46 \pm 0,02 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ; *t-test*,  $p < 0,05$ ). Die Säuren waren um 34 % reduziert, was nicht statistisch gestützt werden konnte (von  $0,094 \pm 0,013 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in Ler auf  $0,062 \pm 0,002 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in *cer10*). Die Aldehyde waren um 19 % (von  $0,104 \pm 0,012 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in Ler auf  $0,084 \pm 0,014 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in *cer10*; *t-test*,  $p < 0,05$ ) und die Alkohole um 33 % (von  $0,201 \pm 0,008 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in Ler auf  $0,134 \pm 0,009 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in *cer10*; *t-test*,  $p < 0,01$ ) reduziert. Die Verringerung der Alkane um 8 % (von  $0,195 \pm 0,040 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in Ler auf  $0,179 \pm 0,022 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in *cer10*) war statistisch nicht gestützt.

#### Kutinanalyse *cer10*

Die Gesamtkutinmenge betrug für Ler  $5,02 \pm 0,91 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  und für *cer10*  $4,33 \pm 0,96 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  (Abb.3.19.E und F, Tab. Anhang 8.2.10.). Diese Werte waren statistisch nicht voneinander verschieden (*t-test*). Die Menge der Säuren sank signifikant um 19 % in der Mutante, von  $3,49 \pm 0,637 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  im Wildtyp auf  $2,828 \pm 0,758 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$

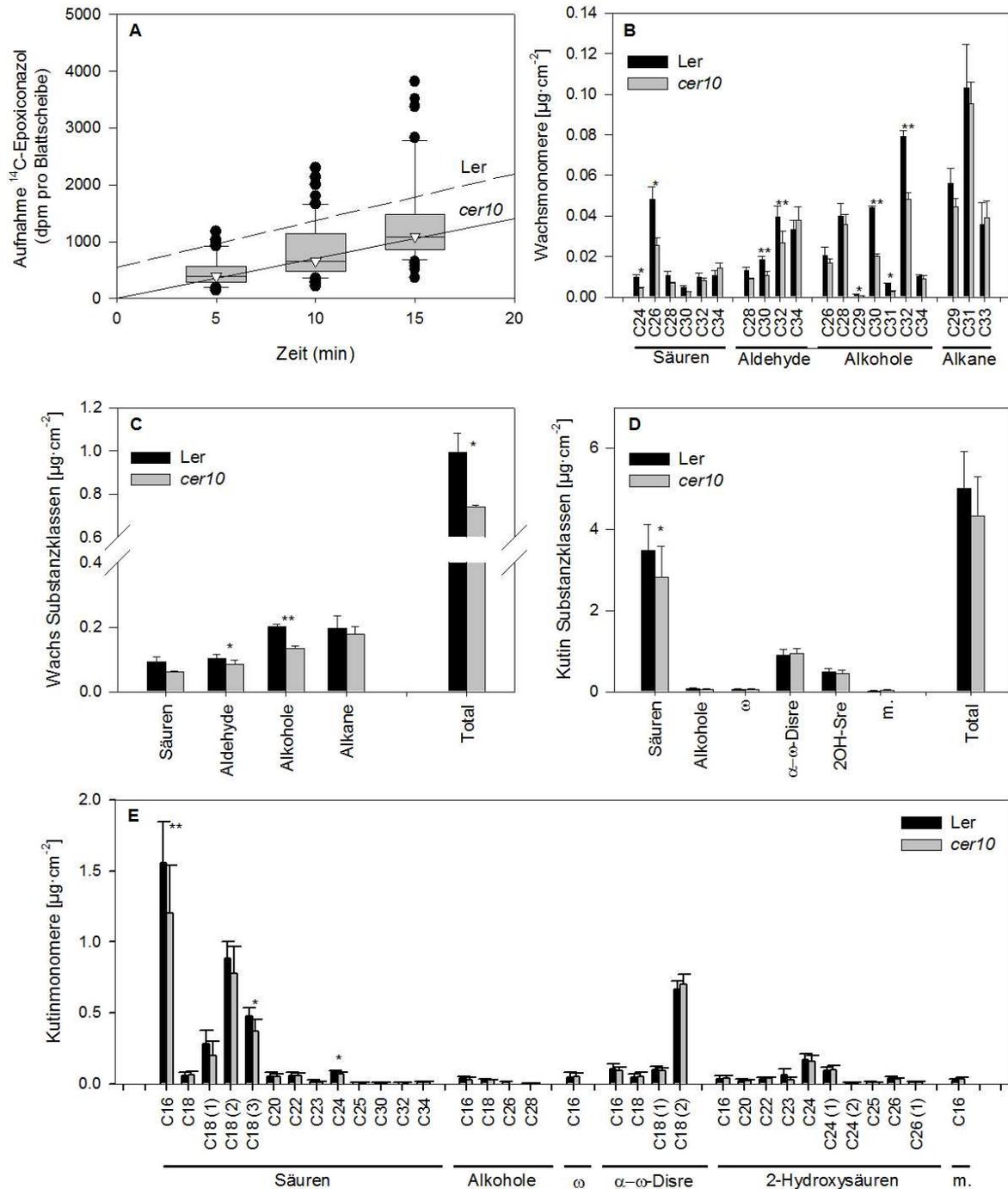


Abb. 3.19. Permeation von  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol und Wachs- und Kutinzusammensetzung für *cer10* (A) Permeation von  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol für *cer10* im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Ler; Aufnahmekinetik von  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol (dpm) pro Blattscheibe als Funktion der Zeit (min); (B) und (C) Wachsbelegung ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) von *cer10*, Absolute Verteilung der einzelnen Substanzen im Vergleich zum Wildtyp Ler (B) und der Substanzklassen und die Gesamtmenge Wachs für *cer10* (C) ( $n=5$ ;  $\text{MW} \pm \text{Sa}$ ); (D) und (E) Kutinzusammensetzung ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) von *cer10*, Absolute Verteilung der einzelnen Substanzen im Vergleich zum Wildtyp Columbia-8 (E) und der Substanzklassen und die Gesamtmenge Kutin für *cer10* (D) ( $n=3$ ;  $\text{MW} \pm \text{Sa}$ ) mit  $\omega$  =  $\omega$ -Hydroxysäure,  $\alpha$ - $\omega$ -Disre =  $\alpha$ - $\omega$ -Disäure, 2OH-Sre = 2-Hydroxysäure, m. =  $\text{C}_{16-9/10-16}$ -Dihydroxysäure (*midchain*); \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (*t-test*)

in der Mutante (*t-test*,  $p < 0,05$ ). Bei den anderen Substanzklassen konnten keine signifikanten Änderungen erkannt werden. Bei Betrachtung der Kutinmengen bezogen auf das Trockengewicht der Proben konnten die gleichen Unterschiede wie im Bezug auf die Fläche erkannt werden (Tab. Anhang 8.2.10.).

### 3.3.6. Permeabilität, Wachs- und Kutinzusammensetzung von *shn1*

Die Mutante *shn1* verfügt über die Überexpression für ein Gen, welches für einen Transkriptionsfaktor kodiert. So kommt es zu einer höheren Wachsbelegung im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Ws (Aharoni *et al.*, 2004).

#### Permeation *shn1*

Die Regressionsgerade der Aufnahmekinetik zeigte eine positive Steigung und eine hohe Linearität (*shn1*  $r^2 = 0,99$ ) (Abb. 3.20.A). Der errechnete Leitwert lag bei  $9,17 \cdot 10^{-7} \pm 5,59 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  (erstellt mit 135 Blattscheiben) für *shn1* und war um den Faktor 7 höher als der Leitwert des Wildtypen Ws (3.3.1.).

#### Wachsanalyse *shn1*

Die Mutante *shn1* verfügte im Vergleich zum Wildtyp über eine deutlich höhere Wachsbelegung auf den Blättern (Abb. 3.20.B und C, Tab. Anhang 8.2.11.). Die Wachsbelegung des Wildtyp Ws betrug in dieser Analytik  $0,32 \pm 0,09 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  und die der Mutante *shn1*  $0,85 \pm 0,15 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ . Dies war eine signifikante Steigerung der Wachsmenge (*t-test*,  $p < 0,01$ ) auf 266 % der Wildtypwachsmenge.

Wurden die einzelnen Substanzklassen betrachtet, fiel der sehr prägnante Unterschied in der Alkanmenge auf. Die Menge der Alkane stieg auf 578 % von  $0,091 \pm 0,029 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  im Wildtyp auf  $0,527 \pm 0,154 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in *shn1* (*t-test*,  $p < 0,01$ ). In der Aldehyd-Menge war auch ein klarer Anstieg zu erkennen auf 261 % (von  $0,039 \pm 0,019 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  auf  $0,102 \pm 0,026 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ; *t-test*,  $p < 0,01$ ) der Wildtypmenge. Auch die anderen Substanzklassen waren in der Mutante stärker vertreten (wenn auch nicht signifikant), die Säuren stiegen auf 160 % (von  $0,050 \pm 0,015 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in Ws auf  $0,081 \pm 0,017 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in *shn1*) und die Alkohole auf 126 % (von  $0,147 \pm 0,047 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in Ws auf  $0,185 \pm 0,024 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in *shn1*) der Wildtypmenge.

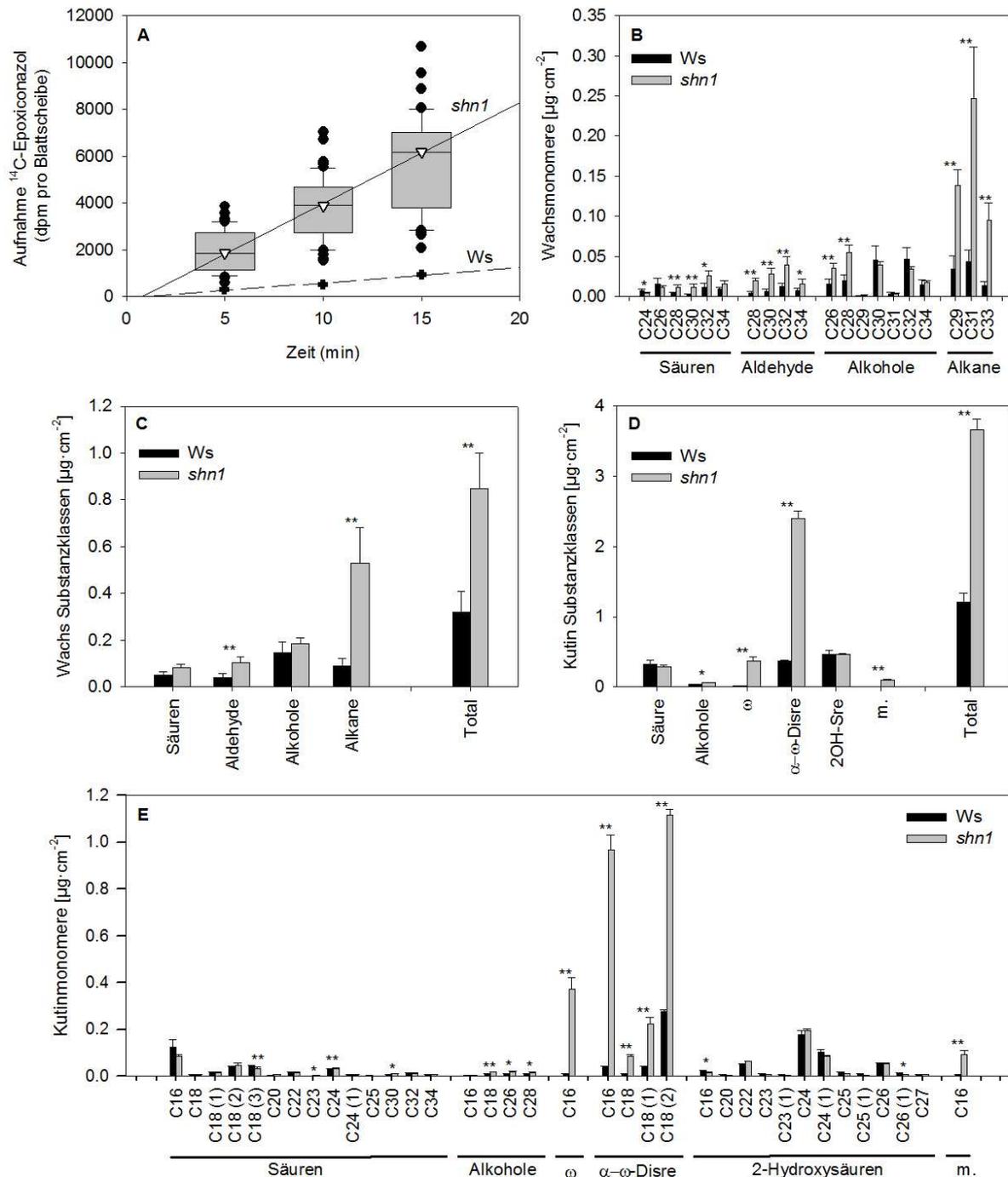


Abb. 3.20. **Permeation von  $^{14}\text{C}$ -Epoixiconazol und Wachs- und Kutinzusammensetzung für *shn1*.** (A) Permeation von  $^{14}\text{C}$ -Epoixiconazol für *shn1* im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Ws; Aufnahmekinetik von  $^{14}\text{C}$ -Epoixiconazol (dpm) pro Blattscheibe als Funktion der Zeit (min); (B) und (C) Wachsbelegung ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) von *shn1*, Absolute Verteilung der einzelnen Substanzen im Vergleich zum Wildtyp Ws (B) und der Substanzklassen und die Gesamtmenge Wachs für *shn1* (C) ( $n = 5$ ;  $\text{MW} \pm \text{Sa}$ ); (D) und (E) Kutinzusammensetzung ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) von *shn1*, Absolute Verteilung der einzelnen Substanzen im Vergleich zum Wildtyp Ws (E) und der Substanzklassen und die Gesamtmenge Kutin für *shn1* (D) ( $n = 3$ ;  $\text{MW} \pm \text{Sa}$ ) mit  $\omega = \omega$ -Hydroxysäure,  $\alpha$ - $\omega$ -Disre =  $\alpha$ - $\omega$ -Disäure, 2OH-Sre = 2-Hydroxysäure, m. =  $\text{C}_{16-9/10-16}$ -Dihydroxysäure (*midchain*); \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (*t-test*)

Kutinanalyse *shn1*

Die Mutante *shn1* besaß mehr Kutin als der korrespondierende Wildtyp Ws (Abb. 3.20.D und E, Tabelle Anhang 8.2.12.). Die Gesamtmenge Kutin stieg von  $1,21 \pm 0,13 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  im Wildtyp auf  $3,66 \pm 0,15 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  in der Mutante, welches eine signifikante Erhöhung der Kutinmenge auf 304 % der Wildtypmenge darstellt (*t*-test,  $p < 0,01$ ). Die stärksten Änderungen zeigten sich bei den  $\omega$ -Hydroxysäuren (Anstieg auf 3946 %, von  $0,009 \pm 0,001 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  in Ws auf  $0,372 \pm 0,051 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ), bei den  $\alpha$ - $\omega$ -Disäuren (Anstieg auf 646 %, von  $0,371 \pm 0,011 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  in Ws auf  $2,396 \pm 0,110 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) und der  $\text{C}_{16-9/10-16}$ -Hydroxysäure (Anstieg auf 1341 %, von  $0,007 \pm 0,001 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  in Ws auf  $0,093 \pm 0,016 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Diese Prozentangaben sollten mit Vorsicht bewertet werden, da bei dieser Angabe der Anteil der Substanzklassen am Gesamtkutin nicht mitbedacht wird. Denn der Anteil der  $\alpha$ - $\omega$ -Disäuren am Gesamtkutin stieg von 31 % im Wildtyp auf 65 % in der Mutante, wobei bei den  $\omega$ -Hydroxysäuren eine Steigerung von 1 % im Wildtyp auf 10 % in der Mutante und bei der  $\text{C}_{16-9/10-16}$ -Hydroxysäure ein Anstieg von 1 % im Wildtyp auf 3 % in der Mutante zu detektieren war. Die absoluten Anteile der Alkohole ( $0,033 \pm 0,008 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  in Ws,  $0,058 \pm 0,004 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  in *shn1*) und 2-Hydroxysäuren ( $0,468 \pm 0,058 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  in Ws,  $0,460 \pm 0,017 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  in *shn1*) blieben in etwa gleich bei Wildtyp und Mutante, wobei deren Anteil am Gesamtkutin durch den Anstieg der anderen Substanzen abnahm.

Diese Beobachtungen wurden auch mit sehr ähnlichen Werten gemacht, wenn das Trockengewicht als Bezugsgröße verwendet wurde (Tab. Anhang 8.2.12.).

**3.3.7. Permeabilität, Wachs- und Kutinzusammensetzung von *shn3***

Die Mutante *shn3* besitzt wie *shn1* eine Überexpression von einem der drei Gene, die für die Transkriptionsfaktoren kodieren, welche in Aharoni *et al.*, 2004 beschrieben werden.

Permeation *shn3*

Die durch die Aufnahmekinetik erstellte Regressionsgerade ergab eine positive Steigung und eine gute Linearität ( $r^2 = 0,86$ ). In der Abb. 3.17.A erkennt man, dass sich die Steigungen von Ws und *shn3* nicht deutlich voneinander unterscheiden. Der

errechnete Leitwert für *shn3* lag bei  $1,95 \cdot 10^{-7} \pm 1,34 \cdot 10^{-7} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  (erstellt mit 177 Blattscheiben). Dieser Wert war zwar um den Faktor 1,4 höher als der Leitwert des Wildtypen (3.3.1.), diese Werte waren aber statistisch voneinander nicht verschieden (*Mann-Whitney U-Test*,  $p > 0,05$ ). Auch hier war eine Anlaufphase der Kinetik zu erkennen, wie dies bereits für *cut1* zu sehen war.

#### Wachsanalyse *shn3*

Die Mutante *shn3* verfügte über eine höhere Wachsmenge auf den Blättern als der korrespondierende Wildtyp *Ws* (Abb. 3.21.B und C, Tab. Anhang 8.2.13.). Alle im Folgenden besprochenen Werte für die Wachsanalyse für *shn3* waren signifikant unterschiedlich vom Wildtyp (*t-test*,  $p < 0,01$ ). Die Wachsmenge stieg von  $0,72 \pm 0,07 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in *Ws* auf  $0,91 \pm 0,12 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in *shn3* und somit auf 126 %. Auch hier (wie bei *shn1*) war bei Betrachtung der Substanzklassen der stärkste Effekt bei den Alkanen zu erkennen, deren Menge auf 179% der Wildtypmenge von  $0,230 \pm 0,023 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in *Ws* auf  $0,410 \pm 0,064 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in *shn3* anstieg. Bei den Säuren fand eine Zunahme auf 166 % (von  $0,085 \pm 0,005 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  auf  $0,141 \pm 0,010 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) und bei den Aldehyden eine Zunahme auf 153 % (von  $0,119 \pm 0,024 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  auf  $0,182 \pm 0,046 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) der Wildtypmenge statt. Der deutliche Unterschied zu *shn1* war in den Alkoholen zu erkennen, deren Menge in *shn3* von  $0,287 \pm 0,021 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in *Ws* auf  $0,177 \pm 0,014 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  abfiel, das entspricht einer Reduktion um 38 %.

#### Kutinanalyse *shn3*

Die Mutante *shn3* wies keine großen Veränderungen in Bezug auf die Kutingesamtmenge auf (Abb. 3.21.D und E, Tab. Anhang 8.2.14.). Die Gesamtmenge von dem korrespondierenden Wildtyp lag bei  $1,21 \pm 0,13 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  und die von *shn3* bei  $1,35 \pm 0,22 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ . Diese zwei Werte waren nicht signifikant voneinander unterschiedlich.

Bei den einzelnen Substanzklassen nahm die Menge der Säuren (auf 83 %,  $0,318 \pm 0,057 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in *Ws*,  $0,265 \pm 0,039 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in *shn3*; *t-test*,  $p < 0,05$ ) ab. Die Menge der 2-Hydroxysäuren veränderte sich nicht (98 %, von  $0,468 \pm 0,058 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in *Ws*,  $0,457 \pm 0,066 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in *shn3*). Die Mengen von Alkoholen (144 %,  $0,033 \pm 0,008 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in *Ws*,  $0,048 \pm 0,0001 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in *shn3*),  $\omega$ -Hydroxysäuren (434 %,  $0,009 \pm 0,001 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in *Ws*,  $0,041 \pm 0,013 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ; *t-test*,  $p < 0,05$ ),  $\alpha$ - $\omega$ -Disäuren (141 %,  $0,371 \pm 0,011 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in *Ws*,  $0,524 \pm 0,127 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  in *shn3*) und der

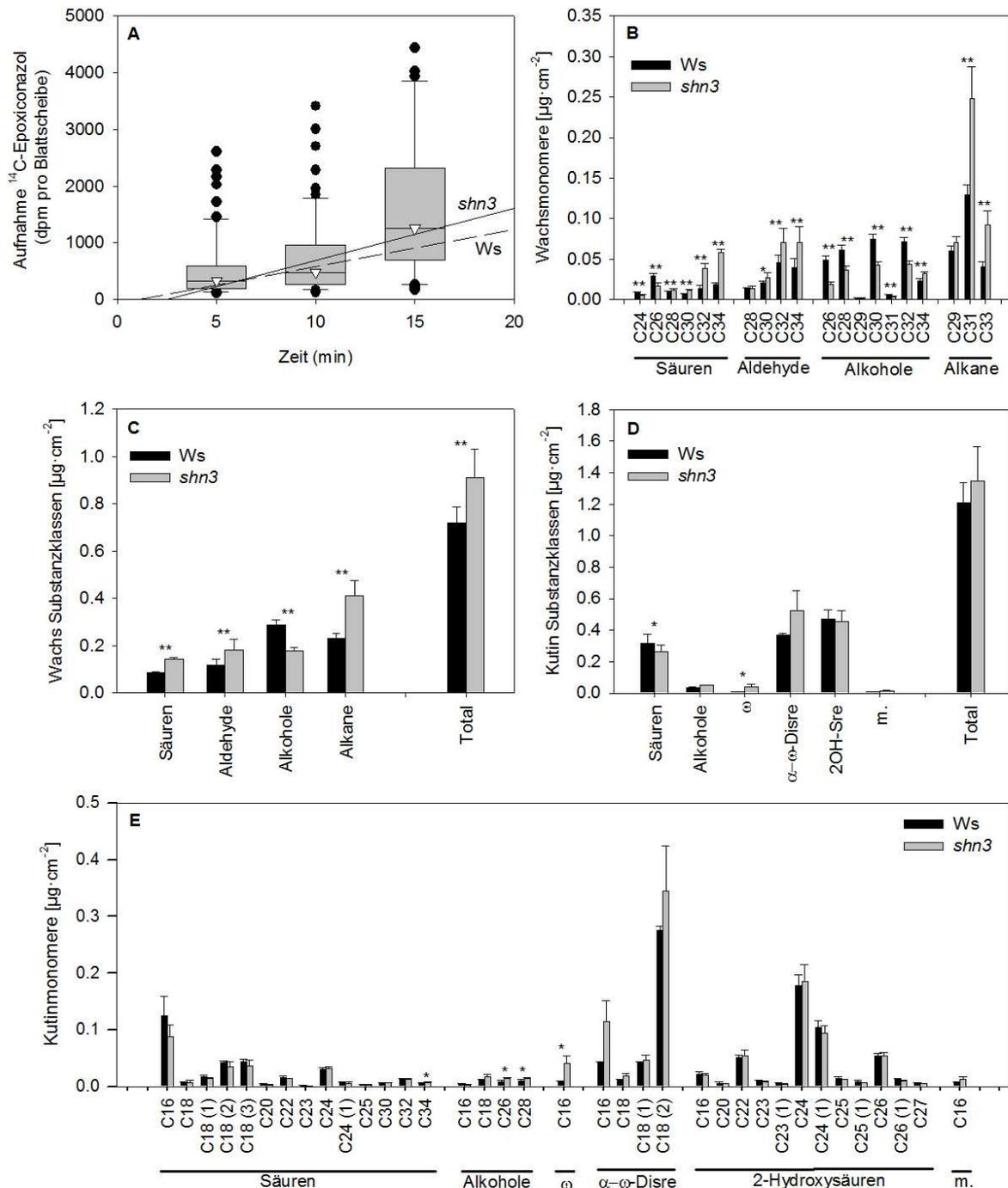


Abb. 3.21. Permeation von  $^{14}\text{C}$ -Epoixiconazol und Wachs- und Kutinzusammensetzung für *shn3*. (A) Permeation von  $^{14}\text{C}$ -Epoixiconazol für *shn3* im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Ws; Aufnahmekinetik von  $^{14}\text{C}$ -Epoixiconazol (dpm) pro Blattscheibe als Funktion der Zeit (min); (B) und (C) Wachsbelegung ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) von *shn3*, Absolute Verteilung der einzelnen Substanzen im Vergleich zum Wildtyp Ws (B) und der Substanzklassen und die Gesamtmenge Wachs für *shn3* (C) ( $n = 5$ ; MW  $\pm$  Sa); (D) und (E) Kutinzusammensetzung ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) von *shn3*, Absolute Verteilung der einzelnen Substanzen im Vergleich zum Wildtyp Ws (E) und der Substanzklassen und die Gesamtmenge Kutin für *shn3* (D) ( $n = 3$ ; MW  $\pm$  Sa) mit  $\omega = \omega$ -Hydroxysäure,  $\alpha$ - $\omega$ -Disre =  $\alpha$ - $\omega$ -Disäure, 2OH-Sre = 2-Hydroxysäure, m. =  $\text{C}_{16-9/10-16}$ -Dihydroxysäure (*midchain*); \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (*t*-test)

C<sub>16-9/10-16</sub>-Hydroxysäure (188 %,  $0,007 \pm 0,001 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  in Ws,  $0,013 \pm 0,004 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  in *shn3*) nahmen zu.

Bei Betrachtung der Kutinmengen bezogen auf das Trockengewicht der Proben konnten die gleichen Unterschiede wie im Bezug auf die Fläche erkannt werden (Tab. Anhang 8.2.14.).

### 3.3.8. Permeabilität und Wachsbelegung von *bdg*

Die Mutante *bdg* zeigt Defekte in der Kutikula. Wahrscheinlich ist BDG eine extrazelluläre Synthese, die für die Formation der Kutikula wichtig ist (Kurdyokov *et al.*, 2006b).

#### Permeation *bdg*

Die durch die Aufnahmekinetik erstellte Regressionsgerade ergab eine positive Steigung und eine Linearität von  $r^2 = 0,92$  (Abb.3.22.A). Der errechnete Leitwert für *bdg* lag bei  $5,71 \cdot 10^{-7} \pm 2,84 \cdot 10^{-7} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  (erstellt mit 111 Blattscheiben) und war damit um den Faktor 20 höher als der Leitwert des korrespondierenden Wildtypen Col-8 (3.3.1.).

#### Wachsanalyse *bdg*

Die Mutante *bdg* verfügte im Vergleich zum Wildtyp über eine höhere Wachsmenge (Abb. 3.22.B und C, Tabelle Anhang 8.2.15.). Der Wildtyp Columbia-8 besaß in dieser Analyse eine absolute Wachsmenge von  $0,54 \pm 0,17 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , *bdg* eine absolute Menge von  $0,77 \pm 0,09 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Hier fand eine Anhebung auf 142 % statt, die statistisch allerdings knapp nicht gestützt werden konnte (*t-test*,  $p = 0,06$ ).

Wendete man sich den einzelnen Substanzklassen zu, fanden keine signifikanten Änderungen bei Säuren, Aldehyden und Alkoholen zwischen Wildtyp und Mutante statt. Bei den Alkanen war ein signifikanter Anstieg auf 194 % der Wildtypmenge (*t-test*,  $p < 0,05$ ) zu verzeichnen.

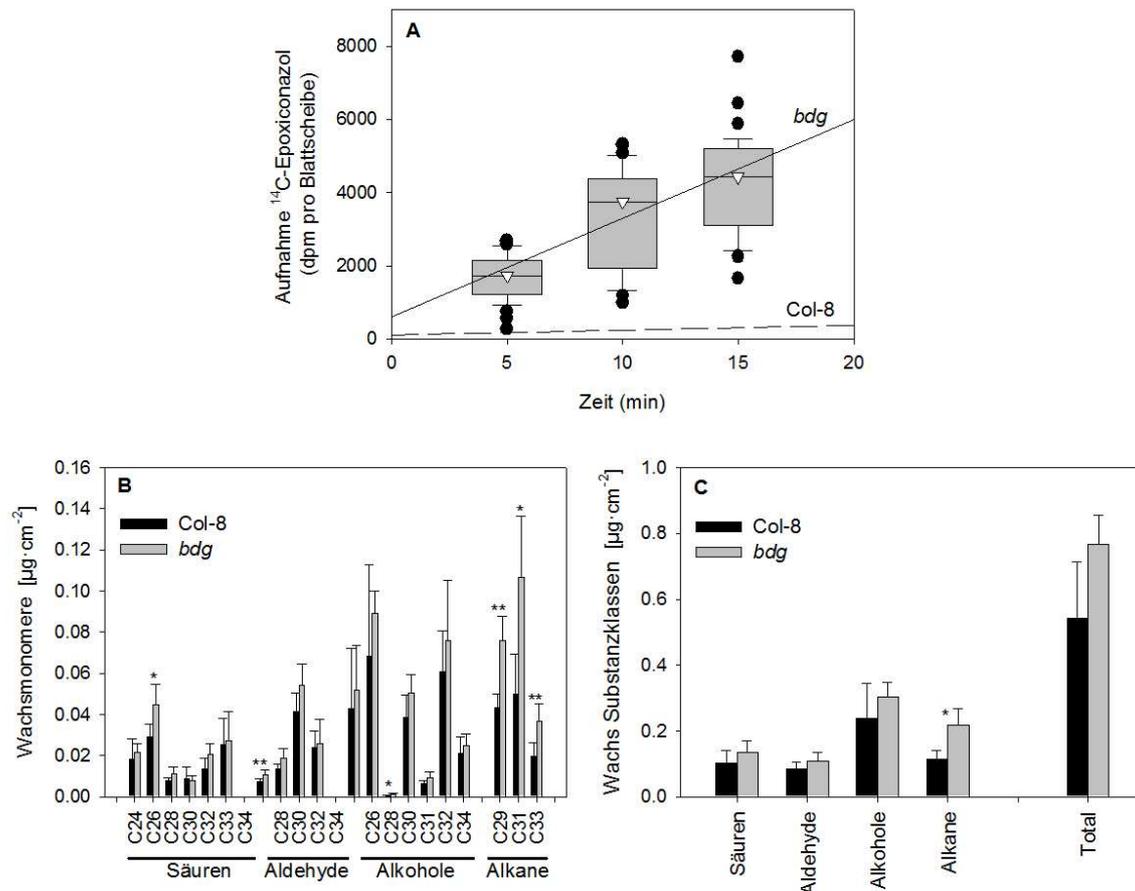


Abb. 3.22. **Permeation von <sup>14</sup>C-Epoxiconazol und Wachsbelegung für *bdg*.** (A) Permeation von <sup>14</sup>C-Epoxiconazol für *bdg* im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Col-8; Aufnahmekinetik von <sup>14</sup>C-Epoxiconazol (dpm) pro Blattscheibe als Funktion der Zeit (min); (B) und (C) Wachsbelegung (µg·cm<sup>-2</sup>) von *bdg*, Absolute Verteilung der einzelnen Substanzen im Vergleich zum Wildtyp Col-8 (B) und der Substanzklassen und die Gesamtmenge Wachs für *bdg* (C) (n = 5; MW ± Sa); \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 (*t*-test)

### 3.3.7. Permeabilität, Wachs- und Kutinzusammensetzung von *att1*

Die Mutante *att1* verfügt über einen Defekt im Gen *CYP86A2*, welches für eine Cytochrom-P<sub>450</sub>-Monooxygenase kodiert. *CYP86A2* katalysiert Fettsäureoxidation (Xiao *et al.*, 2004).

#### Permeation *att1*

Die durch die Aufnahmekinetik (Abb. 3.23.A) erstellte Regressionsgrade für *att1* war durch eine positive Steigung und eine gute Linearität ( $r^2 = 0,9967$ ) gekennzeichnet. Der errechnete Leitwert lag bei  $5,05 \cdot 10^{-7} \pm 5,07 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  (erstellt mit 112 Blattscheiben) und war somit um den Faktor 18 höher als der Leitwert des Wildtypen.

Bei *wax2* (3.3.2.) war schon einmal beobachtet worden, dass die y-Achse bei einem hohen Wert geschnitten wurde, dies war hier erneut der Fall.

#### Wachsanalyse *att1*

In der Wachsanalyse konnte zwischen dem Wildtyp Col-8 und der Mutante *att1* keine signifikante Änderung erkannt werden (Abb. 3.23.B und C; Anhang Tab. 8.2.16.). Die absolute Wachsmenge betrug bei Col-8  $0,325 \pm 0,052 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  und bei *att1*  $0,370 \pm 0,003 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Bei der Betrachtung der einzelnen Substanzklassen war eine signifikante Änderung (*t*-test,  $p < 0,05$ ) der Säuren zu erkennen, *att1* verfügte über 141 % der Menge an Säuren im Wildtyp. Dies spiegelte sich in allen Einzelwerten der Säuren wieder, die alle signifikant erhöht waren, wobei die C<sub>26</sub>-Säure mit 160 % der Wildtypmenge am stärksten betroffen war. Auch das C<sub>29</sub>-Alkan war signifikant erhöht, dies zeigte sich aber nicht in der Gesamtbetrachtung der Alkane, bei denen keine Änderung erkannt werden konnte. Ebenfalls keine signifikante Änderung war bei Aldehyden und Alkoholen zu erkennen.

#### Kutinanalyse *att1*

In der Kutinanalyse zeigte sich eine deutliche Reduktion der Kutinbestandteile in der Mutante *att1* (Abb. 3.23.D und E, Anhang Tab. 8.2.17.). Die Gesamtmenge betrug für den Wildtyp Col-8  $1,56 \pm 0,23 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  und die Mutante *att1*  $1,11 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , dies entspricht einer Reduktion auf 71 % der Wildtypmenge. In dieser Analyse konnte nur eine Parallele für die Mutante untersucht werden, so dass hier auf die Statistik verzichtet werden musste. Bei der Betrachtung der einzelnen Substanzklassen fiel sofort die starke Reduktion der  $\alpha$ - $\omega$ -Disäuren um 80 % auf (von  $0,523 \pm 0,070 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  in Col-8 auf  $0,106 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  bei *att1*). Auch Säuren (um 34 %),  $\omega$ -Hydroxysäuren (um 25%) und die C<sub>16-9/10-16</sub>-Hydroxysäure (um 60 %) waren reduziert. Die Menge der Alkohole (um 62 % erhöht) und 2-Hydroxysäuren (um 26 % erhöht) waren erhöht. Bei Betrachtung der Kutinmengen bezogen auf das Trockengewicht der Proben konnten die gleichen Unterschiede wie im Bezug auf die Fläche erkannt werden (Tab. Anhang 8.2.17.).

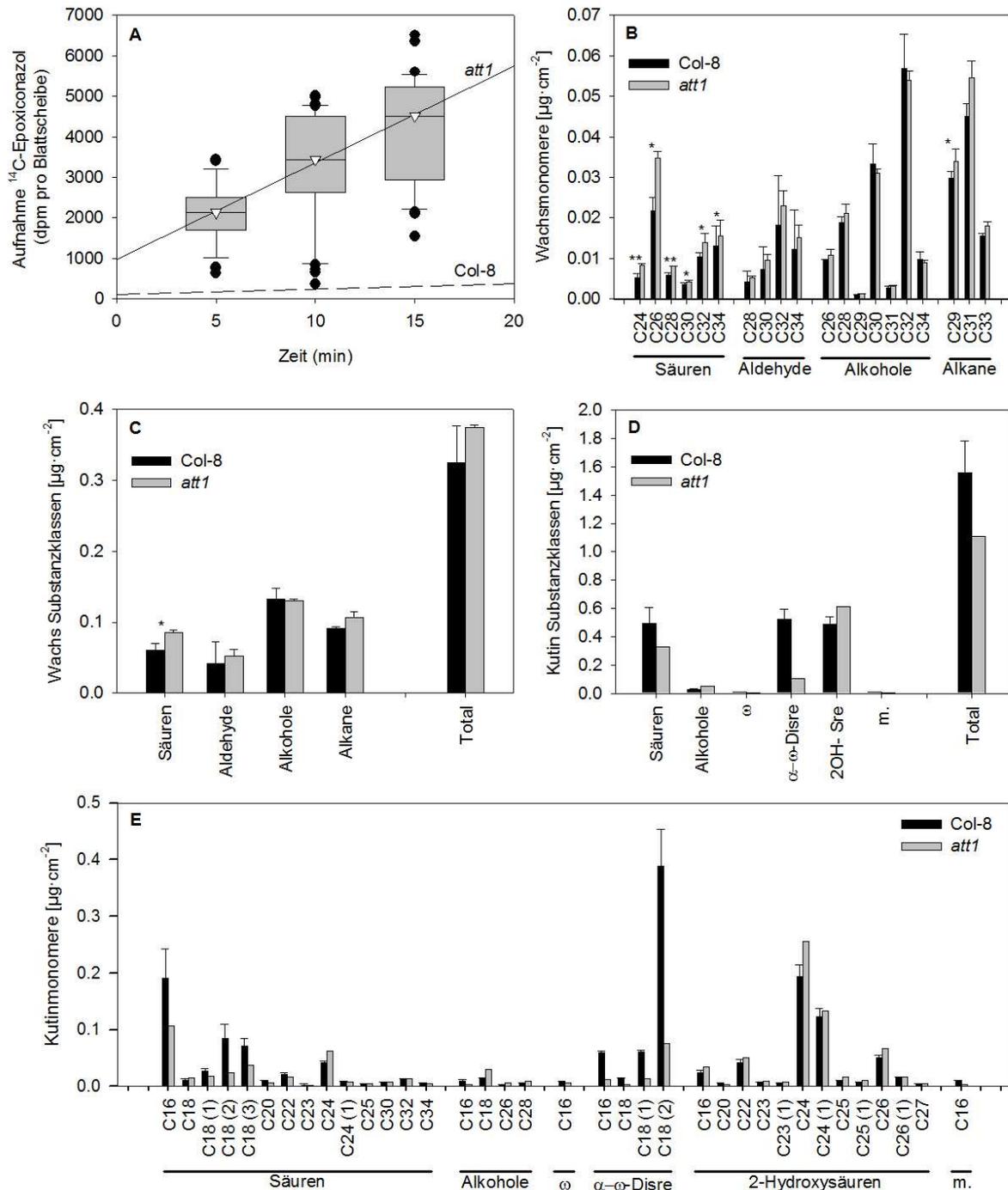


Abb. 3.23. Permeation von  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol und Wachs- und Kutinzusammensetzung für *att1*. (A) Permeation von  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol für *att1* im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Col-8; Aufnahmekinetik von  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol (dpm) pro Blattscheibe als Funktion der Zeit (min); (B) und (C) Wachsbelegung (in  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) von *att1*, Absolute Verteilung der einzelnen Substanzen im Vergleich zum Wildtyp Col-8 (B) und der Substanzklassen und die Gesamtmenge Wachs für *att1* (C) ( $n = 5$ ;  $\text{MW} \pm \text{Sa}$ ); (D) und (E) Kutinzusammensetzung (in  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) von *att1*, Absolute Verteilung der einzelnen Substanzen im Vergleich zum Wildtyp Col-8 (E) und der Substanzklassen und die Gesamtmenge Kutin für *att1* (D) ( $n = 3$  bzw.  $1$ ;  $\text{MW} \pm \text{Sa}$ ) mit  $\omega = \omega$ -Hydroxysäure,  $\alpha$ - $\omega$ -Disre =  $\alpha$ - $\omega$ -Disäure, 2OH-Sre = 2-Hydroxysäure, m. =  $\text{C}_{16-9/10-16}$ -Dihydroxysäure (*midchain*); \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; *t*-test); bei der Kutinanalyse konnte keine Statistik durchgeführt werden, da für *att1*  $n = 1$ .

### 3.4. Vergleich mit Chlorophyll Leaching und Toluidin Blau

#### 3.4.1. Chlorophyll Leaching

Das *Chlorophyll Leaching* wird von vielen Laboren als Methode zur Bestimmung der Permeabilität von *A. thaliana* genutzt. Da bei dieser Methode 80 % Ethanol genutzt wird, welches recht schnell durch die Stomata infiltriert, muss diese Methode mit Vorsicht behandelt werden. Um jedoch die zuvor mit dem Permeationsassay untersuchten Mutanten sinnvoll mit dieser Methode zu vergleichen, wurde für fünf der Mutanten ein *Chlorophyll Leaching* durchgeführt (Abb. 3.24.). In den Diagrammen wurde die Menge an ausgewaschenem Chlorophyll bezogen auf die Gesamtmenge an Chlorophyll gegen die Zeit (min) aufgetragen. Die so erstellten Kinetiken verliefen nicht linear.

Bei der Mutante *wax2* (Abb. 3.24.A) konnte nach kurzer Zeit deutlich mehr Chlorophyll ausgewaschen werden im Vergleich zum Wildtyp. Innerhalb von zwei Stunden waren die Blätter von Wildtyp und Mutante komplett ausgewaschen.

Für *cer3* zeigte sich ein ähnliches Bild (Abb. 3.24.B), in dem die Mutante deutlich schneller Chlorophyll verlor als der entsprechende Wildtyp (Col-0). Auch hier konnte innerhalb von zwei Stunden alles Chlorophyll aus den Blättern von Wildtyp und Mutante ausgewaschen werden.

Für *cer5* zeigte sich ein anderes Bild (Abb. 3.24.C). Hier war kein deutlicher Unterschied zwischen der Mutante und dem entsprechenden Wildtyp zu erkennen. Dieses Experiment fiel insofern aus dem Rahmen, als dass es hier fünf Stunden benötigte um alles Chlorophyll auszuwaschen. Dies galt allerdings nicht nur für die Mutante, sondern auch für den Wildtyp Col-8. An dieser Stelle wurde deutlich, wie schlecht diese Methoden standardisiert werden können, da frisch geerntete Pflanzen immer anders reagieren können. So ist auch der Vergleich zum Wildtyp nicht nur bei dem erstellten Assay und den Analysen, aber auch hier ganz essentiell.

Die *cut1*-Mutante entsprach wieder dem Bild, das auch *wax2* und *cer3* gezeigt hatten (Abb. 3.24.D). Die Mutante zeigte einen deutlich schnelleren Verlust von Chlorophyll im Vergleich zum Wildtyp. Hier konnte das komplette Chlorophyll nach zwei Stunden aus den Blättern entfernt werden.

Das *Chlorophyll Leaching* für *att1* (Abb. 3.24.E) zeigte Ähnlichkeiten zu dem *Chlorophyll Leaching* von *cer5*. Auch hier gab es keinen deutlichen Unterschied zwischen der Mutante und dem Wildtyp zu verzeichnen.

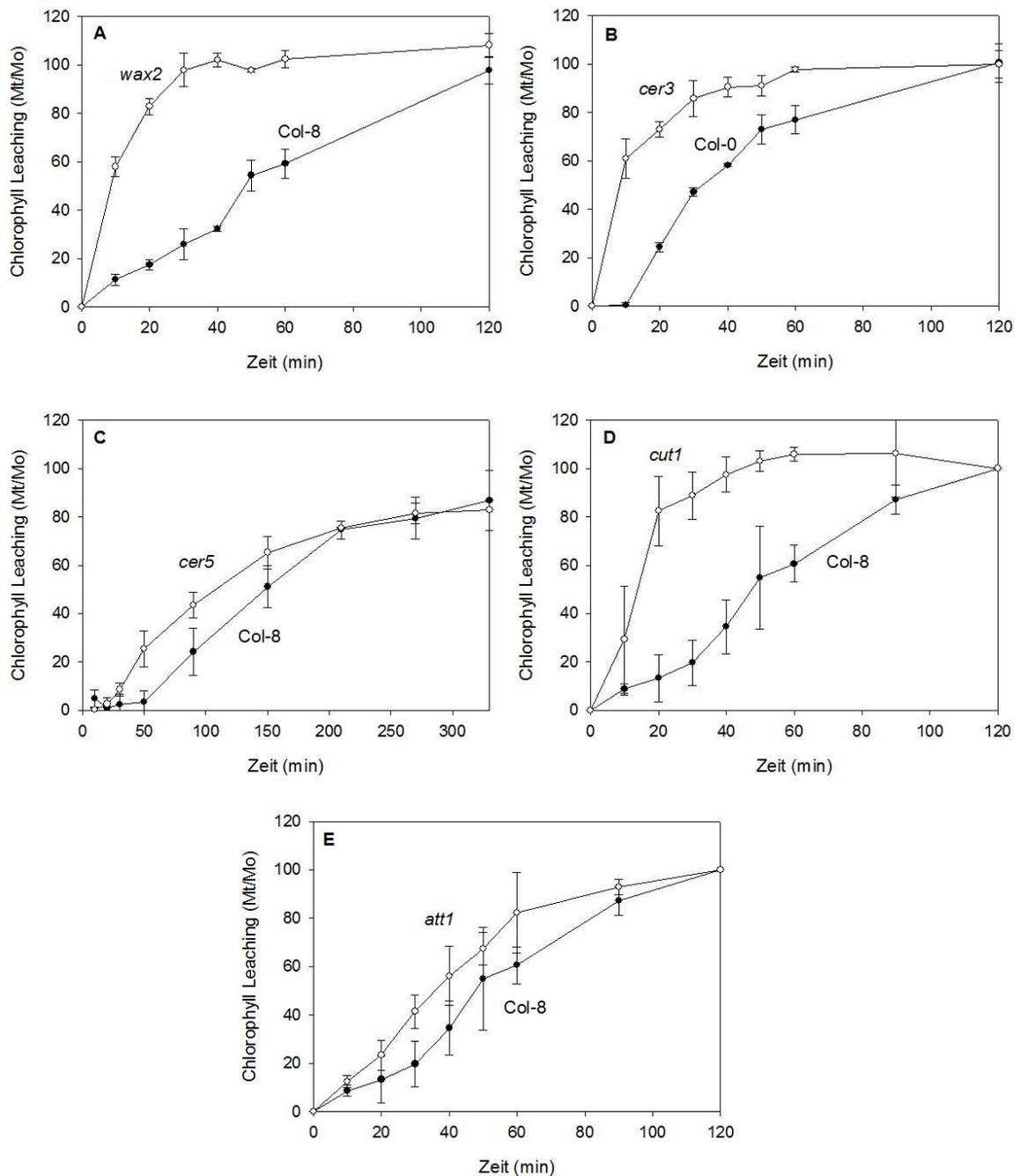


Abb. 3.24. **Chlorophyll Leaching.** *Chlorophyll Leaching* von (A) *wax2*, (B) *cer3*, (C) *cer5*, (D) *cut1* und (E) *att1* im Vergleich mit dem korrespondierenden Wildtyp (für alle Col-8, für *cer3* Col-0). Die relative Menge Chlorophyll bezogen auf die Gesamtchlorophyllmenge ( $M_t/M_0$ ) wurde gegen die Zeit (min) aufgetragen. ( $n = 3$ , MW  $\pm$  Sa)

### 3.4.2. Toluidin Blau

Ebenfalls eine oft angewandte Methode, um Blätter von *A. thaliana* auf Kutikuladefekte zu überprüfen ist die Toluidin Blau Färbung. Dieser hydrophile Farbstoff bindet an die Zellwand, falls Stellen an der Kutikula defekt sind. In der vorliegenden Arbeit wurden Blätter von Columbia-8, *wax2* und *cer5* für jeweils 2 und 10 min gefärbt und danach unter dem Binokular betrachtet.

Die Blätter von Col-8 und *cer5* waren nach 2 min noch überhaupt nicht gefärbt (Abb. 3.25. Col-8: A und B; *cer5*: I und J) und nach 10 min konnten kleine Punkte hauptsächlich (aber nicht ausschließlich) auf der Unterseite des Blattes erkannt werden (Abb. 3.25. Col-8: C und D; *cer5*: K und L).

Die Mutante *wax2* zeigte ein ungleichmäßiges Bild. Schon nach 2 min waren Teile der Blätter bereits leicht gefärbt (Abb. 3.25.F), andere Blätter hingegen zeigten überhaupt keine Färbung (Abb. 3.25.E). Nach 10 min waren dann aber dunkle Flecken auf allen Blättern zu erkennen (Abb. 3.25.G und H).

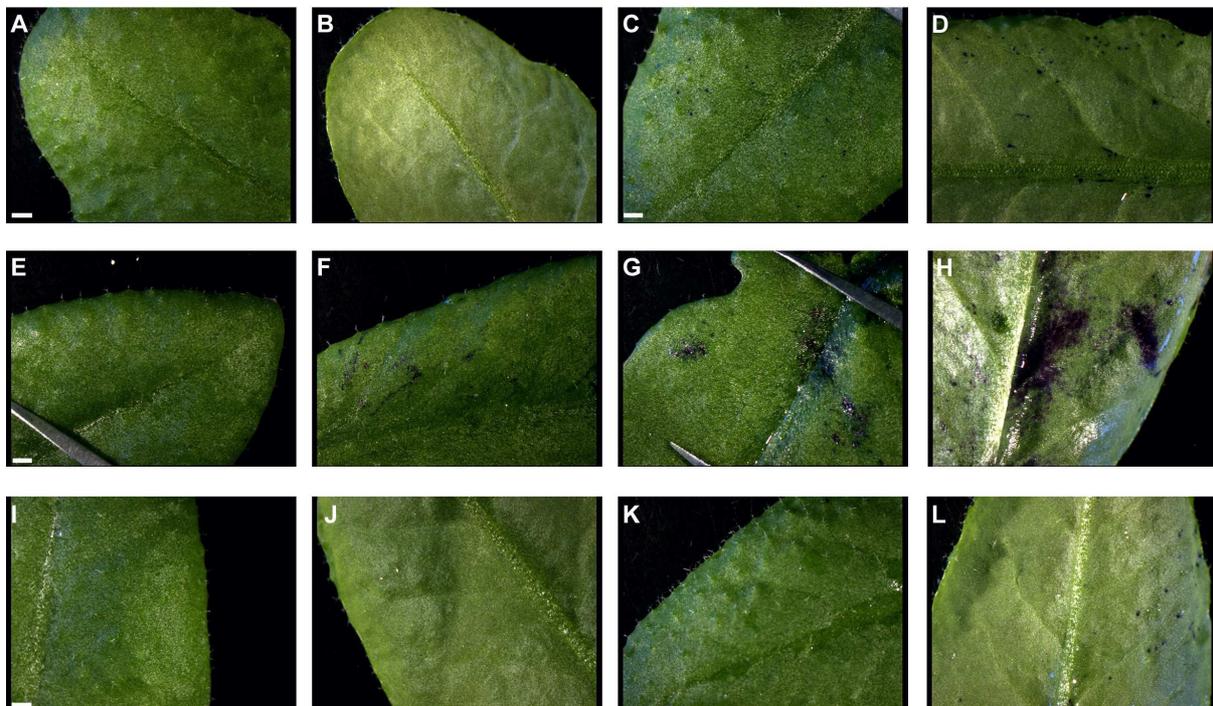


Abb. 3.25. **Toluidin Blau Färbung von Columbia-8, *wax2* und *cer5*-Blättern.** (A - D) Col-8; nach 2 min Färbung (A, B) und nach 10 min Färbung (C, D); (E - H) *wax2*; nach 2 min Färbung (E, F) und nach 10 min Färbung (G, H); (I - L) *cer5*; nach 2 min Färbung (I, J) und nach 10 min Färbung (K, L), Der Größenbalken entspricht 1 cm und gilt dann für alle folgenden Bilder.

### 3.5. Transgene Linien, die das Gen *CYP703A2* exprimieren

*CYP703A2* (Morant *et al.*, 2007) ist eine Cytochrom-P<sub>450</sub>-Monooxygenase, die eine *in-chain*-Hydroxylierung in Fettsäuren durchführt. Das Gen *CYP703A2* soll unter Kontrolle des epidermisspezifischen Promotors<sub>CUT1</sub> und des konstitutiv exprimierten Promotors<sub>35S</sub> in Pflanzen eingebracht werden.

#### 3.5.1. Das Gen *CYP7023A2* unter der Kontrolle des Promotor<sub>CUT1</sub>

##### Bestätigung der Expression von *CYP703A2*

Nach der Transformation in *A. thaliana* wurden die Samen der transformierten Pflanzen durch das Anziehen auf MS-Agar mit Hygromycin selektiert. Die Resistenz gegen dieses Antibiotikum vermittelte der verwendete Vektor pMDC99 (Abb. Anhang 8.4.). Aus den so selektierten Pflanzen wurde RNA extrahiert und eine RT-PCR durchgeführt, in der gezeigt werden konnte, dass das Gen in fast allen der 16 getesteten Linien exprimiert wurde (Abb. 3.26.). Nur in Linie 4 konnte keine Expression nachgewiesen werden. Die anderen Linien zeigten unterschiedlich starke Expressionsmengen. So wurden die Linien 1, 7, 8, 9, 11, 13, 15 und 16 ausgewählt, um Linien mit verschieden starker Expression in der Analytik zu untersuchen.

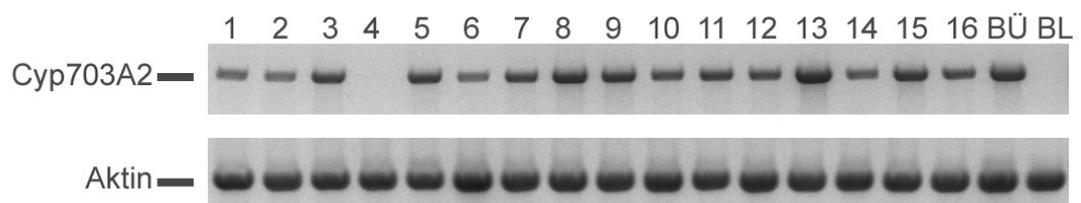


Abb. 3.26. **RT-PCR** der 16 potentiell transgenen Linien mit *Cyp703A2* unter der Kontrolle des Promotors<sub>CUT1</sub>. Für die RT-PCR wurde RNA in einer Konzentration von 100 ng eingesetzt. Als Kontrolle wurde die Wildtyp-RNA von Blüten (positiv) und Blättern (negativ) eingesetzt. (BÜ = Blüte; BL = Blatt)

##### Wachsanalytik

In der Wachsanalytik konnten Säuren, Aldehyde, Alkohole und Alkane identifiziert werden. Es konnten keine neuen Substanzen mit der eingefügten Hydroxylierung

nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Wildtyp konnten keine klaren Änderungen ermittelt werden. (Abb. 3.27.A; Tab. Anhang 8.3.2.1.)

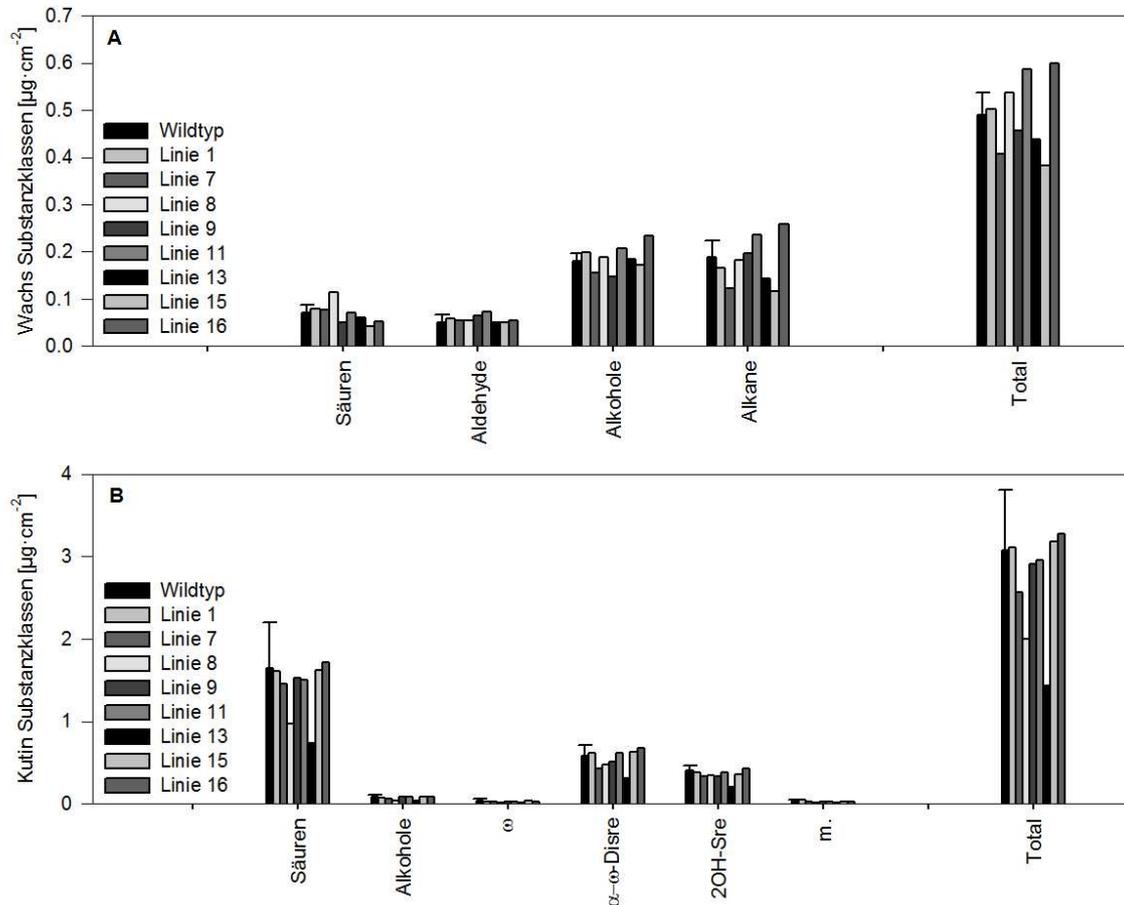


Abb. 3.27. **Wachs- und Kutinzusammensetzung der transgenen Pflanzen mit einem Promotor<sub>CUT1</sub>:Cyp703A2 Konstrukt im Vergleich zum Wildtyp Col-8.** (A) Absolute Wachsbelegung ( $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp Col-8, zunächst nach Substanzklassen aufgeteilt und als Gesamtwachsmenge. Der Wildtyp spiegelt den Mittelwert aus 5 Parallelen mit Sa wider, von den Mutanten wurden jeweils 3 Blätter einer Pflanze der T1-Generation analysiert; (B) Absolute Kutinbelegung ( $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp Col-8, zunächst nach Substanzklassen aufgeteilt und als Gesamtkutinmenge. Der Wildtyp spiegelt den Mittelwert aus 7 Parallelen mit Sa wider, von den Mutanten wurden jeweils 3 Blätter einer Pflanze der T1-Generation analysiert. Die Benennung der Linien entspricht den Linien der RT-PCR (Abb. 3.26.).

### Kutinanalytik

In der Kutinanalytik konnten sowohl in Wildtyp als auch in der Mutante Säuren, Alkohole,  $\omega$ -Hydroxysäuren,  $\alpha$ - $\omega$ -Disäuren, 2-Hydroxysäuren und die

$C_{16-9/10-16}$ -Hydroxysäure identifiziert werden. Auch hier konnten leider keine neuen Substanzen mit einer eingefügten Hydroxylierung erkannt werden. Im Vergleich zum Wildtyp waren keine klaren Änderungen zu erkennen (Abb. 3.27.B; Anhang Tab. 8.3.2.2.).

### 3.5.2. Das Gen *CYP703A2* unter der Kontrolle des Promotors<sub>35S</sub>

Die Samen der transformierten Pflanzen wurden durch das Anziehen auf MS-Agar mit Hygromycin selektiert. Die Resistenz gegen dieses Antibiotikum vermittelt der verwendete Vektor pMDC32 (Abb. Anhang 8.6.), der auch den Promotor<sub>35S</sub> vor dem Konstrukt liefert. Aus den so selektierten Pflanzen wurde RNA extrahiert und eine RT-PCR durchgeführt, in der gezeigt werden konnte, dass das Gen in allen der 11 getesteten Linien exprimiert wird (Abb. 3.28.). In den Linien konnte eine unterschiedlich starke Expressionsmengen gezeigt werden. So wurden die Linien 1, 2, 3, 4, 5, 9, 10 und 11 ausgewählt, um Linien mit verschieden starker Expression in der Analytik zu untersuchen.

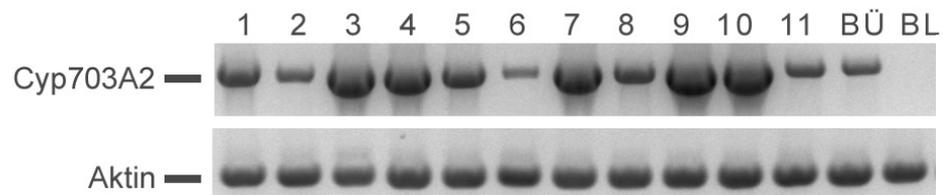


Abb. 3.28. **RT-PCR** der 11 potentiell transgenen Linien mit *Cyp703A2* unter der Kontrolle des Promotors<sub>35S</sub>. Für die RT-PCR wurde RNA in einer Konzentration von 100 ng eingesetzt. Als Kontrolle wurde die Wildtyp-RNA von Blüten (positiv) und Blättern (negativ) eingesetzt. (BÜ = Blüte; BL = Blatt)

### Wachsanalytik

Bei der Wachsanalytik konnten Säuren, Aldehyde, Alkohole und Alkane identifiziert werden. Es konnten keine neuen Substanzen identifiziert werden. Die für diese Proben genutzten Pflanzen der Mutanten 9, 10 und 11 wurden zu einem anderen Zeitpunkt angezogen und analysiert, was erklärt, dass hier eine andere Menge Wachs in Wildtyp und in den Mutanten vorhanden ist als bei den Linien 1, 2, 3, 4, 5. So können die verschiedenen Linien nicht alle untereinander, aber immerhin alle mit

dem zur gleichen Zeit angezogenen und analysierten Wildtyp verglichen werden. Es konnten keine deutlichen Unterschiede zum Wildtyp und keine neuen hydroxylierten Substanzen nachgewiesen werden (Abb. 3.29.A; Anhang Tab. 8.3.2.3. und 8.3.2.4.).

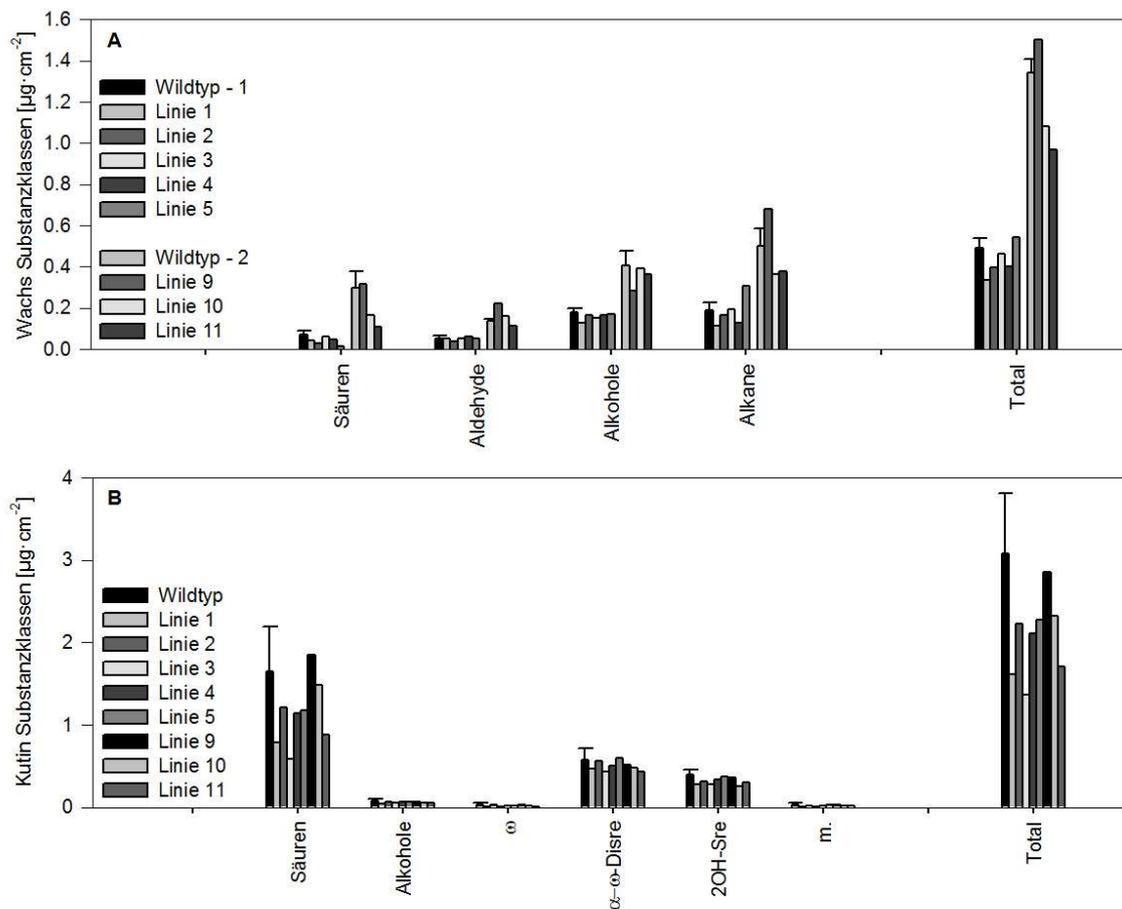


Abb. 3.29. **Wachs- und Kutinbelegung der transgenen Pflanzen mit einem Promotor<sub>35S</sub>:Cyp703A2 Konstrukt im Vergleich zum Wildtyp Col-8.** (A) Absolute Wachsbelegung ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp Col-8, zunächst nach Substanzklassen aufgeteilt und als Gesamtwachsmenge. Der Wildtyp - 1 spiegelt den Mittelwert aus 5 Parallelen mit Sa wider, von den Mutanten wurden jeweils 3 Blätter einer Pflanze der T1-Generation analysiert. Der Wildtyp - 2 (nur 2 Parallelen) und die dazugehörigen Linien 9, 10 und 11 wurden zu einem anderen Zeitpunkt analysiert und variieren so in der absoluten Menge im Vergleich zum Wildtyp - 1 und Mutanten 1 - 5. (B) Absolute Kutinzusammensetzung ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp Col-8, zunächst nach Substanzklassen aufgeteilt und als Gesamtkutinmenge. Der Wildtyp spiegelt den Mittelwert aus 7 Parallelen mit Sa wider, von den Mutanten wurden jeweils 3 Blätter einer Pflanze der T1-Generation analysiert. Die Benennung der Linien entspricht den Linien der RT-PCR (Abb. 3.28.).

### Kutinanalytik

In der Kutinanalytik konnten sowohl in Wildtyp als auch in der Mutante Säuren, Alkohole,  $\omega$ -Hydroxysäuren,  $\alpha$ - $\omega$ -Disäuren, 2-Hydroxysäuren und die C<sub>16-9/10-16</sub>-Hydroxysäure identifiziert werden. Auch hier war es leider nicht möglich veränderte Substanzen zu detektieren. Mutanten und Wildtyp verfügten über keine veränderten Kutinmengen. Nur in den Linie 1 und 3 waren weniger Säuren zu finden, aber die den entsprechenden hydroxylierten Säuren waren nicht nachzuweisen (Abb. 3.29.B; Anhang Tab. 8.3.2.5.).

Die so analysierten Linien von *A. thaliana* sollten bei einer Änderung des Wachses oder des Kutins für den Permeationsassay eingesetzt werden. Da aber weder eine Änderung im Wachs noch im Kutin des Blattes eine Änderung festzustellen war, wurde dies nicht weiter verfolgt.



## **4. Diskussion**

#### 4.1.1. Permeationsassay für *A. thaliana*

##### 4.1.1. Permeationsassay für den Wildtyp Col-8 von *A. thaliana*

Ein Hauptziel dieser Arbeit bestand darin, einen Permeationsassay zu entwickeln, der eine quantitative Bestimmung der Permeabilität von *A. thaliana* mit intakten Blättern erlauben soll. Solch eine Methode wurde bereits in der Literatur vorgeschlagen (Kerstiens *et al.*, 2006). Besonders durch die große Menge an Kutikula-Mutanten von *A. thaliana* wird diese zu einem interessanten und wichtigen Versuchsobjekt. Die vorgeschlagene Methode wurde an Blättern von *H. helix* erprobt. Hierfür wurden diese in eine Lösung mit radioaktiv-markierter Benzoesäure gegeben. Diese wurde gewählt, da sie günstig und leicht erhältlich ist. Da der pKS Wert von Benzoesäure 4.2 beträgt, wurde die wässrige Lösung bei pH 3 abgepuffert, wodurch die Benzoesäure hauptsächlich in nicht-dissoziierter Form vorliegt. Aufgrund des basischen pH-Wertes dissoziiert die Benzoesäure in der Zelle. Dies führt zu einem maximalen Konzentrationsunterschied und so zu einer maximalen Aufnahme rate (Schreiber and Schönherr, 2009). Dieser Ansatz war leider für *A. thaliana* nicht geeignet, da diese sehr empfindlich auf den niedrigen pH Wert reagierte. Es konnten zwar Experimente mit Benzoesäure durchgeführt werden (De Oliveira, 2009), allerdings fand ein starker Turgorverlust nach längeren Inkubationszeiten statt. Um zu vermeiden, dass es doch zu einer Schädigung der Blätter kommt, wurden im Rahmen dieser Arbeit nach Alternativen zu Benzoesäure gesucht. Die Wahl fiel auf das systemische Fungizid Epoxiconazol (BASF), welches ungeladen ist und daher bei neutralem pH angeboten werden konnte. Theoretisch ist jedes Molekül, welches bei neutralem pH in Wasser gelöst werden kann, für diesen Aufnahmeassay geeignet.

Wurde die Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol in *Arabidopsis* Blätter als Funktion der Zeit aufgetragen ergab sich eine lineare Aufnahmekinetik mit einer ausgeprägten Streuung (Abb. 3.1.A). Die mit 830 Blattscheiben erstellte Häufigkeitsverteilung war rechtsschief, was darauf hinweist, dass ein Teil der Blattscheiben deutlich mehr Radioaktivität aufgenommen hat als der Hauptteil der Blattscheiben (Abb. 3.1.B). Wurden diese 14 % der Blattscheiben entfernt nahm die Variation deutlich ab (Abb. 3.1.D) und die Häufigkeitsverteilung war nicht unterschiedlich von einer Gauß-Verteilung (Abb. 3.1.E und F), was durch einen *Probability Plot* und den

Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung gezeigt werden konnte. Diese nicht-gaussche Verteilung und die große Variabilität bei der kutikulären Permeabilität wurden bereits durch mehrere Publikationen aus der Vergangenheit bestätigt. Mehrere Häufigkeitsverteilungen, in denen 10 - 15 % der Werte zu einer rechtsschiefen Verteilung führen, wurden auch für isolierte Kutikularmembranen für Wasser (Geyer and Schönherr, 1990; Schreiber and Riederer, 1996a) und für organische Chemikalien (Baur, 1997; Niederl *et al.*, 1998) gezeigt. Dies scheint eine charakteristische Eigenschaft der Kutikula zu sein, unabhängig davon ob sie isoliert wurde oder sich noch am Blatt befindet. Es gibt auch keine Hinweise darauf, dass die Kutikula dieser Blattscheiben beschädigt wurde, so dass man diese Werte nicht einfach als Ausreißer ausschließen darf. Dies wurde mit Ausnahme von einer Arbeit (Geyer and Schönherr, 1990) in der Vergangenheit auch nicht so gehandhabt (Baur, 1997; Schreiber and Riederer, 1996a; Niederl *et al.*, 1998), so dass auch in der hier vorliegenden Arbeit die Werte nicht ausgeschlossen wurden. Eine Möglichkeit dieses Problem zu minimieren ist die Anzahl der Stichproben zu erhöhen, so dass diese Werte keine Rolle spielen.

#### 4.1.2. Leitwert für *A. thaliana*

Da gezeigt werden konnte, dass keine Gauß-Verteilung vorliegt, wird die Regressionsgerade durch die Mediane angepasst und die Leitwerte mit dieser Steigung berechnet. Der Leitwert von  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol für *A. thaliana* beträgt  $2,79 \cdot 10^{-8} \pm 6,35 \cdot 10^{-9} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  (Abb. 3.1.). Im Vergleich zu bisher veröffentlichten Permeabilitätsdaten von isolierten Kutikularmembranen und anderen Substanzen ist dieser Leitwert immens hoch. Häufig wird ein Bereich in der Größenordnung  $10^{-10} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  gemessen (Schreiber und Schönherr, 2009).

$^{14}\text{C}$ -Epoconazol wurde bisher nicht als Substanz für radioaktive Aufnahmeexperimente verwendet. Daher wurde für den Vergleich von *A. thaliana* mit anderen Spezies die Kutikula von *P. laurocerasus* am intakten Blatt gemessen. Hierfür wurden Blattscheiben ausgestanzt und in einem Aufnahmeexperiment genutzt. Für die astomatäre Blattoberseite wurde ein Leitwert von  $4,22 \cdot 10^{-10} \pm 1,07 \cdot 10^{-10} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  und für die stomatäre Blattunterseite ein Leitwert von  $5,76 \cdot 10^{-10} \pm 7,14 \cdot 10^{-11} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  bestimmt. Diese beiden Werte sind nicht signifikant voneinander

verschieden. Dies spricht gegen eine Infiltration der Stomata mit der Donorlösung, da sich die Werte für astomatäre und stomatäre Blattseite sonst unterscheiden müssten. Diese Resultate zeigen auch, dass die Permeabilität beim intakten Blatt von *P. laurocerasus* an Ober- und Unterseite nicht unterschiedlich ist.

Es konnte gezeigt werden, dass sich Ergebnisse, die mit isolierten Kutikularmembranen oder mit intakten Blättern erlangt wurden, nicht voneinander unterscheiden (Kirsch *et al.*, 2007). Um also weitere Spezies mit *A. thaliana* vergleichen zu können, wurden auch isolierte Kutikularmembranen von *P. laurocerasus* (Blatt, adaxiale Seite), *C. aurantium* (Blatt, adaxiale Seite), *H. helix* (Blatt, adaxiale Seite) und *C. annuum* (Frucht) gemessen (siehe auch 4.1.6.). Der Leitwert für *P. laurocerasus* betrug  $1,4 \cdot 10^{-10} \pm 1,0 \cdot 10^{-10} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ . Im Vergleich mit der Permeabilität für die intakte astomatäre Blattoberseite von *P. laurocerasus* fällt auf, dass der hier berechnete Leitwert (ebenfalls für die adaxiale Seite) niedriger ausfällt. Für die Experimente mit intakten Blättern wurden frische Blätter aus dem Jahr 2010 genutzt, wohingegen die isolierten Kutikularmembranen im Jahr 2007 isoliert wurden. Es ist bekannt, dass sich Permeabilitäten einer Art bei isolierten Kutikularmembranen von verschiedenen Jahreszeiten und verschiedenen Jahren um einen Faktor 10 unterscheiden können (Schreiber und Schönherr, 2009). Die hier ermittelten Abweichungen sind auf die verschiedenen Erntejahre zurückzuführen. *A. thaliana* ist im Vergleich mit *P. laurocerasus* 66 (Blatt) bis 200 fach (isolierte Kutikula) durchlässiger.

Für die anderen Spezies konnte ein Leitwert von  $1,6 \cdot 10^{-9} \pm 2,7 \cdot 10^{-10} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  (für *C. aurantium*) und  $8,3 \cdot 10^{-10} \pm 1,5 \cdot 10^{-9} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  (für *H. helix*) berechnet werden. Die Leitwerte für *P. laurocerasus* und für *H. helix* liegen wie erwartet in dem Bereich  $10^{-10} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ . In dieser Größenordnung bewegen sich die gemessenen Permeabilitäten in der Regel auch für andere Substanzen (Schreiber und Schönherr, 2009). Der Wert für *C. aurantium* liegt mit  $10^{-9} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  ein wenig höher als durch vergleichende Literaturwerte erwartet.

Die vierte Spezies, die mit  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol getestet wurde ist die Fruchtkutikula von *C. annuum*. Obwohl diese Kutikula die größte Masse pro Fläche der hier ausgewählten Kutikularmembranen besitzt (*P. laurocerasus*  $333 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ , *C. aurantium*  $369 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ , *H. helix*  $337 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  und *C. annuum*  $2162 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ; Schreiber und Schönherr, 2009), ist bekannt, dass sie extrem durchlässig ist (Becker *et al.*, 1986). Der Leitwert für  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol für *C. annuum* wurde mit  $5,5 \cdot 10^{-8}$

$\pm 3,3 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  errechnet. Dies ist ein sehr hoher Wert im Vergleich mit den Werten für die isolierten Kutikularmembranen der anderen Spezies. Allerdings muss dieser Wert mit Vorsicht behandelt werden, da in diesem Experiment die Donorkonzentration stark abnahm. Für die Berechnung eines Leitwertes muss diese allerdings konstant bleiben, da sich sonst die treibende Kraft während des Experimentes ändert (siehe 2.1.3.). Zusätzlich wurde hier ein großer Teil der Radioaktivität (31 % der Anfangsdonorkonzentration ( $\pm 9 \%$ , Sa)) in der Kutikula wieder gefunden. Dieser Wert war für die anderen Spezies deutlich niedriger (*P. laurocerasus* 8 % ( $\pm 4 \%$ , Sa) *C. aurantium* 6 % ( $\pm 4 \%$ , Sa); *H. helix* 9 % ( $\pm 4 \%$ , Sa)). Die Kutikula von *C. annuum* müsste zunächst mit dem gemessenen Stoff äquilibriert werden, so dass die Kutikula mit der radioaktiven Substanz gesättigt ist und der zugegebene Donor konstant bleibt. Eine Näherung kann durch die Berechnung mit der Donorkonzentration nach dem Experiment erreicht werden, wie das für den hier angegebenen Leitwert durchgeführt wurde.

Die Kutikula von *A. thaliana* ist nur 20 bis 30 nm dick (Franke *et al.*, 2005), was im Vergleich mit den anderen bisher in Transportexperimenten untersuchten Kutikularmembranen deutlich dünner (Schreiber und Schönherr, 2009) ist. Zusätzlich ist die Menge an kutikulärem Wachs ( $1,6 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ; Jenks *et al.*, 1996) 10 bis 100 fach weniger im Vergleich mit anderen Spezies (11,8 bei *C. aurantium* bis  $381 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  bei *Nerium oleander*; Schreiber und Riederer, 1996a). Außerdem besitzt *A. thaliana* Stomata und Trichome auf der Blattoberfläche, die bei anderen Arten als Stellen hoher Permeabilität und geringer Größenselektivität für polare Substanzen nachgewiesen wurden (Schlegel *et al.*, 2005; Schönherr, 2006). In den bisher durchgeführten Studien mit isolierten Kutikularmembranen wurden in der Regel adaxiale Blattseiten ohne Stomata und Trichome gewählt. Diese Heterogenität der kutikulären Struktur wurde in den bisher durchgeführten Studien vernachlässigt. Die bisher getroffene Auswahl führt daher zu einer ganz charakteristischen Auswahl an Kutikularmembranen für die Transportexperimente, die nicht unbedingt repräsentativ für die breite Variation in Kutikularmembranen sind. Die Kutikula von *A. thaliana* ist sehr durchlässig und zeigt auf, wie weit das Spektrum an Permeabilitäten variieren kann.

Für isolierte Kutikularmembranen von anderen Spezies konnte bereits in der Vergangenheit gezeigt werden, dass sich Lipophilität der Substanz, oft als

Kutikula/Wasser Verteilungskoeffizient  $K_{cw}$  angegeben, und die Molekülgröße, als Molarvolumen  $V_x$  angegeben, auf die Permeabilität auswirken (Schreiber und Schönherr, 2009). Daher war es von großem Interesse dieses Modell auch für *A. thaliana* zu überprüfen. Es konnte gezeigt werden, dass deren Kutikula eine sehr geringe Diskriminierung für alle getesteten Moleküle in Bezug auf Größe und Lipophilie zeigte (De Oliveira, 2009).

Mit dieser außergewöhnlich durchlässigen Kutikula müssen auch weitere Punkte verifiziert werden. Für die Donorlösung/Kutikula-Berührungsschicht (ungerührte Schicht; *unstirred layer*; Nobel, 2009) muss bestimmt werden, ob die Diffusion durch die Kutikula langsamer als Diffusion durch die ungerührte Schicht abläuft. Dies ist in der Regel der Fall (Schönherr and Riederer, 1989). Der Leitwert ( $P$ ) für Epoxiconazol in der ungerührten Schicht kann mit der Formel 4.1. bestimmt werden.

$$P = \frac{D}{\Delta x} \quad (\text{Formel 4.1.})$$

$D$  [ $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ] ist der Diffusionskoeffizient des radioaktiv markierten Moleküls während  $\Delta x$  [m] die Dicke der ungerührten Schicht zwischen Kutikula und umgebendem Medium darstellt. Eine Dicke der ungerührten Schicht von 100  $\mu\text{m}$  (Nobel, 2009) und ein Diffusionskoeffizient von  $10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  in Wasser (Cussler, 1984) sind eine sinnvolle Annahme. Mit Formel 4.1. kommt man auf eine Permeabilität von  $10^{-6} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ . Dies ist im Vergleich zur gemessenen Permeabilität der Kutikula 10-fach schneller. Dies ist wichtig, da sonst der gemessene Leitwert eine Mischung aus der Permeation durch die ungerührte Schicht und der Permeation über die Kutikula wäre.

Für die Bestimmung der Leitwerte in *steady state* Experimenten ist es wichtig, dass die treibende Kraft durch die externe Donorkonzentration gegeben ist. Dies bedeutet, dass lineare Kinetiken nur erwartet werden können, wenn die Menge an aufgenommener Substanz im Vergleich zur externen Donorkonzentration minimal ist. Die wässrige Phase einer Blattscheibe von *A. thaliana* mit einem Durchmesser von 5 mm hat ein Volumen von  $4,2 \cdot 10^{-9} \text{ m}^3$  (Strand *et al.*, 1999). Wird die hier verwendete Donorkonzentration von  $2 \cdot 10^{11} \text{ dpm} \cdot \text{m}^{-3}$  eingesetzt, kann eine maximale Kapazität von 840 dpm pro Blattscheibe berechnet werden. Dies gilt allerdings nur für die wässrige Phase der Blattscheibe. Durch den lipophilen Charakter von  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol wird dieses Molekül allerdings auch in der Lipidphase des Blattes aufgenommen (bis 0,5 % des Frischgewichts; Branen *et al.*, 2003). So kann deutlich

mehr  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol aufgenommen werden, als dies von der Berechnung der Kapazität der wässrigen Phase zu erwarten wäre. Es sollten allerdings keine Experimente mit deutlich längeren Aufnahmezeiten durchgeführt werden, da dann eine Abnahme der treibenden Kraft erfolgt. Solange die Aufnahmeexperimente eine lineare Kinetik zeigen können diese Experimente durchgeführt werden.

#### 4.1.3. Desorption

Die überraschend hohen Permeabilitäten wurden durch Desorptionsexperimente (Abb. 3.2.) und die Kompartiment-Analyse (Tab. 3.1.) bestätigt. Das komplette  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol, das in die Blätter aufgenommen wurde, konnte innerhalb von zwei Stunden auch wieder ausgewaschen werden.

Die Kompartiment-Analyse wurde unter zwei Annahmen ausgewertet. Nach der Beladung der Blätter wurden diese für eine Sekunde in Wasser getaucht, um die verbleibenden Donor von der Oberfläche abzuwaschen. Der Ausdruck Oberflächenradioaktivität bezieht sich in dieser Arbeit auf die Donorreste. Epoconazol, das durch seinen lipophilen Charakter an der Oberfläche haftet, ist in diesem Ausdruck nicht eingeschlossen. Die Kompartiment-Analyse wurde nun unter Einbeziehung und unter Ausschluss der Oberflächenradioaktivität ausgewertet.

In der hier vorliegenden Arbeit ergab die Kompartiment-Analyse für beide Annahmen zwei Kompartimente. Die Kompartimente werden in einer Zahl zwischen 0 und 1 angegeben und geben Aufschluss darüber, wie viel von der Gesamtradioaktivität in dem Kompartiment vorhanden ist. Mit zunehmender Beladungszeit der Blätter nahm bei beiden Berechnungen  $C_1$  ab und  $C_2$  zu. Diese Tendenz zeigt sich auch in den aus der Literatur bekannten Desorptionsexperimenten (Schreiber und Schönherr, 1992a; Schreiber und Schönherr, 1992b; Schreiber und Schönherr, 2009), bei denen dieser Effekt allerdings deutlich prägnanter zu erkennen ist. Diese Tendenz lässt sich dadurch erklären, dass mit mehr Zeit auch mehr  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol in das Blatt gelangt. So nehmen die absoluten und prozentualen Werte von  $C_2$  zu.  $C_1$  bleibt in Bezug auf die absoluten Werte konstant, nimmt aber prozentual ab. Es gab einen Unterschied zwischen den Experimenten mit Einbeziehung und unter Ausschluss der Oberflächenradioaktivität. Wird die Oberflächenradioaktivität miteinbezogen ist  $C_1$  unabhängig von der Beladungszeit größer als  $C_2$ , wird die Oberflächenradioaktivität

vernachlässigt ist diese Tendenz umgekehrt (Tab. 3.1.). Durch das Einbeziehen der Oberflächenradioaktivität verschiebt sich der größte prozentuale Anteil auf  $C_1$ .

Es gab einen großen Unterschied zu den bereits bekannten Desorptionsexperimenten. In diesen Experimenten, in denen mit Blättern und Nadeln gearbeitet wurde, verblieb ein Teil der Radioaktivität im Blatt und formte so ein drittes Kompartiment ( $C_3$ ). In *A. thaliana* konnte hingegen fast alle Radioaktivität wieder aus dem Blatt ausgewaschen werden. Dies liegt zum Teil an der durchlässigen Kutikula von *A. thaliana*, welche hier kaum als Barriere fungiert, aber auch an Epoxiconazol. Dieses Molekül bleibt in der Zelle unprotoniert und wird so nicht per *Ion-Trap*-Mechanismus im Blatt gehalten, wie das aus der Literatur bekannte PCP.

$$t_{1/2} = \ln 0,5 \cdot k^{-1} \quad \text{Formel 4.2.}$$

Die Geschwindigkeitskonstante  $k$  ist mit der Halbwertszeit verknüpft (Formel 4.2.) und  $k_1$  ist in der Regel deutlich größer als  $k_2$  (Schreiber und Schönherr, 2009), was auch mit *A. thaliana* gezeigt werden konnte. Zwischen den Experimenten mit Einbeziehung und unter Ausschluss der Oberflächenradioaktivität gibt es eine Änderung bei  $k_1$ , wohingegen  $k_2$  immer gleich bleibt (Tab. 3.1.). Die Betrachtung der Halbwertszeiten verdeutlicht dies. Für  $k_2$  gibt es bei beiden Auswertungsformen eine Halbwertszeit von 1386 s. Für  $k_1$  unterscheiden sich die Halbwertszeiten bei den beiden Auswertungsformen. Wird die Oberflächenradioaktivität mit einbezogen ist  $t_{1/2} = 0,72$  s, wird diese Oberflächenradioaktivität ausgeschlossen ist  $t_{1/2} = 27$  s. Die Geschwindigkeitskonstanten sind unabhängig von der Beladungszeit der Blätter (Schreiber und Schönherr, 2009), was auch für *A. thaliana* gezeigt werden konnte.

#### 4.1.4. Verlust von $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol

Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass Substanzen nach der Aufnahme im lebenden Blatt metabolisiert werden können. Dies wäre zunächst nicht weiter schlimm, solange die Radioaktivität im Blatt verbleibt. Entstände allerdings  $^{14}\text{CO}_2$  wäre dies ein Problem, da dieses entweichen und so die Messdaten verfälschen würde. Dies wurde in einem Experiment untersucht, in dem ein intaktes Blatt und einzelne Blattscheiben auf das Entweichen von  $^{14}\text{CO}_2$  getestet wurden. Hierfür wurde

das Blattgewebe in einer Donorlösung mit  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol inkubiert und die eventuell austretende Radioaktivität durch eine KOH-Lösung aufgefangen. Durch die Reaktion von KOH mit  $^{14}\text{CO}_2$  zu  $\text{K}_2^{14}\text{CO}_3$  und  $\text{H}_2\text{O}$  kann die Radioaktivität in der KOH Lösung nachgewiesen werden. Hierfür muss allerdings auch beachtet werden, dass KOH durch das natürlich vorkommende  $^{40}\text{KOH}$  selbst radioaktiv ist. So wurde diese Lösung vor dem Experiment gemessen, um so die Hintergrundradioaktivität zu bestimmen.

Das Ergebnis zeigt deutlich (Tab. 3.2.), dass keine Radioaktivität in der KOH-Lösung nachgewiesen werden konnte. Der Großteil der Radioaktivität verblieb in der Donorlösung und ein kleiner Teil wurde in das Blattmaterial aufgenommen. So kann ein Metabolismus mit Verlust von  $^{14}\text{CO}_2$  ausgeschlossen werden.

Die Möglichkeit, dass Bakterien auf der Oberfläche des Blattes  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol aufnehmen und dieses dadurch nicht in das Blatt gelangt, muss ebenfalls ausgeschlossen werden. Dieses Problem entsteht hauptsächlich bei Blättern, die im Freiland gewachsen sind. *A. thaliana* wurde im Gewächshaus angezogen und die Abwesenheit von Bakterien und Pilzen konnte durch den Abdruck auf LB-Medium nachgewiesen werden. Als Kontrolle für epiphyllen Bewuchs wurde ein Blatt von *H. helix* verwendet, welches einen starken Befall mit Bakterien und Pilzen zeigte (Abb. 3.3.).

#### 4.1.5. Infiltration

Eine Infiltration der Stomata mit  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol muss bei den Aufnahmeexperimenten über die Kutikula vermieden werden, da diese sonst zu einer starken Verfälschung der Daten führen würde. Dies kann durch eine hohe Oberflächenspannung des angebotenen Mediums ausgeschlossen werden. Es konnte mit Blättern von *Zebrina purpusii* gezeigt werden, dass keine Infiltration der Stomata erfolgt, wenn die Oberflächenspannung größer als  $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  (Schönherr und Bukovac, 1972; Schreiber and Schönherr, 2009) beträgt. Die Oberflächenspannung für destilliertes Wasser beträgt  $72 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  und die für Ethanol  $21,4 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ . An diesen Daten kann erkannt werden, dass Aufnahmeexperimente, die in destilliertem Wasser durchgeführt werden, unproblematisch sind. Die

Ergebnisse des für *A. thaliana* häufig verwendeten *Chlorophyll Leachings* mit Ethanol sind allerdings im Hinblick auf diese Werte nicht unproblematisch. Es muss nicht befürchtet werden, dass eine Infiltration der Stomata in dem hier entwickelten Permeationsassay unbemerkt bleiben würde. Erfolgt eine Infiltration sind dunkle Flecken auf dem Blatt zu erkennen, die durch eine Änderung des Lichtbrechungsindex entstehen, wenn die Interzellularen mit Wasser gefüllt werden. Die Infiltration mit der Donorlösung kann in einem Experiment gezeigt werden, in dem eine kleine Menge Silwet L-77 bei einem Aufnahmeexperiment (Abb. 3.4.) zu der Donorlösung hinzugegeben wird. Silwet L-77 ist ein Tensid, welches die Oberflächenspannung auf unter  $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  herabsetzt und so für eine sofortige Infiltration der Stomata sorgt. Wie erwartet zeigte sich in den ersten Sekunden eine spontane Infiltration, die durch die Entstehung immer größer werdender dunkler Flecken zu beobachten war. So war auch schon nach 5 min ein Maximum an Aufnahmeleistung erreicht und die aufgenommene Menge  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol änderte sich auch nicht bei den Blättern, die nach 10 und 15 min aus der Donorlösung entfernt wurden.

#### 4.1.6. Permeabilität von Wasser

Wasserverlust ist für Pflanzen generell und besonders in ariden Klimazonen ein großes Problem, so dass Daten für Wasserpermeabilität von verschiedenen Spezies von großem Interesse sind. Pflanzen mit einer undurchlässigeren Kutikula zu entwickeln könnte die Möglichkeit eröffnen, trockenolerante Pflanzen in ariden Gebieten anzupflanzen. Dies wäre sowohl für die globale Nahrungsmittelversorgung als auch für die Aufforstung von Wäldern in trockenen Gebieten, die für das Klima wichtig sind, ein Lösungsansatz.

Um Aussagen über die Wasserpermeabilität von *A. thaliana* zu treffen, muss ein experimenteller Umweg gegangen werden. Aufnahmeexperimente mit radioaktivem  $^3\text{H}_2\text{O}$  sind aufgrund der Stomata an intakten Blättern nicht möglich, da Wassermoleküle als Gas durch die Stomata in das Blatt gelangen würden. Dies würde die Messergebnisse stark verfälschen. Auch die Möglichkeit mit (in der Dunkelheit) geschlossenen Stomata zu arbeiten wäre keine Lösung, da auch nur

einzelne geöffnete Stomata nicht ausgeschlossen werden können und zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen würden.

In der Vergangenheit wurde bereits gezeigt, dass man die Aufnahmeraten von Wasser durchaus mit den Aufnahmeraten von organischen Verbindungen korrelieren kann (Niederl *et al.*, 1998; Kirsch, 1996). Durch Experimente, in denen der Zusammenhang zwischen der Permeabilität für Epoxiconazol und Wasser für verschiedene Spezies bestimmt wurde und die Aufnahmeexperimente für Epoxiconazol und *A. thaliana* konnten Vorhersagen für die Wasserpermeabilität für *A. thaliana* getroffen werden.

Für diese Co-Permeationsexperimente wurden astomatäre Kutikularmembranen gewählt, da diese Aufnahmeexperimente mit Wasser zulassen. So wurden für beide Substanzen und verschiedene Spezies die Leitwerte und deren Korrelation miteinander bestimmt. Die Wahl fiel auf isolierte Kutikularmembranen der Blattoberseite von *P. laurocerasus*, *C. aurantium*, *H. helix* und der Fruchtkutikula von *C. annuum*, da mit diesen isolierten Kutikularmembranen bereits häufig gearbeitet wurde und so auch Vergleichswerte für Wasser vorliegen. Außerdem wird hier mit Kutikularmembranen verschiedener Massen gearbeitet, welche für *P. laurocerasus*  $333 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , für *C. aurantium*  $369 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , für *H. helix*  $337 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  und für *C. annuum*  $2162 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  betragen (Schreiber und Riederer, 1996a und b; Schreiber und Schönherr, 2009). Die Wachsmengen dieser Kutikularmembranen sind sehr unterschiedlich, diese betragen für *P. laurocerasus*  $83 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , für *C. aurantium*  $32 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , für *H. helix*  $114 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  und für *C. annuum*  $96 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  (Schreiber und Riederer, 1996a und b; Schreiber und Schönherr, 2009). Die Massen der Kutikularmembranen und ihre Wachsbelegung sind nicht miteinander korreliert.

Das Experiment wurde für *P. laurocerasus* mit neun Kutikularmembranen durchgeführt, wobei ein Leitwert von  $1,4\cdot 10^{-10} \pm 1,0\cdot 10^{-10} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  für  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol und  $5,0\cdot 10^{-10} \pm 3,0\cdot 10^{-10} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  für  $^3\text{H}_2\text{O}$  bestimmt werden konnte. Der hier ermittelte Leitwert von Wasser entspricht auch dem in der Literatur bestimmten Leitwert von  $5,1$  bis  $9,5\cdot 10^{-10} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ , der in den bisher ausgeführten Co-Permeationsexperimenten ermittelt werden konnte (Niederl *et al.*, 1998). Es konnte erfolgreich eine Korrelation der Leitwerte für die neun Kutikularmembranen durchgeführt werden und eine Formel für die Beziehung zwischen der Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -Epoxiconazol und  $^3\text{H}_2\text{O}$  bestimmt werden (Formel 3.1.).

Für *C. aurantium* wurde ebenfalls ein Aufnahmeexperiment für  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol und  $^3\text{H}$ -Wasser durchgeführt (Abb. 3.7.A). Die Leitwerte betragen  $1,6 \cdot 10^{-9} \pm 2,7 \cdot 10^{-10} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  für  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol und  $3,9 \cdot 10^{-9} \pm 8,0 \cdot 10^{-10} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  für  $^3\text{H}_2\text{O}$ . Die Permeationsdaten für Wasser sind deutlich höher als die in der Literatur angegebenen  $1,28 \cdot 10^{-10} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  (Schreiber und Schönherr, 2009; Schreiber und Riederer, 1996a), allerdings wurde in der Literatur die Permeabilität durch die gravimetrische Methode bestimmt, bei der eine andere Luftfeuchtigkeit (2 %) herrscht. Durch das multiplizieren mit dem Faktor 3,2 kann der Leitwert (aus der Literatur) für *C. aurantium* auf die Luftfeuchtigkeit von 100 % umgerechnet werden (Schreiber *et al.*, 2001). Der so errechnete Leitwert ist noch immer niedriger als der in der vorliegenden Arbeit berechnete Leitwert. Trotz allem kommt er diesem Wert schon recht nahe, so dass die bestehende Abweichung durch die verschiedenen Erntejahre der Kutikularmembranen erklärt werden kann. Die hier verwendeten Kutikularmembranen waren bereits in vorherigen Experimenten sehr durchlässig (L. Schreiber, pers. Kommunikation). Um eventuelle Fissuren auszuschließen, wurde ein Ethanol-Test durchgeführt. In diesem Test wird ein Tropfen Ethanol auf die physiologische Außenseite der Kutikularmembran aufgetragen. Ist in der Kutikula eine Fissur, gelangt das Ethanol auf die physiologische Innenseite der Kutikula, die deutlich benetzbarer ist und sich dunkel verfärbt. Die hier verwendeten Kutikularmembranen zeigten alle keine Fissuren. Die einzelnen Leitwerte aller elf Kutikularmembranen von *C. aurantium* für  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol und  $^3\text{H}_2\text{O}$  ergaben eine gute Korrelation (Abb. 3.7.). Die Formel 3.2. gibt die Beziehung zwischen den Leitwerten für  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol und  $^3\text{H}_2\text{O}$  wieder.

Für *H. helix* wurde auch ein Aufnahmeexperiment durchgeführt. In diesen Experimenten war eine so genannte Anlaufphase zu erkennen, in der zunächst kaum Radioaktivität durch die Kutikula permeiert, aber nach 24 h nahm die gemessene Radioaktivität zu. Die Leitwerte (die mit der Steigung nach 24 h berechnet wurden) betragen  $8,3 \cdot 10^{-10} \pm 1,5 \cdot 10^{-9} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  für  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol und  $5,6 \cdot 10^{-10} \pm 1,1 \cdot 10^{-9} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  für  $^3\text{H}_2\text{O}$ . In der Literatur wurde ein Leitwert von  $1,3 \cdot 10^{-10} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  (Niederl *et al.*, 1998) bestimmt, der zwar niedriger ist, sich aber in der gleichen Größenordnung bewegt. Die einzelnen Leitwerte für  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol und  $^3\text{H}_2\text{O}$  aller elf Kutikularmembranen ergaben eine gute Korrelation. Deren Beziehung zueinander wird durch Formel 3.3. wiedergegeben. Die hohe Wachsmenge der isolierten Kutikularmembran von *H. helix* ( $114 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) könnte eine Erklärung für die leichte Anlaufphase liefern. Liegt diese

hohe Wachsmenge in optimaler Struktur vor, bildet diese Menge eine sehr undurchlässige Barriere. Dies scheint bei *H. helix* der Fall zu sein. Die Kutikula von *H. helix* gehört im Vergleich mit anderen Spezies zu den Spezies mit sehr undurchlässiger Barriere (Schreiber und Schönherr, 2009).

Für *C. annuum* konnte ein Aufnahmeexperiment durchgeführt werden, bei dem zwar die Kinetiken linear verliefen, der Donor allerdings um fast 80 % abnahm. Dieser muss für eine Leitwertberechnung allerdings konstant bleiben (2.1.3. und Formel 2.1.). So wurden die Leitwerte näherungsweise mit der Donorkonzentration nach dem Experiment berechnet und betragen  $5,5 \cdot 10^{-8} \pm 3,3 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  für  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol und  $8 \cdot 10^{-9} \pm 2,2 \cdot 10^{-9} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  für  $^3\text{H}_2\text{O}$ . Ein Großteil der Radioaktivität verblieb in der Kutikula ( $31 \% \pm 9 \%$ , Sa), was im Vergleich zu den anderen Spezies deutlich höher liegt (*P. laurocerasus* 8% ( $\pm 4\%$ , Sa) *C. aurantium* 6% ( $\pm 4\%$ , Sa); *H. helix* 9% ( $\pm 4\%$ , Sa)). Die Kutikula müsste vor einem Experiment äquilibriert werden. Da hier mit der Donorkonzentration nach dem Experiment gerechnet wurde, darf hier von einem relativ genau bestimmten Leitwert ausgegangen werden. In der Literatur wird ein Leitwert von  $1,35 \cdot 10^{-9} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  für Wasser angegeben (Schreiber und Riederer, 1996b). Da hier erneut die gravimetrische Methode genutzt wurde (und so eine andere Luftfeuchtigkeit), kommt es zu einer leichten Abweichung zu dem hier ermittelten Wert. In dem hier durchgeführten Experiment konnte allerdings keine deutliche Korrelation zwischen dem Leitwert für  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol und dem für  $^3\text{H}_2\text{O}$  erstellt werden, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol sich in der Kutikula von *C. annuum* anders verhält als  $^3\text{H}_2\text{O}$ . Diese Daten wurden in der Gesamtbetrachtung (Abb. 3.10.) der Co-Permeabilitäten vernachlässigt.

In dieser Gesamtbetrachtung, in der alle 31 Kutikularmembranen von *P. laurocerasus*, *C. aurantium* und *H. helix* miteinbezogen wurden, konnte eine hohe Korrelation der Leitwerte von  $^3\text{H}_2\text{O}$  und  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol gezeigt werden (Abb. 3.10.A und B). Die Formel 3.4. beschreibt diese Korrelation.

Da für drei Spezies die Leitwerte für  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol und  $^3\text{H}_2\text{O}$  korreliert werden konnten (Abb. 3.10.) kann angenommen werden, dass dies ebenfalls für *A. thaliana* gilt. Die so erstellte Korrelationsgleichung (Formel 3.4.) erlaubt eine Vorhersage für die Wasserpermeabilität von *A. thaliana*. Der errechnete Wert  $6,43 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  bezieht

sich auf Wasser in flüssiger Form als treibende Kraft. Wird dieser Wert noch mit dem Faktor 43384 multipliziert (Schreiber und Riederer 1996a) kann der Wert für Wasserdampf als treibende Kraft berechnet werden. Dies ergibt den Wert  $2,79 \cdot 10^{-3} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ . Alternativ dazu kann der für Benzoesäure errechnete Leitwert  $3,18 \cdot 10^{-8} \pm 1,11 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  (De Oliveira, 2009) in die in der Literatur erstellten Gleichung mit 12 Spezies (Niederl *et al.*, 1998) eingesetzt werden. So ergibt sich ein Wert von  $1,74 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  für flüssiges Wasser und  $7,55 \cdot 10^{-4} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  für Wasser bezogen auf die Gasphase. Diese zwei vorhergesagten Werte für Wasserpermeabilität (für Wasserdampf als treibende Kraft) für *A. thaliana*, die mit Epoxiconazol und Benzoesäure berechnet wurden, unterscheiden sich um den Faktor 4. Diese Werte können mit einem weiteren Experiment bestätigt werden. In diesem Experiment wurden Blätter über Silica-Gel bei 25 °C inkubiert und der Wasserverlust mit der Waage dokumentiert (Abb. 3.5.). Um einen vergleichbaren Wert zu erhalten muss noch durch die treibende Kraft  $\Delta c$ , in diesem Fall der Konzentrationsunterschied zwischen Wasser im und außerhalb des Blattes, geteilt werden. Die treibende Kraft  $\Delta c$  entspricht in diesem Fall der Wasserkonzentration im Blatt, da durch das Silica-Gel die Wasserkonzentration außen 0 % beträgt. Diese Wasserkonzentration in Blatt betrug bei 25 °C  $23,07 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$  (Nobel, 2009) und der so errechnete Leitwert ergab  $7,49 \cdot 10^{-4} \pm 6,41 \cdot 10^{-4} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ . Dieser Wert ist nur eine Annäherung, da für diese Berechnung mit reinem Wasser im Blatt gerechnet wurde. Die Aktivität des Wassers nimmt ab, sobald gelöste Stoffe vorkommen. Diese Abnahme der Aktivität kann mit Hilfe der Formeln 4.3. und 4.4. bestimmt werden. Mit Formel 4.3. kann der osmotische Druck ( $\Pi$ ) bestimmt werden. Zellen von jungen Blättern von Spinat oder Erbse beinhalten 0,3 mol osmotisch aktive Teilchen pro kg Wasser ( $\sum_j c_j = 300 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ ) (Noble, 2009).  $RT$  ( $R$  ist die Gaskonstante und  $T$  die Temperatur) bei 25 °C beträgt  $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3 \cdot \text{MPa} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

$$\Pi = RT \cdot \sum_j c_j \quad (\text{Formel 4.3.})$$

Mit der Formel 4.4. konnte die Aktivität des Wassers ( $a_w$ ) bestimmt werden. Das partielle molare Volumen von Wasser  $-V_w$  beträgt  $18 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ .

$$RT \ln a_w = -V_w \Pi \quad (\text{Formel 4.4.})$$

Mit Hilfe dieser Formeln konnte eine Wasseraktivität von 0,99 im Blatt im Vergleich zu 1 in reinem Wasser berechnet werden. Der um diesen Faktor korrigierte Leitwert betrug  $7,45 \cdot 10^{-4} \pm 6,37 \cdot 10^{-4} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  und war kaum unterschiedlich von dem Wert, der mit reinem Wasser berechnet wurde. So kann ohne Bedenken mit reinem Wasser gerechnet werden, um einen verlässlichen Leitwert zu erhalten. Dieser Leitwert unterscheidet sich kaum von dem Leitwert, der mit dem Co-Permeationsexperiment mit Benzoesäure bestimmt wurde.

Als weiterer Vergleichswert können Nachttranspirationsraten aus der Literatur (Hosy *et al.*, 2003) herangezogen werden. Es wurden Werte von  $0,01 \text{ g m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  und 50 % Luftfeuchtigkeit bestimmt. Hier kann ein Leitwert von  $1,2 \cdot 10^{-3} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  berechnet werden. Dieser Wert und der aus den in dieser Arbeit ausgeführten Austrocknungsexperimenten variieren um den Faktor 1,6.

Die Werte, die durch die Transpirationsdaten ermittelt wurden und die Werte, die durch Co-Permeationsexperimenten berechnet wurden waren höchstens um den Faktor 4 verschieden.

Die durch die Korrelationen der Co-Permeationsexperimente vorhergesagten Wasserpermeabilitätswerte für *A. thaliana* und die durch die Austrocknungsexperimente direkt bestimmten Leitwerte fallen alle in den gleichen Größenordnungsbereich, was darauf hinweist, dass die aus Co-Permeationsexperimenten vorhergesagten Werte für *A. thaliana* zutreffend sind.

#### **4.2. Messung der Permeabilität von Kutikula-Mutanten und chemische Analyse deren Wachs- und Kutinzusammensetzung**

Das Hauptziel neben der Etablierung eines neuen Permeationsassays war die Analyse der Zusammenhänge zwischen Permeabilität und chemischer Zusammensetzung der Kutikula. Hierfür wurden Mutanten von *A. thaliana* ausgewählt, die an verschiedenen Stellen des Kutikulaaufbaus einen Defekt aufweisen. Diese wurden auf ihre Permeabilität und auf die chemische Zusammensetzung der Kutikula untersucht. Die chemische Zusammensetzung einiger dieser Mutanten wurden bereits in verschiedenen Veröffentlichungen gezeigt, wobei diese Daten schwer miteinander zu vergleichen sind. Zum Teil wurde die Fläche, zum Teil das Trockengewicht als Bezugsgröße gewählt. Außerdem wurden

seltener Blätter, die für den Permeationsassay deutlich interessantere Daten liefern, sondern häufiger Sproßachsen untersucht, deren Wachszusammensetzung sich vom Blatt unterscheidet.

#### 4.2.1. Wildtypen

Als erstes wurden verschiedene Wildtypen auf Permeabilität und auf ihre chemische Zusammensetzung der Wachse untersucht (Abb. 3.12.). Obwohl sich die Wachszusammensetzungen der verschiedenen Wildtypen Col-8, Col-0, Ler und Ws nicht voneinander unterschied (Abb. 3.12.E), waren die Permeabilitäten sehr unterschiedlich. Werden die Wildtypen nach aufsteigender Permeabilität sortiert ergibt sich die Reihenfolge Col-0  $5,52 \cdot 10^{-9} \pm 9,85 \cdot 10^{-10} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ , Col-8  $2,79 \cdot 10^{-8} \pm 3,78 \cdot 10^{-9} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ , Ws  $1,39 \cdot 10^{-7} \pm 4,13 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  und Ler  $1,74 \cdot 10^{-7} \pm 5,92 \cdot 10^{-7} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Die Wildtypen haben unterschiedliche Herkunftsorte. Die Ler (*Landsberg erecta*) Linie wurde aus einer Landsberg-Population (La-1) isoliert, die aus Landsberg an der Warthe (Polen) stammt. Aus dieser Population wurde ebenfalls Columbia (Col-1) isoliert, aus der dann unter anderem Col-0 und Col-8 hervorgingen. Der Wildtyp Ws stammt aus dem Ort Vasilyevka in Weißrussland.

#### 4.2.2. Hohe Permeabilität und geringe Wachsbelegung bei *wax2*, *cer3* und *yre*

Zunächst gab es unterschiedliche Mutanten, die eine reduzierte Wachsbelegung im Vergleich zu ihrem korrespondierenden Wildtyp besitzen. Als erste Mutante wurde *wax2* (Allel *cer3-5*; Rowland *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2003) gewählt, die einen Defekt im Gen At5g57800 besitzt. Das entsprechende Protein hat eine unbekannt Funktion in der Wachssynthese. Die Mutanten *cer3* (Allel *cer3-4*) und *yre* (Allel *cer3-6*) besitzen einen Defekt in dem gleichen Gen.

In der durchgeführten Wachsanalyse konnte in allen drei Mutanten eine Reduktion der Wachsbelegung um ca. 80 % festgestellt werden (Abb. 3.13.B,C und Abb. 3.14.C bis F). Die Literaturwerte bestätigen dies (80 % in Chen *et al.*, 2003; 76 % in Rowland *et al.*, 2007; 83 % bis 86 % in Kurata *et al.*, 2003; 68 % in Jenks *et al.*, 1995).

Die größte Reduktion findet bei Aldehyden und Alkanen statt, die in den Analysen der Mutanten nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Die Säuren sind um 13 bis 36 % und die Alkohole um 78 bis 86 % reduziert. Chen *et al.*, 2003 (*wax2*) konnten eine Reduktion der Säuren um 41 %, der Aldehyde um 61 %, der Alkohole um 40% und der Alkane um 98 % nachweisen. Zusätzlich wurden in dieser Analyse auch Ester gefunden, deren Menge in der Mutante zunahm. Diese konnten in der vorliegenden Analyse und auch in anderen Analysen der Literatur (Jenks *et al.*, 1995) nicht nachgewiesen werden.

Die Kutinanalyse, die nur für die Mutante *wax2* durchgeführt wurde (Abb. 3.13.D und E), zeigte keine Veränderung in der Gesamtkutinmenge. Diese Werte werden durch die Kutinanalyse von *cer3* in der Literatur (Rowland *et al.*, 2007) gestützt.

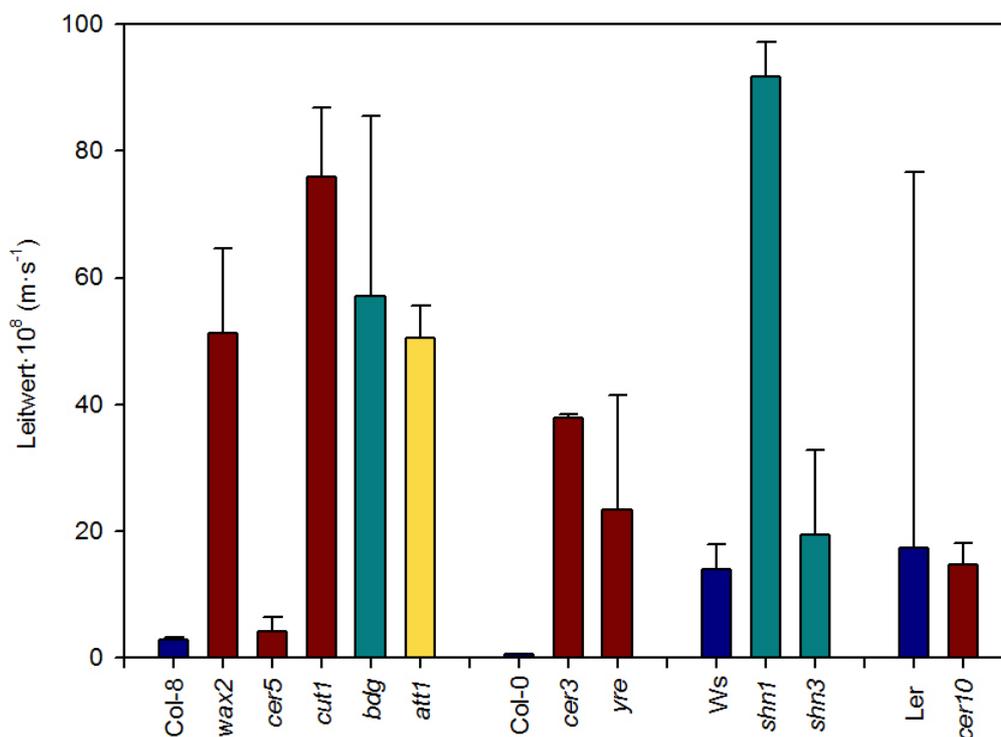


Abb. 4.1. **Leitwerte der untersuchten Mutanten.** Die Auftragung der Mutanten wurde nach ihren korrespondierenden Wildtypen vorgenommen. In dunkelblau sind die Wildtypen, in rot die Mutanten mit geringerer Wachsbelegung, in cyan die Mutanten mit erhöhter Wachsbelegung und in gelb die Mutante mit keiner Veränderung in der Wachsbelegung (im Vergleich mit den entsprechenden Wildtypen) dargestellt. Die errechneten Leitwerte wurden mit  $10^8$  multipliziert. Fehlerbalken zeigen Sa.

Die Mutanten *wax2*, *cer3* und *yre* wurden dem Permeationsassay (Abb. 3.13.A; 3.14.A und B) unterzogen. Die Mutanten zeigten eine deutlich höhere Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol im Vergleich zum Wildtyp. So waren die errechneten Leitwerte im Vergleich zu den Leitwerten der Wildtypen Col-8 und Col-0 (4.1.) deutlich erhöht.

Die Leitwerte betragen für die Mutanten *wax2*  $5,12 \cdot 10^{-7} \pm 1,34 \cdot 10^{-7} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ , *cer3*  $3,78 \cdot 10^{-7} \pm 7,22 \cdot 10^{-9} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  und *yre*  $2,34 \cdot 10^{-7} \pm 1,80 \cdot 10^{-7} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  (Abb. 4.1.). Die Permeabilität nahm um den Faktor 18 (*wax2*; in Bezug auf Col-8), 68 (*cer3*; in Bezug auf Col-0) und 42 (*yre*; in Bezug auf Col-0) zu.

Bei allen drei Mutanten fiel in den Diagrammen der Schnitt mit der y-Achse bei über 1000 dpm pro Blattscheibe auf (Abb. 3.13.A; 3.14.A und B). Dieses Verhalten zeigt sich in der Regel, wenn ein erstes Kompartiment sehr schnell beladen wird und anschließend erst die Permeation über die Kutikula beginnt. Dieses Kompartiment könnten die epikutikulären Wachse sein, aber es gibt auch die Möglichkeit, dass die veränderte Oberflächenstruktur der Blätter von *wax2* eine Ansammlung von  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol an der Oberfläche fördert. Erst anschließend findet die Permeation über die Kutikula statt.

In der Literatur wurden verschiedene Methoden der Permeabilitätsbestimmung von *wax2* herangezogen (Chen *et al.*, 2003). Die Mutante *wax2* zeigte eine stärkere Transpirationsrate im Vergleich zum Wildtyp in Licht und Dunkelheit. Da *wax2* mehr Stomata auf dem Blatt besitzt im Vergleich zum Wildtyp soll deren Einfluß auf die Transpirationsrate ausgeschlossen werden. So wurden die Untersuchungen sowohl in Licht, in dem Stomata für den Gasaustausch geöffnet sind, als auch in Dunkelheit, in der Stomata geschlossen sind, durchgeführt (Chen *et al.*, 2003). Die Mutante zeigte außerdem eine höhere Sensibilität für zwei Herbizide (Chen *et al.*, 2003). Die Kutikula von *wax2* wirkt in einer Transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahme dicker (Chen *et al.*, 2003), aber weniger dicht. Die daraus gezogene Schlussfolgerung (Chen *et al.*, 2003), dass es vielleicht weniger kristalline Zonen in der Kutikula der Mutante gibt, die als Verlängerung des Diffusionsweges wirken (Baur *et al.*, 1999), wird zu einem späteren Zeitpunkt erneut aufgegriffen.

Wird ein *Chlorophyll Leaching* (Chen *et al.*, 2003) durchgeführt, zeigt *wax2* einen schnelleren Verlust von Chlorophyll im Vergleich zu ihrem Wildtyp. Während der Wildtyp nach 50 min ungefähr 50 % des Chlorophylls verloren hat, hat die Mutante bereits 75 % verloren. Dies gibt leider keinen Aufschluss über einen eventuell abweichenden Chlorophyllgehalt zwischen Mutante und Wildtyp.

Die Mutanten *wax2* und *cer3* wurden auch in der hier vorliegenden Arbeit einem *Chlorophyll Leaching* (Abb. 3.24.A und B) unterzogen. Wie auch schon in den bereits veröffentlichten Daten, zeigt sich ein deutlich schnellerer Verlust von Chlorophyll in der Mutante, was für eine höhere Permeabilität sprechen würde. Allerdings müssen die Ergebnisse dieser Methode mit großer Vorsicht behandelt werden, da das Ethanol aufgrund seiner niedrigen Oberflächenspannung von 21,4 mN/m sehr schnell durch die Stomata das Blatt infiltriert (siehe 4.1.5.) und der Hauptteil des Chlorophyll-Auswaschens direkt durch die Stomata und nicht über die Kutikula geschieht. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass Ethanol nicht auch die Wachse auf der Kutikula während der recht langen Inkubationszeit anlost. Es ist auch wichtig, dass sich die Gesamtmenge von Chlorophyll in Mutante und Wildtyp nicht unterscheiden. Es konnte in einer neuen Arbeit gezeigt werden, dass sich der Chlorophyllgehalt von Col-8 und *wax2* nicht unterscheidet (Schroll, 2010), dies wurde aber in der Literatur in der Regel vernachlässigt.

Eine weitere häufig verwendete Methode ist die Färbung mit dem hydrophilen Farbstoff Toluidin Blau. In der vorliegenden Arbeit wurde *wax2* (Abb. 3.25.E bis H) und der korrespondierende Wildtyp Col-8 angefärbt (Abb. 3.25.A bis D). Schon nach kurzer Zeit waren einige Blätter von *wax2* mit dunklen Flecken gezeichnet, die nach längerer Zeit noch zunahmen. Col-8 zeigte nach kurzer Inkubationszeit keine Flecken und nach längerer Zeit nur kleine dunkle Punkte. Die Mutante *wax2* hat im Vergleich zum Wildtyp eine für den Farbstoff durchlässigere Kutikula. Diese Methode ist leicht und schnell anzuwenden, allerdings fehlt ihr der quantitative Charakter. Ein Vergleich der Methoden wird in 4.4. weiter behandelt.

#### **4.2.3. Leichte Veränderung in der Permeabilität und geringe Wachsbelegung bei *cer5***

Die durch eine RT-PCR (Abb. 3.15.) bestätigte *knockout*-Mutante *cer5* (nach Pighin *et al.*, 2004 heißt diese Linie *cer5-2*) besitzt einen Defekt in einem Gen für einen putativen ABC-Transporter, der für den Export der Wachsmomere aus den Epidermiszellen zuständig ist. Die Wachsbelegung dieser Mutante ist auf den Blättern um 46 % reduziert (Abb. 3.16.C). Dieses Ergebnis wird durch bereits publizierte Werte für die ursprünglich identifizierte Mutante *cer5-1* gestützt (Koorneef

*et al.*, 1989; Rashotte *et al.*, 2001). Die Reduktion im Gesamtwachs der Blätter beträgt dort 17 %, durch die hohe Standardabweichung sind diese Werte nicht unterschiedlich von den hier ermittelten Werten. Die Analyse der Sprossachsen zeigte dort eine Reduktion um 40 %. Pighin *et al.*, 2004 konnten ebenfalls eine starke Reduktion der Wachskomponenten in der Sprossachse feststellen (um ca. 65 %; *cer5-2*).

Die Alkane zeigten hier keine Änderungen zum Wildtyp, die Aldehyde waren um 61 % reduziert (nicht statistisch gestützt), die Säuren waren um 72 % und die Alkohole um 59 % reduziert (Abb. 3.16.C). In der Literatur (Rashotte *et al.*, 2001) wurde die größte Reduktion bei den Alkoholen ausgemacht (Reduktion um 55 %), die Säuren und Alkane wurden in gleicher Menge nachgewiesen und bei den Aldehyden war ein Anstieg zu erkennen (um 20 %). Sekundäre Alkohole, Ketone und Ester wurden auch in kleinen Mengen im Wildtyp gefunden und waren auch in den Mutanten in noch kleineren Mengen vorhanden. Diese Stoffklassen wurden in der Analyse der hier vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen.

In der Kutinzusammensetzung unterscheidet sich *cer5* nicht vom Wildtyp (Abb. 3.16.D und E). Auch wenn ein Unterschied in der Menge der  $\alpha$ - $\omega$ -Disäuren festgestellt werden konnte, wirkte er sich nicht auf die Gesamtmenge aus.

Bei der Bestimmung der Permeabilität konnte für *cer5* ein Leitwert von  $4,29 \cdot 10^{-8} \pm 2,12 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  berechnet werden (Abb. 4.1.). Dieser Leitwert unterschied sich nur um den Faktor 1,5 vom Leitwert des Wildtyps. Dieser Unterschied konnte allerdings als signifikant nachgewiesen werden.

Für diese Mutante wurde ein *Chlorophyll Leaching* durchgeführt (Abb. 3.24.C). Wildtyp und Mutante verhielten sich dabei nicht unterschiedlich voneinander. Auch hier besteht zwischen Col-8 und *cer5* kein Unterschied im Gesamtchlorophyllgehalt (Schroll, 2010).

Bei der Färbung mit Toluidin Blau verhielt sich *cer5* (Abb. 3.25.I bis L) ebenfalls genau wie der Wildtyp Col-8 (Abb. 3.25.A bis D). Beide waren nach 2 min nicht angefärbt und zeigten nach 10 min nur kleine blaue Punkte, hauptsächlich an der Unterseite des Blattes.

Die hier etablierte Permeationsmethode erlaubt offensichtlich die Detektion kleiner Unterschiede in der Permeabilität, die durch andere Methoden nicht erkannt werden können.

#### 4.2.4. Hohe Permeabilität und geringe Wachsbelegung bei *cut1*

Die durch eine RT-PCR (Abb. 3.17.) bestätigte *knockout*-Mutante *cut1* (*cer6*) besitzt einen Defekt in einem Gen, das für eine Elongase kodiert, die für die Verlängerung von C<sub>24</sub>-Säuren verantwortlich ist (Millar *et al.*, 1999).

Die Wachsanalyse der Blätter zeigte eine Reduktion der Wachse in der Mutante um 52 % (Abb. 3.18.C). Bei Jenks *et al.*, 1995 wurde ebenfalls eine Reduktion um 48 % in *cut1/cer6*-Blättern gezeigt. In den Sprossachsen wurde eine stärkere Reduktion im Vergleich zu den Blättern (um 81 – 94 %) nachgewiesen (Jenks *et al.*, 1995; Millar *et al.*, 1999).

Bei Betrachtung der Substanzklassen zeigte sich außer bei den Säuren, die um 16 % anstiegen, bei allen Substanzklassen eine Reduktion (Abb. 3.18.C). Die Aldehyde waren um 87 %, die Alkohole um 49 % und die Alkane um 59 % reduziert. Die Literaturdaten (Jenks *et al.*, 1995) bestätigen diese Ergebnisse weitgehend. Die Menge der Säuren steigt um 10 % an. Die Aldehyde sind zwar nur um 12 %, die Alkane aber um 60 %, und die Alkohole um 38 % reduziert. In der Analyse (Jenks *et al.*, 1995) wurden auch sekundäre Alkohole, Ketone und Ester nachgewiesen. Diese machen aber weniger als 2 % des Gesamtwachses im Blatt aus. In der vorliegenden Analyse konnten diese Substanzen nicht nachgewiesen werden.

Bei Betrachtung der Kettenlängenverteilung zeigte sich ein Anstieg der C<sub>24</sub>-Monomere um fast 500 % im Vergleich zum Wildtyp. Die C<sub>26</sub>-Bestandteile stiegen leicht an auf 135 % der Wildtypmenge (Signifikanzniveau  $p = 0,06$ , *t*-test). Alle Monomere  $\geq C_{28}$  sind reduziert (Tab. 3.3.). Diese Werte werden durch Literaturwerte gestützt (Millar *et al.*, 1999).

In der Kutinanalyse konnten keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtmenge zwischen Wildtyp und Mutante nachgewiesen werden (Abb. 3.18.E und G). Auch in der Kettenlängenverteilung konnten keine signifikanten Änderungen detektiert werden (Abb. 3.18.F). Dies bestätigt die Aussage, dass CUT1 eine wachsspezifische KCS ist.

Die Mutante zeigte eine deutlich höhere Aufnahme von <sup>14</sup>C-Epoxiconazol im Vergleich zum Wildtyp. Der berechnete Leitwert lag bei  $7,59 \cdot 10^{-7} \pm 1,10 \cdot 10^{-7} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  und war somit um den Faktor 27 höher als der Leitwert von Col-8 (Abb. 4.1.).

Bei der Aufnahmekinetik (Abb. 3.18.A.) konnte eine sogenannte Anlaufphase beobachtet werden, wie sie fallweise für isolierte Kutikularmembranen bekannt ist

und in der hier vorliegenden Arbeit auch für *H. helix* (Abb. 3.8.A) gezeigt werden konnte. Warum es im Fall von *cut1* dazu kommt, kann mit den vorliegenden Daten nicht beantwortet werden. Die Struktur der Kutikula von *cut1* scheint zunächst die Anlagerung von Epoxiconazol zu fördern, bevor dann die Permeation durch die Kutikula stattfindet.

Für die Mutante wurde ebenfalls ein *Chlorophyll Leaching* durchgeführt (Abb. 3.24.D). Dieses zeigte den deutlich schnelleren Verlust von Chlorophyll in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Diese Tendenz entspricht den Ergebnissen des Permeationsassays.

#### **4.2.5. Leichte Veränderung in der Permeabilität und leichte Reduktion der Wachsbelegung bei *cer10***

Die Mutante *cer10* besitzt einen Defekt in dem Gen At3g55360, das für eine ECR kodiert (Zheng *et al.*, 2005).

Bei der Wachsanalyse der Blätter zeigte sich eine Reduktion der Wachsbelegung im Vergleich zum Wildtyp Ler um 26 % (Abb. 3.19.C). In der Literatur wurde ebenfalls eine Reduktion der Wachse von 19% auf den Blättern festgestellt (Rashotte *et al.*, 2001). Dieser Wert ist durch die Fehlerbereiche nicht unterschiedlich von dem hier bestimmten Wert. Literaturwerte zeigten auch eine Reduktion der Wachsbelegung der Stängel um 60 % (Bezugsgröße ist hier Trockengewicht; Zheng *et al.*, 2005) bzw. 65 % (Rashotte *et al.*, 2001).

Alle Substanzklassen waren leicht reduziert (Abb. 3.19.C). Die Reduktion der Säuren um 34 % und die der Alkane um 8 % waren statistisch nicht gestützt. Die Aldehyde waren um 19 % und die Alkohole um 33 % signifikant reduziert (Abb. 3.19.C). In der Literatur (Rashotte *et al.*, 2001) zeigte sich eine Reduktion um 9 % bei den Säuren und um 31 % bei den Alkanen, ein Anstieg von 10 % bei den Aldehyden und um 14 % bei den Alkoholen. Die in dieser Analyse auch nachgewiesenen sekundären Alkohole, Ketone und Ester machten 7 % vom Gesamtwachs aus. In der hier vorliegenden Analyse konnten diese Substanzen nicht nachgewiesen werden.

In der Kutinanalyse konnten keine Unterschiede in der Gesamtmenge zwischen Mutante und Wildtyp ermittelt werden (Abb. 3.19.D und E). Der einzige Unterschied ist in den Säuren (insbesondere der C<sub>16</sub>-Säure) zu erkennen. Dies wirkt sich jedoch

nicht auf die Gesamtmenge aus. In der Literatur (Faust, 2006) wurde eine Änderung im Kutin gefunden, die hauptsächlich auf einer starken Reduktion der C<sub>24</sub>-2-Hydroxysäure bestand. Dies konnte in der vorliegenden Analyse nicht nachgewiesen werden. Da die Beteiligung der 2-Hydroxysäuren am Kutinaufbau noch diskutiert wird (Franke *et al.*, 2005; Pollard *et al.*, 2008), ist dieser Unterschied zu vernachlässigen.

Mit Hilfe des Permeationsassay (Abb. 3.19.A) konnte ein Leitwert für *cer10* von  $1,48 \cdot 10^{-7} \pm 3,33 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  berechnet werden (Abb. 4.1.). Dieser Leitwert unterschied sich nur geringfügig um den Faktor 1,2 vom Leitwert des korrespondierenden Wildtypen Ler. Dieser Unterschied war signifikant.

#### 4.2.6. Hohe Permeabilität, höhere Wachs- und Kutinmenge bei *shn1*

Die Mutante *shn1* verfügt über eine höhere Wachsbelegung als der Wildtyp Ws (Aharoni *et al.*, 2004). Die Wachsanalyse zeigte eine Erhöhung der Gesamtmenge in der Mutante auf 266 % der Wildtypmenge. Aharoni *et al.*, 2004 wiesen einen Anstieg auf 598 % in der *shn1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp nach. Dieser ist zwar prägnanter, aber die Tendenz ist auch hier gegeben.

Die Menge der Alkane stieg in der Mutante auf 578 % der Alkanmenge im Wildtyp. Die anderen Substanzklassen stiegen ebenfalls an (Säuren auf 160 %, Alkohole auf 126 % und Aldehyde auf 261 % der Wildtypmenge), deren Zunahme war aber nicht so prägnant wie der Effekt bei den Alkanen. Literaturdaten (Aharoni *et al.*, 2004) zeigten einen größeren Anstieg der Alkane um 904 %. In einer anderen Veröffentlichung (Broun *et al.*, 2004) wurde ebenfalls eine höhere Wachsmenge nachgewiesen. Hier betrug der Anstieg 108 % bis 194 %, wobei in dieser Analyse nicht die Fläche sondern das Gewicht als Bezugsgröße gewählt wurde.

In der chemischen Analyse von Kutin konnte eine deutliche Veränderung in der Mutante nachgewiesen werden. Die Kutinmenge war um 304 % in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Die Änderungen zeigten sich bei den  $\omega$ -Hydroxysäuren, den  $\alpha$ - $\omega$ -Disäuren und der C<sub>16-9/10-16</sub>-Hydroxysäure (Tab. 4.2.). Der Anteil am Gesamtkutin ist bei den  $\alpha$ - $\omega$ -Disäuren am größten (65 % in der Mutante), wobei die  $\omega$ -Hydroxysäuren (10 % in der Mutante) und die C<sub>16-9/10-16</sub>-Hydroxysäure (3 % in der Mutante) weniger vertreten sind. Die absoluten Anteile von

Alkoholen und 2-Hydroxysäuren bleiben in etwa gleich, wobei deren Anteil am Gesamtkutin durch den Anstieg der anderen Substanzen abnimmt. In der Literatur (Kannangara *et al.*, 2007) wird von einer Steigerung der  $\alpha$ - $\omega$ -Disäuren berichtet, jedoch keine Änderung in den  $\omega$ -Hydroxysäuren nachgewiesen. Diese zwei Substanzklassen sind die einzigen, auf die in dieser Veröffentlichung eingegangen wird, so dass Rückschlüsse auf die anderen Substanzklassen ausbleiben.

Die Permeabilität war in der *shn1*-Mutante deutlich höher als im Wildtyp Ws (Abb. 3.20.A). Der errechnete Leitwert lag bei  $9,17 \cdot 10^{-7} \pm 5,59 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  für *shn1* (Abb. 4.1.). Die Mutante zeigte eine Steigerung der Permeabilität um den Faktor 3 im Vergleich zum Wildtyp Ws.

Aharoni *et al.*, 2004 führten ein *Chlorophyll Leaching* durch, in dem die Mutante schneller Chlorophyll verlor als der Wildtyp. Nach 50 min konnten bei der Mutante ca. 14  $\mu\text{mol}$  Chlorophyll pro mg Frischgewicht und beim Wildtyp 3  $\mu\text{mol}$  Chlorophyll pro mg Frischgewicht nachgewiesen werden. Die Information über die Gesamtmenge Chlorophyll wird nicht angegeben, so dass keine prozentuale Angabe gemacht werden kann, um diese Daten mit dem *Chlorophyll Leaching* von *wax2* zu vergleichen. Nach diesen Daten würde die Permeabilität um den Faktor 5 ansteigen. Es wurde auch der Wasserverlust abgetrennter Blätter und Stängel dokumentiert (Aharoni *et al.*, 2004). Die Mutante verlor schneller Wasser um den Faktor 3 bis 7,5. In Experimenten, in denen komplette Pflanzen einem Trockenstressexperiment unterzogen wurden (Aharoni *et al.*, 2004), konnten die Mutanten sich komplett davon erholen, der Wildtyp schaffte dies nicht.

#### **4.2.7. Keine Veränderung in der Permeabilität und erhöhte Wachsbelegung bei *shn3***

Die Mutante *shn3* besitzt einen Defekt in dem Gen At5g25390. Diese Mutante ist ebenfalls eine Überexpressionsmutante für einen der drei Transkriptionsfaktoren aus der Veröffentlichung Aharoni *et al.*, 2004, wie auch *shn1*. Die Analyse zeigte einen Anstieg der Wachsmenge auf 126 % der Wildtypmenge. Die Alkane stiegen auf 179 %, die Säuren auf 166 % und die Aldehyde auf 153 % an. Die Menge der Alkohole fiel um 38 % im Vergleich zum Wildtyp. Dies weist auf eine Rolle von SHN3 im Decarbonylierungsweg hin.

Die chemische Analyse des Kutins zeigte keine Änderung in Bezug auf die Kutinmenge zwischen Wildtyp und Mutante. Die einzigen Substanzklassen, die signifikant verändert wurden, waren Säuren und  $\omega$ -Hydroxysäuren. Die Säuren nahmen um 17 % ab und die  $\omega$ -Hydroxysäuren um 434 % zu. Allerdings machen die  $\omega$ -Hydroxysäuren weiterhin nur einen kleinen Teil des Gesamtkutins aus (von 1 % im Wildtyp auf 3 % in der Mutante) (Tab. 4.2.).

Bei Bestimmung der Permeabilität konnte für die Mutante *shn3* ein Leitwert von  $1,95 \cdot 10^{-7} \pm 1,34 \cdot 10^{-7} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  bestimmt werden (Abb. 4.1.). Dieser Wert war statistisch nicht unterschiedlich vom Leitwert von Ws.

#### 4.2.8. Erhöhte Permeabilität und höhere Wachsbelegung bei *bdg*

Die Mutante *bdg* verfügt über Veränderungen in Kutin und Wachs (Kurdyokov *et al.*, 2006b). Die Wachsanalyse zeigte eine Zunahme der Wachsmenge in *bdg* auf 142 % (*t-test*,  $p = 0,06$ ). Nur bei den Alkanen fand ein signifikanter Anstieg auf 194 % der Wildtypmenge statt. Die Alkane haben in *bdg* einen Anteil von 29 % am Gesamtwachs (21 % im Wildtyp). Die Menge der Säuren, Aldehyde und Alkohole waren in Wildtyp und Mutante gleich.

In der Literatur (Kurdyokov *et al.*, 2006b) wurde ein Anstieg der Wachsmenge auf 350 % der Wildtypmenge nachgewiesen. Dies ist zwar höher als in der hier vorliegenden Arbeit, aber die Tendenz ist die gleiche. Alkane machen in der Analyse 76 % in *bdg* im Vergleich zu 46 % im WT aus. Auch hier ist die gleiche Tendenz zu erkennen, dass die Alkane einen größeren Anteil am Gesamtwachs einnehmen.

Die Kutinanalytik in der Literatur (Kurdyokov *et al.*, 2006b) gibt auch einen Anstieg der Menge der Einzelmonomere an. Dieser Anstieg ist 1,2 bis 3 fach und dies gilt auch für die einzelnen Komponenten. Der prozentuale Anteil der einzelnen Monomere bleibt überall gleich.

Die Permeabilität der *bdg*-Mutante ist höher als der korrespondierende Wildtyp. Der Leitwert betrug  $5,71 \cdot 10^{-7} \pm 2,84 \cdot 10^{-7} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  für *bdg* (Abb. 4.1.) und war um den Faktor 20 höher als der Leitwert des entsprechenden Wildtypen Col-8.

In einem *Chlorophyll Leaching* (Kurdyokov *et al.*, 2006b) konnte aus der Mutante mehr Chlorophyll ausgewaschen werden im Vergleich zum Wildtyp. Nach 50 min konnten im Wildtyp 8 % und in *bdg* 34 % des gesamten Chlorophylls im Ethanol

nachgewiesen werden. Außerdem konnten Blätter von *bdg* stärker mit Toluidin Blau gefärbt werden und zeigten Organfusionen (Kurdyokov *et al.*, 2006b).

TEM-Aufnahmen (Kurdyokov *et al.*, 2006b) konnten zeigen, dass die Kutikula in *bdg* deutlich weniger strukturiert ist im Vergleich mit dem Wildtyp. Es lösen sich elektronendichte und weniger dichte Bereiche ab, in denen außerdem freie Bereiche vorkommen.

#### 4.2.9. Hohe Permeabilität und geringe Kutinmenge bei *att1*

Die Mutante *att1* besitzt einen Defekt im Gen *CYP86A2*. Dieses Gen kodiert für eine  $P_{450}$ -Monooxygenase. In der Wachsanalytik zeigte sich kein Unterschied in Bezug auf die Menge zwischen Wildtyp und Mutante. Auch bei den Substanzklassen zeigte sich keine Änderung. Die Ausnahme bildeten die Säuren, die um 41 % signifikant erhöht waren im Vergleich zum Wildtyp. Dies wirkt sich aber nicht auf die Gesamtwachsmenge aus.

Die chemische Analyse des Kutins zeigte eine deutliche Änderung der Kutinmenge. Diese war um 29 % in der Mutante reduziert im Vergleich zum Wildtyp. Die größte Änderung zeigte sich in den  $\alpha$ - $\omega$ -Disäuren, die um 80 % reduziert sind. Die Mengen der  $\omega$ -Hydroxysäuren und der  $C_{16-9/10-16}$ -Hydroxysäure waren ebenfalls reduziert. Diese machen aber insgesamt nur 1 % des Gesamtkutins in der Mutante aus. Die Menge der Alkohole und Säuren war erhöht. In der Literatur wurde das Kutin von *att1* bereits veröffentlicht (Xiao *et al.*, 2004), es wurden nur wenige Substanzen identifiziert, so dass ein genauer Vergleich nicht möglich ist. In dieser Veröffentlichung wurde eine Reduktion der Kutinmenge um 68 % und der  $\alpha$ - $\omega$ -Disäuren um 72 % nachgewiesen.

Die Mutante zeigte im Permeationsassay eine deutlich höhere Aufnahme von  $^{14}C$ -Epoconazol. Der Leitwert war so auch mit  $5,05 \cdot 10^{-7} \pm 5,07 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  (Abb. 4.1.) entsprechend höher als der Leitwert von Col-8. Die Mutante ist um den Faktor 18 durchlässiger als der Wildtyp. Wie auch schon bei *wax2* ist bei *att1* ein Schnittpunkt mit der y-Achse bei einem Wert  $> 1000 \text{ dpm}$  zu erkennen, was auch hier für eine Beladung eines ersten Kompartimentes vor der Permeation über die Kutikula sprechen würde. Auch hier könnte es sich um eine andere Anordnung der epikutikulären Wachse handeln oder eine andere Oberflächenstruktur, die die

Anlagerung des Epoxiconazols fördert. Dies könnte auch ohne Veränderungen in der Wachsmenge und –zusammensetzung durch die Veränderungen im Kutin und die so allgemeinen Veränderungen der Kutikula ausgelöst werden.

Xiao *et al.*, 2004 führten Austrocknungsexperimente durch, in denen gezeigt werden konnte, dass Blätter der Mutante schneller austrocknen als die Blätter des Wildtyp. In Transpirationsexperimenten wurde in Licht und Dunkelheit eine zweifache Erhöhung des Wasserverlustes ermittelt (Xiao *et al.*, 2004). Mit Hilfe von einem TEM konnte die Struktur der Kutikula genauer betrachtet werden (Xiao *et al.*, 2004). Es war zu erkennen, dass *att1* eine weniger elektronendichte, dafür aber deutlich dickere Kutikula (ca. 200 nm) aufwies.

Auch für *att1* wurde in der vorliegenden Arbeit ein *Chlorophyll Leaching* durchgeführt (Abb. 3.24.E). In diesem verlor die Mutante genauso schnell Chlorophyll wie der Wildtyp. Dieses Ergebnis ist unterschiedlich zu dem Ergebnis des Permeationsassay. In diesem war ein deutlicher Unterschied in der Permeabilität der Mutante im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen (siehe 4.4.).

### 4.3. Transgene Linien, die das Gen *CYP703A2* exprimieren

Das Gen *CYP703A2* wurde in *A. thaliana* eingebracht und sollte für eine *in-chain* Hydroxylierung der Fettsäuren in Wachs oder Kutin sorgen. Die native Aufgabe dieses Gens liegt im Pollen (Morant *et al.*, 2007). *Knockout* Mutanten besaßen eine reduzierte Fertilität durch eine Arretierung der Pollenentwicklung (Morant *et al.*, 2007). In einem Hefeassay konnte die Funktion von *CYP703A2* als *in-chain* Hydroxylase erkannt werden (Morant *et al.*, 2007). In der hier vorliegenden Arbeit konnte *CYP703A2* erfolgreich kloniert werden unter Kontrolle des epidermisspezifischen Promotors<sub>CUT1</sub> und als zweites Konstrukt unter Kontrolle des konstitutiv exprimierenden Promotors<sub>35S</sub> (Vektorkarte Anhang Abb. 8.4. und 8.5.). Beide Konstrukte wurden erfolgreich in Pflanzen eingebracht, in denen ihre Expression durch RT-PCR gezeigt wurde (Abb. 3.26. und 3.28.). Allerdings konnte in der chemischen Analyse des Wachses und des Kutins in keiner transgenen Linie eine Veränderung gezeigt werden (Abb. 3.27. und 3.29.). Dies lässt zwei Deutungsmöglichkeiten zu. Zunächst besteht die Möglichkeit, dass *CYP703A2* keine der im Wachs und Kutin vorkommenden Fettsäuren oder deren Derivate

hydroxylieren kann. In dem in der Literatur (Morant *et al.*, 2007) durchgeführten Hefeassay wurde die Aktivität für kürzere Kettenlängen getestet. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass eine Aktivität von CYP703A2 im Blatt durch andere Enzyme inhibiert wird.

Da keine Veränderung von Wachs und Kutin gezeigt werden konnte, wurde auf den Permeationsassay verzichtet.

#### 4.4. Vergleich mit anderen Methoden

Der hier entwickelte Permeationsassay für intakte Blätter von *A. thaliana* bietet den großen Vorteil, dass er quantitative Ergebnisse liefert, die mit Literaturdaten verglichen werden können. Den bisher für Permeabilitätsbestimmungen von *A. thaliana* genutzten Methoden fehlt dieser Charakter.

Die Methode einzelne Organe der Pflanze, wie Blätter oder Stängel, austrocknen zu lassen, wird häufig genutzt. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte dies für den Wildtyp Col-8 durchgeführt werden. Der so berechnete Leitwert von  $7,45 \cdot 10^{-4} \pm 6,37 \cdot 10^{-4} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  konnte durch die Co-Permeationsexperimente vorhergesagten Leitwert für *A. thaliana* bestätigt werden. Die Ergebnisse müssen trotz allem mit großer Vorsicht behandelt werden, besonders bei Mutanten, deren Mutation auch einen Einfluss auf Stomata zeigt. Bei dieser Methode kann eine Veränderung der Stomata in den Mutanten zu einem größeren Effekt führen als Veränderungen in der Kutikula. Schließen z.B. die Stomata nicht mehr vollständig, kommt es zu einer vermeintlich hohen Permeabilität, wobei aber nur der Wasserverlust über die Stomata gemessen wird.

Häufige Verwendung findet das *Chlorophyll Leaching*. Diese Methode ist ebenfalls nicht unproblematisch, da das verwendete Ethanol aufgrund seiner niedrigen Oberflächenspannung sehr schnell in die Blätter infiltriert (siehe 4.1.5.). Dies kann auch mit bloßem Auge beobachtet werden. So besteht die Gefahr, dass das Auswaschen des Chlorophylls nicht an der Kutikula, sondern im Mesophyll geschieht. Dies würde dann keine Aussage über die Permeabilität der Kutikula liefern. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Wachse der Kutikula durch

das Lösungsmittel Ethanol angelöst werden. Dennoch entsprach das *Chlorophyll Leaching* vier der untersuchten Mutanten (*wax2*, *cer3*, *cut1* und *cer5*) in der Tendenz der Permeabilität, die mit dem Permeationsassay bestimmt wurde (Abb. 3.24.A bis D, Abb. 4.1.). Die Mutanten *wax2*, *cer3* und *cut1* sind hierbei deutlich permeabler und *cer5* zeigt keinen großen Unterschied zum Wildtyp. Die Mutante *att1* bildete hier eine Ausnahme (Abb. 3.24.E, Abb. 4.1.). Im Permeationsassay zeigte die Mutante eine hohe Durchlässigkeit, im *Chlorophyll Leaching* unterschied sie sich kaum vom Wildtyp. Der Unterschied zwischen dieser Mutante und den anderen findet sich in der Wachsbelegung. Diese Mutante zeigte keine Änderung in Wachsmenge oder -zusammensetzung im Vergleich zum Wildtyp. Auch *cer5*, die noch die geringste Veränderung in der Wachsbelegung von den vier anderen Mutanten besitzt, zeigte keine Veränderung in der Permeabilität im Vergleich zum Wildtyp. Es ist möglich, dass im *Chlorophyll Leaching* bei einer ausreichenden Wachsbelegung eine Infiltration des Ethanols nur über die Stomata vonstatten geht, so dass bei diesen Mutanten keine Veränderung in der Permeabilität im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen ist. Gibt es allerdings nur eine ganz geringe Wachsbelegung (wie bei *wax2*, *cer3* und *cut1*), kann das Ethanol auch ungehindert über die Kutikula in das Blatt gelangen. So käme es so auch zu einer erhöhten Auswaschrates im Vergleich mit den Mutanten *cer5* und *att1*.

Die Anfärbung mit Toluidin Blau ergibt ebenfalls keine quantitativen Daten. Die Anfärbung mit dem hydrophilen Farbstoff zeigt durch blaue Flecken an, wo die Kutikula defekt ist. Für die Mutanten *wax2* und *cer5*, die in dieser Arbeit auch mit Toluidin Blau behandelt wurden, war die Anfärbung eine Bestätigung der Daten aus dem Permeationsassay. Die Mutante *wax2* konnte deutlich schneller und stärker angefärbt werden als *cer5* und der Wildtyp Col-8.

Vor kurzem wurde eine weitere Methode entwickelt, durch die Permeabilitäten von Kutikula-Mutanten bestimmt werden können (Schroll, 2010). In dieser Arbeit wurde das Herbizid Metribuzin auf Blätter aufgetragen, welches durch die Kutikula in das Blatt eintritt und dann das Photosystem II hemmt. Die Abnahme der Photosyntheseaktivität und die so ansteigende Chlorophyllfluoreszenz kann dann als Marker für die Geschwindigkeit der Metribuzin-Permeation in das Blatt genutzt werden. Dies wurde für die Mutanten *cer5*, *wax2*, *shn1*, *shn3* und ihre

korrespondierenden Wildtypen Col-8 und Ws angewendet (Schroll, 2010). In der Arbeit wurde die vollständige Hemmung des Photosyntheseapparates bestimmt. Die Ergebnisse bestätigten die in der vorliegenden Arbeit errechneten Permeabilitätsdaten. Schon die Permeabilität des Wildtypen Ws war um den Faktor 1,6 im Vergleich mit Col-8 erhöht (Vergleichswert Permeationsassay Faktor 5). Bei den Mutanten *wax2* und *shn1* war die Permeabilität um den Faktor 4 im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Bei den Mutanten *cer5* (Faktor 1,2) und *shn3* (Faktor 1,5) war dieser Effekt schwächer. Auch wenn die absoluten Werte der Effekte sich unterscheiden zwischen der hier entwickelten Methode und der Methode von Schroll (2010) sind die Tendenzen gleich. Die Mutanten *wax2* und *shn1* sind deutlich durchlässiger als ihre korrespondierenden Wildtypen, *cer5* und *shn3* zeigen keinen starken Effekt. Diese Daten stärken die Ergebnisse der hier errechneten Permeabilitätsdaten. Aber auch mit dieser Methode ist eine direkte Berechnung von Leitwerten nicht möglich.

Die in der hier vorliegenden Arbeit neue etablierte Methode der Permeabilitätsbestimmung von *A. thaliana* hat den großen Vorteil, dass Leitwerte direkt berechnet werden können und das Blatt in intakter Form genutzt werden kann. Dies fehlte den bisher häufig verwendeten Methoden, die alle Schwächen zeigen.

#### **4.5. Gibt es einen Zusammenhang zwischen Permeabilität und einzelnen Kutikula-Eigenschaften?**

Werden Wachse von der Kutikula entfernt, erhöht dies die Permeabilität deutlich. Dies konnte für isolierte Kutikularmembranen von verschiedenen Spezies gezeigt werden, unter anderem für *Lycopersicon F* mit Faktor 29 und *Ficus* mit Faktor 9192 (Riederer und Schönherr, 1984 und 1985; Schreiber und Schönherr, 2009). Diese zwei Arten zeigen den kleinsten und größten in dieser Auswahl (Schreiber und Schönherr, 2009) berechneten Wert.

In einem Teil der Mutanten von *A. thaliana* mit geringerer Wachsbelegung im Vergleich zum Wildtyp wurde die Permeabilität höher (*wax2/cer3/yre*, *cut1*) und in einem Teil änderte sich die Permeabilität nicht (*cer5*, *cer10*). Die Mutanten, die eine höhere Wachsbelegung besitzen, zeigten ebenfalls zum Teil eine höhere

Permeabilität (*shn1*, *bdg*) oder eine gleich bleibende Permeabilität (*shn3*). Die Mutante mit gleicher Wachsbelegung wie der Wildtyp zeigte eine höhere Permeabilität (*att1*) (Abb. 4.1.).

Um eine Korrelation zu erstellen, müssen zunächst die gemessenen Wachsmengen normiert werden, da die absoluten Werte in jeder Analyse unterschiedlich sein können. Hierfür wurden die absoluten Werte der Wildtypen auf 100 % festgesetzt und die Mutanten auf diesen Wert normiert (Abb. 4.2.A). Die Permeabilität korrelierte nicht mit der Wachsmenge, wie es nach Literaturwerten (Schreiber und Schönherr, 2009) auch zu erwarten war.

Um nun den Einfluss der einzelnen Substanzklassen auf die Permeabilität zu untersuchen, gibt es die Möglichkeit die Menge der Substanzklassen in absoluter und in prozentualer Form anzugeben. Um vergleichbare absolute Werte zu erhalten, müssen die verschiedenen Analysen normiert werden. Hier wurde die entsprechende Menge der Substanzklasse im Wildtyp auf 100 % gesetzt und die Werte der Mutante auf diesen Wert normiert. So spiegeln diese prozentualen Werte die absoluten Werte aus der Analyse wieder (Abb. 4.2.B bis E). Die Permeabilität korrelierte nicht mit den so berechneten Werten.

Auch die Bestimmung der prozentualen Anteile der Substanzklassen am Wachs der einzelnen Mutante oder dem einzelnen Wildtyp konnten berechnet werden (Tab. 4.1. und Tabellen zur Wachsanalytik im Anhang). Auch hier konnte keine Korrelation zwischen der Permeabilität und dem prozentualen Anteil der Substanzklassen festgestellt werden.

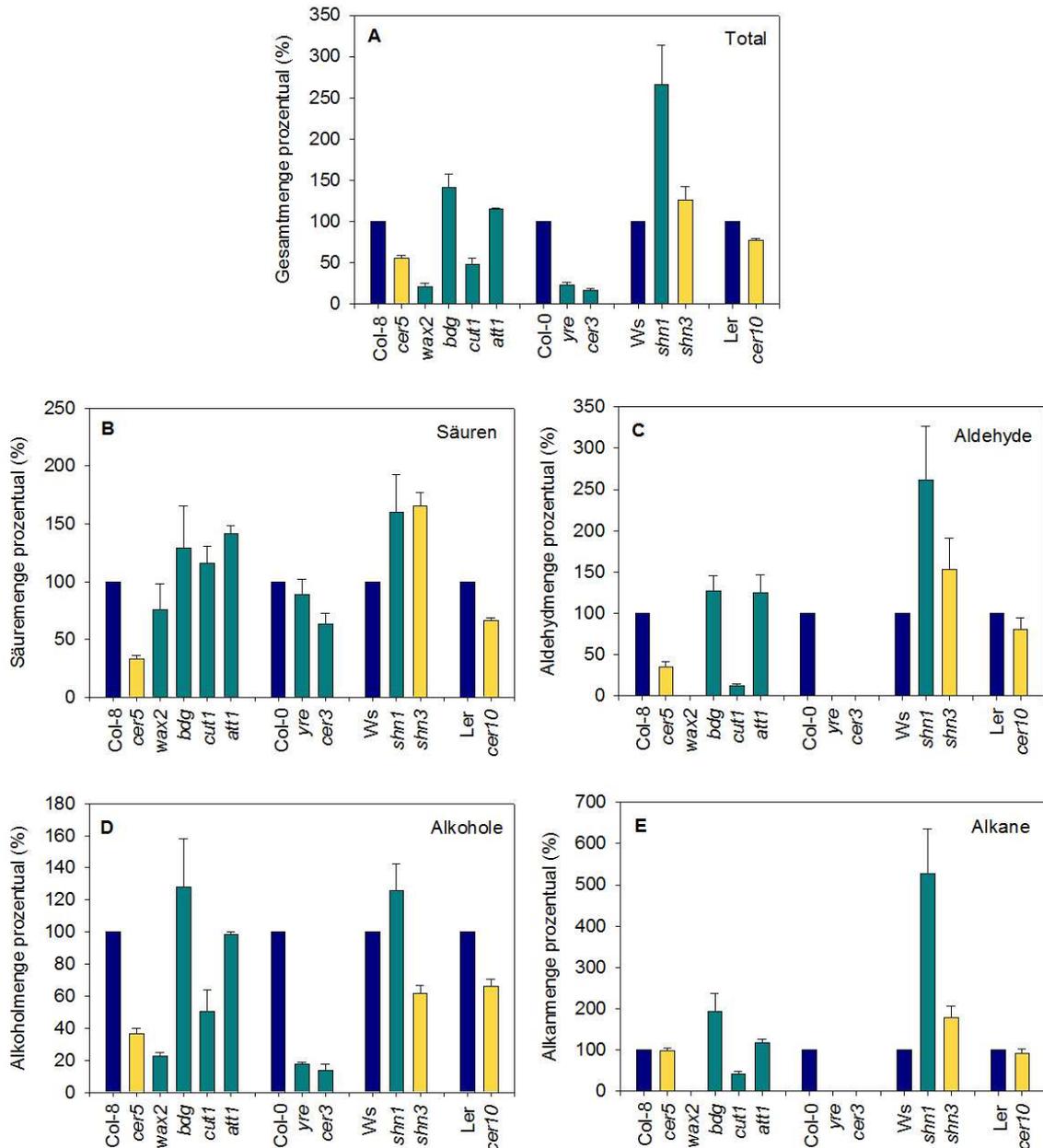


Abb. 4.2. **Wachsmenge (prozentual) der untersuchten Mutanten.** Die Auftragung der Mutanten wurde nach ihren korrespondierenden Wildtypen vorgenommen. In dunkelblau sind die Wildtypen dargestellt, deren Wachsmengen (bzw. die absoluten Mengen der Substanzklassen) auf 100 % gesetzt wurden. In (a) wird die Gesamtwachsmenge, in (b) die Menge der Säuren, in (c) die Menge der Aldehyde, in (d) die Menge der Alkohole und in (f) die Menge der Alkane dargestellt. In cyan sind die Mutanten mit erhöhter Permeabilität und in gelb die Mutanten mit keiner Veränderung in der Permeabilität (im Vergleich mit den entsprechenden Wildtypen) gekennzeichnet. Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen.

Tab. 4.1. **Leitwerte, gewichtete mittlere Kettenlänge und der prozentuale Anteil der Substanzklassen an der Wachsbelegung der Mutanten mit ihren korrespondierenden Wildtypen.** Die Werte der gewichteten mittleren Kettenlänge wurden aus den Mittelwerten der Wachsanalysen berechnet. Die Wildtypen wurden mehrfach analysiert und für die Kettenlänge wurde ein Mittelwert genommen. Für die Anteile am Gesamtwachs wurden die Daten der Wildtypen aus der Analyse aus 3.3.1. genommen. Leitwerte mit Sa, gewichtete mittlere Kettenlänge bei den Wildtypen aus  $n = 6$  (Col-8),  $n = 3$  (Col-0),  $n = 3$  (Ws) und  $n = 2$  (Ler) und  $n = 1$  (Mutanten) in  $MW \pm Sa$  und die prozentualen Anteile der Substanzklassen am Gesamtwachs mit  $n = 5$  in  $MW \pm Sa$ .

| Mutante/Wildtyp | Leitwert<br>( $m \cdot s^{-1}$ ) $\cdot 10^{-8}$ | mittlere<br>Kettenlänge | Säuren<br>(%)    | Aldehyde<br>(%)  | Alkohole<br>(%)  | Alkane<br>(%)    |
|-----------------|--|-------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Col-8           | 2,79 $\pm$ 0,38                                  | 30,47 $\pm$ 0,22        | 14,81 $\pm$ 1,74 | 19,14 $\pm$ 2,35 | 45,20 $\pm$ 2,05 | 20,85 $\pm$ 2,28 |
| <i>cer5</i>     | 4,29 $\pm$ 2,12                                  | 30,65                   | 7,87 $\pm$ 0,89  | 5,98 $\pm$ 0,92  | 29,08 $\pm$ 2,39 | 57,07 $\pm$ 2,86 |
| <i>wax2</i>     | 51,16 $\pm$ 13,40                                | 28,43                   | 59,48 $\pm$ 6,90 | -                | 40,52 $\pm$ 6,90 | -                |
| <i>bdg</i>      | 57,13 $\pm$ 28,44                                | 30,05                   | 17,24 $\pm$ 3,21 | 14,30 $\pm$ 2,77 | 39,50 $\pm$ 3,10 | 28,96 $\pm$ 7,18 |
| <i>cut1</i>     | 75,88 $\pm$ 11,04                                | 28,66                   | 22,56 $\pm$ 2,65 | 3,94 $\pm$ 0,09  | 41,29 $\pm$ 3,33 | 32,21 $\pm$ 4,76 |
| <i>att1</i>     | 50,50 $\pm$ 5,07                                 | 30,31                   | 22,66 $\pm$ 1,17 | 14,04 $\pm$ 2,25 | 34,78 $\pm$ 0,42 | 28,51 $\pm$ 2,32 |
| Col-0           | 0,55 $\pm$ 0,10                                  | 30,50 $\pm$ 0,07        | 16,36 $\pm$ 0,96 | 18,47 $\pm$ 3,31 | 44,09 $\pm$ 4,59 | 21,08 $\pm$ 3,98 |
| <i>yre</i>      | 23,39 $\pm$ 17,96                                | 28,69                   | 72,92 $\pm$ 1,52 | -                | 27,08 $\pm$ 1,52 | -                |
| <i>cer3</i>     | 37,80 $\pm$ 0,07                                 | 27,66                   | 69,48 $\pm$ 5,61 | -                | 30,52 $\pm$ 5,61 | -                |
| Ws              | 13,86 $\pm$ 4,13                                 | 30,31 $\pm$ 0,04        | 12,17 $\pm$ 1,30 | 17,06 $\pm$ 1,91 | 44,72 $\pm$ 1,83 | 26,04 $\pm$ 4,08 |
| <i>shn1</i>     | 91,69 $\pm$ 5,59                                 | 30,87                   | 9,51 $\pm$ 0,92  | 12,02 $\pm$ 1,85 | 21,97 $\pm$ 2,20 | 56,50 $\pm$ 2,10 |
| <i>shn3</i>     | 19,50 $\pm$ 13,43                                | 31,21                   | 15,67 $\pm$ 1,78 | 19,75 $\pm$ 2,27 | 19,62 $\pm$ 1,77 | 44,95 $\pm$ 1,56 |
| Ler             | 17,45 $\pm$ 59,24                                | 27,71 $\pm$ 3,61        | 12,31 $\pm$ 2,83 | 18,35 $\pm$ 5,52 | 43,45 $\pm$ 3,19 | 25,88 $\pm$ 4,59 |
| <i>cer10</i>    | 14,80 $\pm$ 3,33                                 | 28,74                   | 13,54 $\pm$ 0,81 | 18,41 $\pm$ 3,75 | 29,15 $\pm$ 1,24 | 38,90 $\pm$ 3,52 |

Es gibt auch die Möglichkeit, dass sich eine Kettenlängenverschiebung auf die Durchlässigkeit der Kutikula auswirkt. Sind mehr Monomere mit kurzer Kettenlänge in der Kutikula vorhanden, ist der Bereich der aliphatischen Domäne kleiner und mehr hydrophile Bereiche entstehen, die potentiell bessere Durchgangsstellen bieten. Um hierfür einen Wert zu bekommen, wird mit Hilfe von Formel 4.5. die gewichtete mittlere Kettenlänge bestimmt (Kirsch, 1996).

$$N = [\sum (X_i * N_i)] / \sum X_i \quad (\text{Formel 4.5.})$$

Die Permeabilität korrelierte nicht mit der gewichteten mittleren Kettenlänge. Dies war insofern nicht verwunderlich, da in Kirsch (1996) eine Korrelation der Permeabilität mit der mittleren Kettenlänge nur bis zur Kettenlänge C<sub>26</sub> festgestellt werden konnte. Die für *A. thaliana* errechneten gewichteten mittleren Kettenlängen reichten von 27,66 (*cer3*) bis 31,21 (*shn3*) (Tab. 4.1.) und lagen ausschließlich oberhalb dieser Grenze.

Einen Zusammenhang zwischen der Wachsbelegung und der Permeabilität herzustellen scheint nicht so einfach möglich zu sein. Auch wenn es bisher noch keinen Hinweis darauf gab, dass die Kutinmenge und -zusammensetzung eine direkte Rolle für die Permeabilität spielt, wurde auch die chemische Zusammensetzung von Kutin für einige der gewählten Mutanten analysiert.

Die Kutinmenge und -zusammensetzung ist in den Mutanten *wax2*, *cer5*, *cut1*, *cer10* und *shn3* nicht signifikant unterschiedlich von den korrespondierenden Wildtypen. Diese Mutanten sind zum Teil deutlich permeabler (*wax2* und *cut1*) und ein Teil ist gleich permeabel wie der entsprechende Wildtyp (*cer5*, *cer10* und *shn3*).

Die Mutanten *shn1* und *att1* haben deutliche Effekte im Kutin, wobei *shn1* deutlich mehr und *att1* deutlich weniger Kutin besitzt. Beide Mutanten zeigen die größten Effekte in den  $\alpha$ - $\omega$ -Disäuren, wobei deren Menge in *shn1* erhöht und in *att1* erniedrigt ist. Beide Mutanten haben eine höhere Permeabilität im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtypen Col-8 und Ws.

Die Permeabilität korreliert weder mit Kutinmenge, noch mit der absoluten oder prozentualen Zusammensetzung (Tab. 4.2. und Tabellen im Anhang zu Kutinanalytik) der Substanzklassen.

Als Ursache für die Veränderungen in der Permeabilität in den Mutanten lässt sich ein Zusammenhang mit einer Verbindung der Veränderungen in Wachs und Kutin vermuten. Da die absoluten Werte in der Analytik schwanken, muss ein Weg gefunden werden, um diese Werte zu verbinden, so dass zwischen den verschiedenen Mutanten eine einheitliche Darstellung stattfindet. Als Wert für diese Kombination wurden die prozentualen Veränderungen in Wachs und Kutin im Vergleich zum Wildtyp aufaddiert. Dieser Wert setzt sich für *shn1* aus folgenden Werten zusammen: 166 % Veränderung aus der Wachsanalytik und 204 %

Veränderung aus der Kutinanalytik. So ergibt sich ein Gesamtwert von 370 % Veränderung. Aber die Permeabilität korrelierte auch nicht mit diesen Werten (Tab. Anhang 8.4.).

Tab. 4.2. **Prozentuale Anteil der Substanzklassen an der Kutinzusammensetzung.** Die Mutanten werden mit ihren korrespondierenden Wildtypen dargestellt. Die Werte wurden aus den Mittelwerten der Kutinanalysen berechnet. Der Wildtyp Col-8 wurde mehrfach analysiert. Der dargestellte Wert ist der Mittelwert (n = 3) aus diesen Analysen mit Sa.

| Mutante/<br>Wildtyp | Säuren<br>(%) | Alkohole<br>(%) | $\omega$ -Hydroxy-<br>säuren (%) | $\alpha$ - $\omega$ |                          | <i>midchain</i><br>(%) |
|---------------------|---------------|-----------------|----------------------------------|---------------------|--------------------------|------------------------|
|                     |               |                 |                                  | Disäuren<br>(%)     | 2-Hydroxy-<br>säuren (%) |                        |
| Col-8               | 32,06 ± 9,97  | 1,97 ± 0,05     | 0,65 ± 0,09                      | 30,56 ± 4,23        | 33,95 ± 6,89             | 0,82 ± 0,13            |
| <i>wax2</i>         | 44,14         | 1,58            | 0,44                             | 23,28               | 30,27                    | 0,29                   |
| <i>cer5</i>         | 24,34         | 2,19            | 0,55                             | 30,42               | 41,98                    | 0,53                   |
| <i>cut1</i>         | 49,04         | 2,03            | 0,43                             | 25,16               | 23,22                    | 0,13                   |
| <i>att1</i>         | 29,71         | 4,48            | 0,63                             | 9,54                | 55,27                    | 0,37                   |
| Ws                  | 26,21         | 2,75            | 0,78                             | 30,94               | 38,75                    | 0,58                   |
| <i>shn1</i>         | 7,81          | 1,59            | 10,12                            | 65,38               | 12,57                    | 2,53                   |
| <i>shn3</i>         | 19,84         | 3,63            | 2,98                             | 38,59               | 34,00                    | 0,95                   |
| Ler                 | 69,59         | 1,44            | 0,87                             | 18,16               | 9,55                     | 0,39                   |
| <i>cer10</i>        | 64,89         | 1,28            | 1,13                             | 21,69               | 10,32                    | 0,69                   |

Generell kann folgende Schlussfolgerung getroffen werden: Wird die Kutikula verändert, wird die Barriere in der Regel durchlässiger. Dies gilt sowohl für positive wie negative Änderungen der Wachs- als auch der Kutinbestandteile. Der Einfluss einzelner Substanzklassen ist dabei fraglich. Vielmehr kommt es auf die komplexe Struktur an. Auch bei Mutanten, die über Veränderungen im Wachs verfügen, kann die Barriere wie im Wildtyp bleiben. Diese Struktur der Kutikula kann auf analytischer Ebene nicht erfasst werden. Auch ein eventueller Einfluss weiterer Kutikula-Bestandteile wie z.B. Glycerin, aromatische Komponenten, Kohlenhydrate oder Peptide werden nicht erfasst.

#### 4.6. Zusammenfassung der Diskussion und Ausblick

Es ist gelungen einen Permeationsassay für intakte Blätter von *A. thaliana* zu etablieren. Dies ermöglicht zum ersten Mal die quantitative Untersuchung der Permeabilität von *A. thaliana*. So konnten Leitwerte erstellt werden, die einen direkten Vergleich mit anderen Spezies der Kutikula-Forschung zulassen. Ein solcher Vergleich war bisher nicht möglich. Im Vergleich mit diesen häufig verwendeten Spezies zeigte *A. thaliana* eine besonders hohe Durchlässigkeit. Dies war unerwartet. Eine Hypothese (Schreiber und Schönherr, 2009) besagte, dass die Wasserpermeabilität bei  $10^{-10} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  liegen könnte, wenn die geringe Wachsmenge optimal in einem monomolekularen Film angeordnet wäre. Leitwerte in dieser Größenordnung wurden bereits für viele Spezies bestimmt. Trotz allem konnte diese Hypothese für *A. thaliana* widerlegt werden.

Warum kommt es zu dieser hohen Permeabilität? Allgemein werden die Barriereigenschaften den Wachsen zugesprochen. Kutin fungiert als stabile Matrix, in die die Wachse eingebettet werden. Wird die Kutikula von *A. thaliana* mit anderen Spezies verglichen fällt aber besonders die abweichende Struktur von Kutin auf (Franke *et al.*, 2005). Während in anderen Spezies besonders gesättigte  $\omega$ -Hydroxysäuren (Kolattukudy, 2001) vorkommen, wird das Kutin in *A. thaliana* besonders durch ungesättigte  $\alpha$ - $\omega$ -Disäuren geprägt. Diese sind in der Regel charakteristisch für Suberin. Dies wäre eine Erklärung für die starke Durchlässigkeit, da Zellwände mit eingelagertem Suberin in der Regel durchlässiger sind als Zellwände mit eingelagertem Kutin (Schreiber, 2010). Diese veränderte Kutinmatrix könnte auch zu einer abweichenden Einbettung der Wachse führen, welche dann eine nicht so effektive Barriere bilden im Vergleich mit anderen Spezies. So wäre die Veränderung im Kutin nur indirekt für die Veränderung der Permeabilität zuständig.

Der neue Permeationsassay ermöglicht darüber hinaus nicht nur die Erstellung von Permeationsdaten für organische Moleküle, sondern indirekt auch die Vorhersage der Wasserpermeabilität für *A. thaliana*. Dies konnte durch einen linearen Zusammenhang zwischen der Permeabilität von organischen Molekülen (in diesem Fall Epoxiconazol) und Wasser bei anderen Spezies gezeigt werden (Abb. 3.10. und Niederl *et al.*, 1998). Die Werte für Wasserpermeabilität von *A. thaliana*, die durch Co-Permeationsexperimente mit verschiedenen in der Kutikula-Forschung häufig

genutzten Spezies berechnet werden konnten, lassen sich durch Transpirationsraten bestätigen.

Sehr interessant wäre die Untersuchung weiterer krautiger Pflanzen, um zu überprüfen, ob *A. thaliana* eine besonders Ausnahme hinsichtlich ihrer sehr permeablen Kutikula bildet oder sich in einem Bereich von Durchlässigkeit bewegt, in dem viele Arten zu finden sind. Für Gerste konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Permeabilität in einem Bereich von  $10^{-7} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  bewegt (Schreiber und Schönherr, 2009). Hierfür würden sich außerdem die bereits als Modellpflanzen genutzten Spezies Raps (*Brassica napus*), Reis (*Oryza sativa*) oder Mais (*Zea mays*) anbieten. Außerdem könnten noch andere *Arabidopsis* Arten (z.B. *Arabidopsis lyrata*) untersucht werden.

Der etablierte Permeationsassay mit  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazol ermöglichte die Berechnung von Leitwerten für zehn ausgewählte Mutanten und deren korrespondierende Wildtypen von *A. thaliana*. Es zeigte sich, dass es in den meisten der untersuchten Mutanten durch eine Veränderung in der Kutikula zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Barriere kam. Die Permeabilität von *A. thaliana* bewegt sich im Bereich von  $10^{-7}$  bis  $10^{-9} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Damit liegt sie in einem deutlich höheren Bereich als die meisten bisher untersuchten Spezies. Die Veränderungen im Wachs wirken sich nicht bei allen Mutanten auf die Permeabilität aus. Es gibt auch Mutanten, bei denen keine Veränderung nachzuweisen ist (*cer5*, *cer10*, *shn3*). In den anderen sieben untersuchten Mutanten (*wax2/cer3/yre*, *cut1*, *shn1*, *bdg*, *att1*) ist eine Zunahme der Permeabilität nachzuweisen. Dies war unabhängig von einer Zu- oder Abnahme der Wachsmenge. In keinem Fall nahm die Permeabilität ab.

Auch die einzelnen Substanzklassen korrelierten in keiner Weise mit der Durchlässigkeit der Barriere. Es scheint daher keinen direkten Zusammenhang der Permeabilität mit der Zusammensetzung von Wachs oder Kutin zu geben. Auch die Veränderung in der gewichteten mittleren Kettenlänge zeigte keinen Einfluss auf die Permeabilität. Kirsch (1996) konnte zeigen, dass die gewichtete mittlere Kettenlänge in Bezug auf die höhere Permeabilität einer Wachsschicht erst unterhalb einer Kettenlänge von  $\text{C}_{26}$  Effekte bewirken. Eine darüber hinausgehende Verlängerung der Ketten bewirkt keinen signifikanten Rückgang der Permeabilität. Die hier untersuchten Mutanten hatten stets mittlere Kettenlängen von mindestens  $\text{C}_{27}$ . Es kann daher davon ausgegangen werden, dass eine Reduktion der Kettenlängen

nicht für die erhöhte Permeabilität verantwortlich gemacht werden kann. Da alle untersuchten Mutanten eine mittlere Kettenlänge von mindestens C<sub>27</sub> aufweisen, geht eine noch stärkere Verkürzung der Kettenlängen wahrscheinlich mit dramatischen bis letalen Effekten für die Pflanzen einher.

Da Gesamtwachsmenge, chemische Zusammensetzung sowie mittlere Kettenlängen nicht direkt für die Veränderung der Permeabilität verantwortlich zu sein scheinen, könnte die Ultrastruktur der Kutikula die eigentliche Ursache für die Veränderungen in den Barriereeigenschaften sein.

Diese Struktur lässt sich durch die chemische Analyse nicht aufklären. In der Literatur wurden ja bereits einige TEM-Aufnahmen der Mutanten gezeigt. Dies gibt bereits einen Aufschluss über Veränderungen der Kutikula. Trotz allem birgt diese Methode auch Risiken (Schreiber und Schönherr, 2009). Das Gewebe muss zuvor mit Glutaraldehyd (1,5-Pentandial) fixiert werden. Anschließend werden die Proben mit Osmiumtetroxid oder Kaliumpermanganat gefärbt, mit Ethanol oder Aceton dehydriert und dann mit Epoxidharz infiltriert. Dies wird bei 60°C polymerisiert. Es werden dünne Schnitte gemacht, welche mit Uranylacetat und Bleizitrat nachkontrastiert werden. Wachse werden durch diese Behandlung zerstört oder zumindest in ihrer Struktur verändert, so dass diese Methode keinen Aufschluss über die genaue Struktur geben kann. Allerdings kann der Teil der Kutikula, der vom Kutin bestimmt wird, genauer betrachtet werden. Die Mutanten, bei denen TEM-Bilder gemacht wurden, zeigten jeweils eine weniger elektronendichte, dafür aber dickere Kutikula. Es wäre möglich, dass es weniger kristalline Zonen in der Kutikula der Mutanten gibt, die als Verlängerung des Diffusionsweges wirken (Baur *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2003). Warum es durch die bekannten Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung aber zu genau diesen strukturellen Veränderungen in der Kutikula kommt, kann hier nicht beantwortet werden. Es werden also weitere Methoden benötigt, um die Struktur der *Arabidopsis*-Kutikula zu untersuchen.

In einer Veröffentlichung (Reynhardt und Riederer, 1991) wurde die Kutikula von *C. aurantium* per NMR auf das Vorhandensein von kristallinen und amorphen Zonen untersucht. Dieser Ansatz ist für die Kutikula von *A. thaliana* nicht geeignet, da für die NMR-Untersuchung isolierte Kutikularmembranen genutzt wurden. Um nur die Wachse zu untersuchen müssten diese per Chloroform extrahiert und dann wieder

getrocknet werden. Dies wäre dann aber ein artifizielles System und es wäre durchaus denkbar, dass das Ergebnis durch die Extraktion stark verfälscht würde.

Auch eine neue Methode von Buda *et al.*, 2009, in der die dreidimensionale Struktur der Kutikula mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen und einem konfokalen Lasermikroskop untersucht wird, scheint für *A. thaliana* ungeeignet. Die Kutikula von *A. thaliana* ist viel zu dünn (nur 20 – 30 nm), so dass deren Struktur selbst mit dem konfokalen Lasermikroskop nicht in hoher Auflösung untersucht werden könnte. Außerdem müssen auch hier die Proben soweit bearbeitet werden, dass die Wachse nicht in ihrer Struktur bestehen bleiben. Zusätzlich ist diese Methode für die Untersuchung einer Kutikula am intakten Blatt aufgrund der Chlorophyll-Fluoreszenz nicht geeignet.

Generell kann hinterfragt werden, ob *A. thaliana* aufgrund dieser sehr hohen Permeabilität ein gutes Modell für die physiologischen Untersuchungen der Kutikula ist. Ökologisch verfolgt *A. thaliana* die Strategie der Stressvermeidung, bei der sie nur keimt und wächst bei guten Bedingungen. Ansonsten kann diese Pflanze als Same im Boden überdauern. In diesem Sinne sind auch Anpassungen der Kutikula an Stresssituationen nicht in dem Maße nötig, wie es für eine mehrjährige Pflanze wichtig ist.

Dies sollte trotz allem in Stressexperimenten überprüft werden, bei denen mit Salz- oder Trockenstress gearbeitet werden könnte. Die so angezogenen Pflanzen könnten im Permeationsassay wertvolle Ergebnisse liefern.

Ein molekularbiologischer Ansatz könnte noch eine Mikroarray-Untersuchung sein, in der bei verschiedenen Mutanten die Aktivität von anderen Genen gezeigt werden könnte. Hierfür würden sich sehr durchlässige Mutanten wie *wax2*, *shn1* und *att1* und weniger durchlässige wie *cer5*, *shn3* und *cer10* anbieten. So könnte untersucht werden, auf welche Gene noch ein Einfluss durch die bekannten Mutationen ausgeübt wird.

Generell sollte der hier etablierte Permeationsassay für Permeabilitätsstudien von *A. thaliana* herangezogen werden, um vergleichbare Werte zwischen verschiedenen Studien zu erhalten.

---

## **5. Zusammenfassung**

Die Kutikula bildet die Grenzfläche zwischen den oberirdischen Pflanzenorganen und der Umwelt. Für viele Spezies (z.B. *P. laurocerasus*) wurden bereits transportphysiologische Untersuchungen mit isolierten Kutikularmembranen durchgeführt. Da die Blätter der Modellpflanze *A. thaliana* nur eine sehr dünne Kutikula besitzen und außerdem über Stomata und Trichome verfügen, ist die Isolierung einer intakten Kutikularmembran für Transportexperimente nicht möglich. In der vorliegenden Arbeit konnte nun ein Assay zur Bestimmung der Permeation von organischen Molekülen über die Kutikula von *A. thaliana* am intakten Blatt etabliert werden. Für dieses Aufnahmeexperiment wurde das radioaktiv markierte systemische Fungizid  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol verwendet und anschließend Leitwerte berechnet. Der Leitwert für den Wildtyp Columbia-8 lag bei  $2,79 \cdot 10^{-8} \pm 6,35 \cdot 10^{-9} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  und war im Vergleich mit dem Leitwert intakter Blätter von *P. laurocerasus* um den Faktor 66 höher. Indirekt konnte über Co-Permeationsexperimente mit verschiedenen Spezies (*P. laurocerasus*, *C. aurantium* und *H. helix*) auch eine zuverlässige Vorhersage über die Wasserpermeabilität für *A. thaliana* getroffen werden. Der berechnete Wert für die Wasserpermeabilität von  $6,43 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  konnte durch Transpirationsexperimente bestätigt werden.

Um Hinweise zu bekommen, in wieweit sich die chemische Zusammensetzung der Kutikula (Wachs und Kutin) auf die Permeabilität auswirkt, wurden zehn Kutikula-Mutanten und ihre korrespondierenden Wildtypen untersucht. Es wurden Leitwerte für  $^{14}\text{C}$ -Epoconazol bestimmt, außerdem wurde die Wachs- und Kutinzusammensetzung mittels Gaschromatographie ermittelt. Die Permeabilität der untersuchten Linien bewegte sich im Bereich  $10^{-7}$  bis  $10^{-9} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ . Die Veränderung im Wachs und Kutin wirkte sich nur teilweise auf die Durchlässigkeit aus. In drei Mutanten war keine Veränderung in der Permeabilität nachzuweisen (*cer5*, *cer10*, *shn3*). In den anderen sieben Mutanten (*wax2/cer3/yre*, *cut1*, *shn1*, *bdg*, *att1*) nahm die Permeabilität zu. Eine Abnahme der Permeabilität konnte nicht gezeigt werden. Dies war unabhängig von einer Zu- oder Abnahme der Wachs oder Kutinmenge. Auch bei Betrachtung verschiedener Parameter (z.B. Menge einzelner Substanzklassen oder gewichtete mittlere Kettenlänge) konnte kein direkter Zusammenhang zur Änderung in der Permeabilität nachgewiesen werden. Es wäre denkbar, dass Veränderungen in der Ultrastruktur der Kutikula die eigentliche Ursache für die Veränderungen in den Barriereigenschaften ist.



## **6. Summary**

The cuticle forms the interface between the aerial organs of the plant and the surrounding air. Transport barriers of many species (e.g. *P. laurocerasus*) have previously been examined using isolated cuticular membranes. Since leaves of the model plant *A. thaliana* have a very thin cuticle with stomates and trichomes isolation of an intact cuticle for transport experiments is not possible. In this study an assay for measuring permeation of organic molecules through the cuticle of the intact leaf of *A. thaliana* was established. For this uptake experiment the radioactive marked systemic fungicide  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazole was used and the permeance could be calculated. For the wildtype Columbia-8 a permeance of  $2,79 \cdot 10^{-8} \pm 6,35 \cdot 10^{-9} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  could be measured. Compared to the permeance of intact *P. laurocerasus* leaves it was 66 times higher. A Co-Permeation experiment with different species (*P. laurocerasus*, *C. aurantium* and *H. helix*) lead to a reliable prediction for water permeability for *A. thaliana*. The value for water permeability of  $6,43 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  could be confirmed in transpiration experiments.

Ten mutants affected in cuticle biosynthesis and their corresponding wildtypes have been chosen for transport experiments and chemical analysis of the cuticle (wax and cutin) by gas chromatography to find the link between chemical composition and permeability. Permeance of  $^{14}\text{C}$ -Epoxyconazole was in the order of  $10^{-7}$  to  $10^{-9} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  with those lines. Changes in wax and cutin affected permeability just to some extent. For three mutants there was no change in permeability (*cer5*, *cer10*, *shn3*), in the other seven mutants (*wax2/cer3/yre*, *cut1*, *shn1*, *bdg*, *att1*) permeability increased. Decrease of permeability compared to wildtype plants could not be detected. Also the consideration of different parameters (e.g. amount of substance classes or mean chain length) did not correlate with the changes in permeability. Changes of the ultrastructure of the cuticle probably causes changes in barrier properties.

---

## **7. Literaturliste**

**Aarts MGM, Keijzer CJ, Stiekema WJ, Pereira A** (1995) Molecular characterization of the *CER1* gene of *Arabidopsis* involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility. *The Plant Cell* **7**: 2115-2127

**Aharoni A, Dixit S, Jetter R, Thoenes E, van Arkel G, Pereira A** (2004) The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**: 2463-2480

**Bach L, Michaelson LV, Haslam R, Bellec Y, Gissot L, Marion J, Da Costa M, Boutin JP, Miquel M, Tellier F, Domergue F, Markham JE, Beaudoin F, Napier JA, Faure JD** (2008) The very-long-chain hydroxy fatty acyl-CoA dehydratase PASTICCINO2 is essential and limiting for plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 14727-14731

**Barthlott W** (1990) Scanning Electron Microscopy of the Epidermal Surface in Plants. In: Claugher D (ed.), *The systematics Association Special Volume No. 41, Scanning Electron Microscopy in Taxonomy and Functional Morphology*. Clarendon Press, Oxford, pp 69-94

**Baud S, Guyon V, Kronenberger J, Wuillème S, Miquel M, Caboche M, Lepiniec L, Rochat C** (2003) Multifunctional acetyl-CoA carboxylase 1 is essential for very long chain fatty acid elongation and embryo development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **33**: 75-86

**Baur P** (1997) Lognormal distribution of water permeability and organic solute mobility in plant cuticles. *Plant Cell and Environment* **20**: 167-177

**Baur P, Marzouk H, Schönherr J** (1999) Estimation of path lengths for diffusion of organic compounds through leaf cuticles. *Plant, Cell and Environment* **22**: 291-299

**Baur P, Schönherr J** (1995) Temperature dependence of the diffusion of organic compounds across plant cuticles. *Chemosphere* **30**: 1331-1340

**Beudoin F, Wu XZ, Li FL, Haslam RP, Markham JE, Zheng HQ, Napier JA, Kunst L** (2009) Functional Characterization of the *Arabidopsis* beta-Ketoacyl-Coenzyme A Reductase Candidates of the Fatty Acid Elongase. *Plant Physiology* **150**: 1174-1191

**Becker M, Kerstiens G, Schönherr J** (1986) Water permeability of plant cuticles: permeance, diffusion and partition coefficients. *Trees* **1**: 54-60

**Beudoin F, Gable K, Sayanova O, Dunn T, Napier JA** (2002) A *Saccharomyces cerevisiae* gene required for heterologous fatty acid elongase activity encodes a microsomal beta-keto-reductase. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 11481-11488

**Benveniste I, Tijet N, Adas F, Philipps G, Salaun JP, Durst F** (1998) CYP86A1 from *Arabidopsis thaliana* encodes a cytochrome P450-dependent fatty acid Omega-Hydroxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **243**: 688-693

**Bessire M, Chassot C, Jacquat AC, Humphry M, Borel S, Petetot JMC, Metraux JP, Nawrath C** (2007) A permeable cuticle in *Arabidopsis* leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*. *EMBO Journal* **26**: 2158-2168

**Bird D** (2008) The role of ABC transporters in cuticular lipid secretion. *Plant Science* **174**: 563-569

**Bird D, Beisson F, Brigham A, Shin J, Greer S, Jetter R, Kunst L, Wu XW, Yephremov A, Samuels L** (2007) Characterization of *Arabidopsis* ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. *The Plant Journal* **52**: 485-498

**Boerjan W, Ralph J, Baucher M** (2003) Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 519-546

**Branen JK, Shintani DK, Engeseth NJ** (2003) Expression of Antisense Acyl Carrier Protein-4 Reduces Lipid Content in *Arabidopsis* Leaf Tissue. *Plant Physiology* **132**: 748-756

**Broun P, Poindexter P, Osborne E, Jiang CZ, Riechmann JL** (2004) WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**: 4706-4711

**Buchholz A** (2006) Characterization of the diffusion of non-electrolytes across plant cuticles: properties of the lipophilic pathway. Journal of Experimental Botany **57**: 2501-2513

**Buda GJ, Isaacson T, Matas AJ, Paolillo DJ and Rose JKC** (2009) Three dimensional imaging of plant cuticle architecture using confocal scanning laser microscopy. The Plant Journal **60**: 378-385

**Bukovac MJ, Petracek PD** (1993) Characterizing Pesticide and Surfactant Penetration with Isolated Plant Cuticles. Pesticide Science **37**: 179-194

**Chamel A** (1986) Foliar absorption of herbicides: study of the cuticular penetration using isolated cuticles. Physiologie Vegetale **24**: 491-508

**Chen XB, Goodwin SM, Boroff VL, Liu XL, Jenks MA** (2003) Cloning and characterization of the *WAX2* gene of *Arabidopsis* involved in cuticle membrane and wax production. The Plant Cell **15**: 1170-1185

**Coret J, Gambonnet B, Brabet F, Chamel A** (1993) Diffusion of 3 Ethoxylated Octylphenols Across Isolated Plant Cuticles. Pesticide Science **38**: 201-209

**Curtis MD, Grossniklaus U** (2003) A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. Plant Physiology **133**: 462-469

**Cussler EL** (1984) Diffusion: Mass transfer in fluid systems, Cambridge University Press

**DeBono A, Yeats TH, Rose JKC, Bird D, Jetter R, Kunst L, Samuels L** (2009) *Arabidopsis* LTPG Is a Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Lipid Transfer Protein Required for Export of Lipids to the Plant Surface. The Plant Cell **21**: 1230-1238

**Denic V, Weissman JS** (2007) A molecular caliper mechanism for determining very long-chain fatty acid length. *Cell* **130**: 663-677

**De Oliveira S** (2009) Untersuchung zur kutikularen Barriereigenschaften von *Arabidopsis thaliana*. *Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn*

**Dominguez E, Heredia A** (1999) Water hydration in cutinized cell walls: a physico-chemical analysis. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* **1426**: 168-176

**Faust A** (2006) Characterisation of cuticular mutants in *Arabidopsis thaliana* *Dissertation, Universität zu Köln*

**Fiebig A, Mayfield JA, Miley NL, Chau S, Fischer RL, Preuss D** (2000) Alterations in *CER6*, a gene identical to *CUT1*, differentially affect long-chain lipid content on the surface of pollen and stems. *The Plant Cell* **12**: 2001-2008

**Franke R, Briesen I, Wojciechowski T, Faust A, Yephremov A, Nawrath C, Schreiber L** (2005) Apoplastic polyesters in *Arabidopsis* surface tissues - A typical suberin and a particular cutin. *Phytochemistry* **66**: 2643-2658

**Franke R, Schreiber L** (2007) Suberin - a biopolyester forming apoplastic plant interfaces. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 252-259

**Geyer U, Schönherr J** (1990) The effect of environment on permeability and composition of *Citrus* leaf cuticles: 1 Water permeability of isolated cuticular membranes. *Planta* **180**: 147-153

**Graca J, Schreiber L, Rodrigues J, Pereira H** (2002) Glycerol and glyceryl esters of omega-hydroxyacids in cutins. *Phytochemistry* **61**: 205-215

**Greer S, Wen M, Bird D, Wu XM, Samuels L, Kunst L, Jetter R** (2007) The cytochrome p450 enzyme CYP96A15 is the midchain alkane hydroxylase responsible for formation of secondary alcohols and ketones in stem cuticular wax of *arabidopsis*. *Plant Physiology* **145**: 653-667

**Hammer PE, Evensen KB** (1994) Differences between Rose Cultivars in Susceptibility to Infection by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **84**: 1305-1311

**Han G, Gable K, Kohlwein SD, Beaudoin F, Napier JA, Dunn TM** (2002) The *Saccharomyces cerevisiae* YBR159w gene encodes the 3-ketoreductase of the microsomal fatty acid elongase. *Molecular Biology of the Cell* **13**: 2031

**Harwood, J.L.** (2005) Fatty acid biosynthesis *In*: D.J. Murphy (ed.), *Plant Lipids: biology, utilisation and manipulation*, Blackwell Publishing, Oxford, pp 27-66

**Holloway PJ, Cutler DE, Alvin KL, Price** (1982) The chemical constitution of plant cutins. *In* *The plant cuticle*. Academic Press, London, pp 45-85

**Hooker TS, Lam P, Zheng HQ, Kunst L** (2007) A core subunit of the RNA-processing/degrading exosome specifically influences cuticular wax biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**: 904-913

**Hosy E, Vavasseur A, Mouline K, Dreyer I, Gaymard F, Poree F, Boucherez J, Lebaudy A, Bouchez D, Very AA, Simonneau T, Thibaud JB, Sentenac H** (2003) The *Arabidopsis* outward K<sup>+</sup> channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration (vol 100, pg 5549, 2003). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 7418-7418

**Hunt GM, Baker EA** (1980) Phenolic constituents of tomato fruit cuticles. *Phytochemistry* **19**: 1415-1419

**Jeffree CE, Juniper, Southwood** (1986) The cuticle, epicuticular waxes and trichomes of plants, with reference to their structure, functions and evolution. *In* *Insects and Plant Surfaces*. Edward Arnold, London, pp 23-64

**Jenks MA, Rashotte AM, Tuttle HA, Feldmann KA** (1996) Mutants in *Arabidopsis thaliana* altered in epicuticular wax and leaf morphology. *Plant Physiology* **110**: 377-385

**Jenks MA, Tuttle HA, Eigenbrode SD, Feldmann KA** (1995) Leaf Epicuticular Waxes of the *Eceriferum* Mutants in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **108**: 369-377

**Jetter R, Schaffer S, Riederer M** (2000) Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L. *Plant Cell and Environment* **23**: 619-628

**Joubes J, Raffaele S, Bourdenx B, Garcia C, Laroche-Traineau J, Moreau P, Domergue F, Lessire R** (2008) The VLCFA elongase gene family in *Arabidopsis thaliana*: phylogenetic analysis, 3D modelling and expression profiling. *Plant Molecular Biology* **67**: 547-566

**Joyard J, Stumpf PK** (1981) Synthesis of long-chain acyl-CoA in chloroplast envelope membranes. *Plant Physiology* **67**: 250–56

**Kannangara R, Branigan C, Liu Y, Penfield T, Rao V, Mouille G, Hofte H, Pauly M, Riechmann JL, Broun P** (2007) The transcription factor WIN1/SHN1 regulates cutin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **19**: 1278-1294

**Kerler F, Riederer M, Schönherr J** (1984) Non-Electrolyte permeability of plant cuticles: A critical evaluation of experimental methods. *Physiologia Plantarum* **62**: 599-602

**Kerstiens G, Schreiber L, Lenzian KJ** (2006) Quantification of cuticular permeability in genetically modified plants. *Journal of Experimental Botany* **57**: 2547-2552

**Kirsch T, Kaffarnik F, Riederer M, Schreiber L** (1997) Cuticular permeability of the three tree species *Prunus laurocerasus* L, *Ginkgo biloba* L and *Juglans regia* L: Comparative investigation of the transport properties of intact leaves, isolated cuticles and reconstituted cuticular waxes. *Journal of Experimental Botany* **48**: 1035-1045

**Kirsch T** (1996) Charakterisierung der kutikulären Barreireigenschaften ausgewählter Baumarten: Transportexperimente mit intakten Blättern, isolierten Kutikularmembranen und rekonstituierten Wachsen. *Dissertation, Bayrische Julius-Maximilians-Universität Würzburg*

**Kohlwein SD, Eder S, Oh CS, Martin CE, Gable K, Bacikova D, Dunn T** (2001) Tsc13p is required for fatty acid elongation and localizes to a novel structure at the nuclear-vacuolar interface in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **21**: 109-125

**Kolattukudy PE** (1971) Enzymatic synthesis of fatty alcohols in *Brassica oleracea*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **142**: 701-9

**Koornneef M, Hanhart CJ, Thiel F** (1989) A Genetic and Phenotypic Description of *Eceriferum* (cer) Mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Heredity* **80**: 118-122

**Kunst L, Samuels L** (2009) Plant cuticles shine: advances in wax biosynthesis and export. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 721-727

**Kurata T, Kawabata-Awai C, Sakuradani E, Shimizu S, Okada K, Wada T** (2003) The *YORE-YORE* gene regulates multiple aspects of epidermal cell differentiation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **36**: 55-66

**Kurdyukov S, Faust A, Trenkamp S, Bar S, Franke R, Efremova N, Tietjen K, Schreiber L, Saedler H, Yephremov A** (2006a) Genetic and biochemical evidence for involvement of HOTHEAD in the biosynthesis of long-chain alpha-,omega-dicarboxylic fatty acids and formation of extracellular matrix. *Planta* **224**: 315-329

**Kurdyukov S, Faust A, Nawrath C, Bar S, Voisin D, Efremova N, Franke R, Schreiber L, Saedler H, Metraux JP, Yephremov A** (2006b) The epidermis-specific extracellular BODYGUARD controls cuticle development and morphogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **18**: 321-339

**Lai C, Kunst L, Jetter R** (2007) Composition of alkyl esters in the cuticular wax on inflorescence stems of *Arabidopsis thaliana* cer mutants. *The Plant Journal* **50**: 189-96

**Lee SB, Go YS, Bae HJ, Park JH, Cho SH, Cho HJ, Lee DS, Park OK, Hwang I, Suh MC** (2009) Disruption of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Lipid Transfer Protein Gene Altered Cuticular Lipid Composition, Increased Plastoglobules, and Enhanced Susceptibility to Infection by the Fungal Pathogen *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiology* **150**: 42-54

**Lewis NG, Yamamoto E** (1990) Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **41**: 455-496

**Li F, Wu X, Lam P, Bird D, Zheng H, Samuels L, Jetter R, Kunst L** (2008) Identification of the wax ester synthase/acyl-coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase WSD1 required for stem wax ester biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **148**: 97-107

**Li YH, Beisson F, Koo AJK, Molina I, Pollard M, Ohlrogge J** (2007) Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 18339-18344

**Lolle SJ, Berlyn GP, Engstrom EM, Krolkowski KA, Reiter WD, Pruitt RE** (1997) Developmental regulation of cell interactions in the *Arabidopsis fiddlehead-1* mutant: A role for the epidermal cell wall and cuticle. *Developmental Biology* **189**: 311-321

**Luo B, Xue XY, Hu WL, Wang LJ, Chen XY** (2007) An ABC transporter gene of *Arabidopsis thaliana*, AtWBC11, is involved in cuticle development and prevention of organ fusion. *Plant and Cell Physiology* **48**: 1790-1802

**Mang HG, Laluk KA, Parsons EP, Kosma DK, Cooper BR, Park HC, AbuQamar S, Bocconcelli C, Miyazaki S, Consiglio F, Chilosi G, Bohnert HJ, Bressan RA, Mengiste T, Jenks MA** (2009) The *Arabidopsis* *RESURRECTION1* Gene Regulates a Novel Antagonistic Interaction in Plant Defense to Biotrophs and Necrotrophs. *Plant Physiology* **151**: 290-305

**Marga F, Pesacrete TC, Hasenstein KH** (2001) Biochemical analysis of elastic and rigid cuticles of *Cirsium horridulum*. *Planta* **213**: 841-848

**Martin JT, Juniper BE** (1970) The cuticle of plants. Arnolds, London

**Meyer M** (1938) Die submikroskopische Struktur der kutinisierten Zellmembranen. *Protoplasma* **29**: 552-586

**Millar AA, Clemens S, Zachgo S, Giblin EM, Taylor DC, Kunst L** (1999) *CUT1*, an *Arabidopsis* gene required for cuticular wax biosynthesis and pollen fertility, encodes a very-long- chain fatty acid condensing enzyme. *The Plant Cell* **11**: 825-838

**Moerschbacher BM, Noll U, Gorrichon L, Reisener HJ** (1990) Specific Inhibition of Lignification Breaks Hypersensitive Resistance of Wheat to Stem Rust. *Plant Physiology* **93**: 465-470

**Molina I, Ohlrogge JB, Pollard M** (2008) Deposition and localization of lipid polyester in developing seeds of *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **53**: 437-449

**Morant M, Jorgensen K, Schaller H, Pinot F, Moller BL, Werck-Reichhart D, Bak S** (2007) CYP703 is an ancient cytochrome P450 in land plants catalyzing in-chain hydroxylation of lauric acid to provide building blocks for sporopollenin synthesis in pollen. *The Plant Cell* **19**: 1473-1487

**Nawrath C** (2006) Unraveling the complex network of cuticular structure and function. *Current Opinion in Biology* **9**: 1-7

**Niederl S, Kirsch T, Riederer M, Schreiber L** (1998) Co-permeability of  $^3\text{H}$ -labeled water and  $^{14}\text{C}$ -labeled organic acids across isolated plant cuticles - Investigating cuticular paths of diffusion and predicting cuticular transpiration. *Plant Physiology* **116**: 117-123

**Nobel, P.S.** (2009) *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*, 4th edition Academic Press/Elsevier San Diego

**Ohlrogge J, Browse J** (1995) Lipid biosynthesis. *The Plant Cell* **7**: 957-970

**Panikashvili D, Savaldi-Goldstein S, Mandel T, Yifhar T, Franke RB, Hofer R, Schreiber L, Chory J, Aharoni A** (2007) The *Arabidopsis* DESPERADO/AtWBC11 transporter is required for cutin and wax secretion. *Plant Physiology* **145**: 1345-1360

**Pighin JA, Zheng HQ, Balakshin LJ, Goodman IP, Western TL, Jetter R, Kunst L, Samuels AL** (2004) Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. *Science* **306**: 702-704

**Pollard M, Beisson F, Li YH, Ohlrogge JB** (2008) Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in Plant Science* **13**: 236-246

**Pruitt RE, Vielle-Calzada JP, Ploense SE, Grossniklaus U, Lolle SJ** (2000) *FIDDLEHEAD*, a gene required to suppress epidermal cell interactions in *Arabidopsis*, encodes a putative lipid biosynthetic enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 1311-1316

**Rashotte AM, Jenks MA, Feldmann KA** (2001) Cuticular waxes on *eceriferum* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **57**: 115-123

**Reynhardt EC, Riederer M** (1991) Structure and molecular dynamics of the cuticular wax from leaves of *Citrus aurantium* L. *Journal of Physics D-Applied Physics* **24**: 478-486

**Reynhardt EC, Riederer M** (1994) Structures and molecular dynamics of plant waxes. II Cuticular waxes from leaves of *Fagus sylvatica* L. and *Hordeum vulgare* L. European Biophysics Journal **23**: 59-70

**Riederer M, Schönherr J** (1984) Accumulation and Transport of (2,4-Dichlorophenoxy) acetic acid in Plant Cuticles: 1. Sorption in the Cuticular Membrane and its Components. Ecotoxicology and Environmental Safety **8**: 236-247

**Riederer M, Schönherr J** (1985) Accumulation and transport of (2,4-Dichlorophenoxy)acetic acid in plant cuticles: 2. Permeability of the cuticular membrane. Ecotoxicology and Environmental Safety **9**: 196-208

**Roelofsen PA** (1952) On The Submicroscopic Structure Of Cuticular Cell Walls. Acta Botanica Neerlandica **1**: 99-114

**Rowland O, Lee R, Franke R, Schreiber L, Kunst L** (2007) The *CER3* wax biosynthetic gene from *Arabidopsis thaliana* is allelic to *WAX2/YRE/FLP1*. Febs Letters **581**: 3538-3544

**Rowland O, Zheng H, Hepworth SR, Lam P, Jetter R, Kunst L** (2006) *CER4* encodes an alcohol-forming fatty acyl-Coenzyme A reductase involved in cuticular wax production in *Arabidopsis*. Plant Physiology **142**: 866–77

**Rupasinghe SG, Duan H, Schuler MA** (2007) Molecular definitions of fatty acid hydroxylases in *Arabidopsis thaliana*. Proteins: Structure, Function and Bioinformatics **68**: 279-293

**Samuels L, Kunst L, Jetter R** (2008) Sealing plant surfaces: Cuticular wax formation by epidermal cells. Annual Review of Plant Biology **59**: 683-707

**Schlegel TK, Schönherr J, Schreiber L** (2005) Size selectivity of aqueous pores in stomatous cuticles of *Vicia faba* leaves. Planta **221**: 648-655

**Schnurr J, Shockey J, Browse J** (2004) The acyl-CoA synthetase encoded by *LACS2* is essential for normal cuticle development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**: 629-642

**Schnurr JA, Shockey JM, de Boer GJ, Browse JA** (2002) Fatty acid export from the chloroplast: Molecular characterization of a major plastidial acyl-Coenzyme A synthetase from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **129**:1700–9

**Schönherr J** (1976) Water permeability of isolated cuticular membranes: The effect of cuticular waxes on diffusion of water. *Planta* **131**: 159-164

**Schönherr J** (2006) Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. *Journal of Experimental Botany* **57**: 2471-2491

**Schönherr J, Bukovac MJ** (1972) Penetration of Stomata by Liquids. *Plant Physiology* **49**: 813-819

**Schönherr J, Bukovac MJ** (1978) Foliar Penetration of Succinic Acid-2,2-dimethylhydrazide: Mechanism and Rate Limiting Step. *Physiologia Plantarum* **42**: 243-257

**Schönherr J, Huber R** (1977) Plant Cuticles Are Polyelectrolytes with Isoelectric Points around Three. *Plant Physiology* **59**: 145-150

**Schönherr J, Riederer M** (1986) Plant cuticles sorb lipophilic compounds during enzymatic isolation. *Plant, Cell and Environment* **9**: 459-466

**Schönherr J, Riederer M** (1989) Foliar Penetration and Accumulation of Organic Chemicals in Plant Cuticles. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **108**: 1-70

**Schreiber L** (2010) Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. *Trends in Plant Science* doi 10.1016/j.tplants.2010.06.004

**Schreiber L, Breiner HW, Riederer M, Duggelin M, Guggenheim R** (1994) The casparian strip of *Clivia miniata* Reg. Roots: Isolation, fine structure and chemical nature. *Botanica Acta* **107**: 353-361

**Schreiber L, Riederer M** (1996a) Ecophysiology of cuticular transpiration: Comparative investigation of cuticular water permeability of plant species from different habitats. *Oecologia* **107**: 426-432

**Schreiber L, Riederer M** (1996b) Determination of diffusion coefficients of octadecanoic acid in isolated cuticular waxes and their relationship to cuticular water permeabilities. *Plant Cell and Environment* **19**: 1075-1082

**Schreiber L, Schönherr J** (1992a) Uptake of Organic Chemicals in Conifer Needles: Surface Adsorption and Permeability of Cuticles. *Environmental Science & Technology* **26**: 153-159

**Schreiber L, Schönherr J** (1992b) Analysis of foliar uptake of pesticides in barley leaves: Role of epicuticular waxes and compartmentation. *Pesticide Science* **36**: 213-221

**Schreiber L, Schönherr J** (1993) Uptake of two chlorinated chemicals in conifer needles: reversibility and compartmental analysis. *New Phytologist* **123**: 547-554

**Schreiber L, Schönherr J** (2009) Water and solute permeability of plant cuticles. Measurement and data analysis. *Springer, Heidelberg*

**Schreiber L, Skrabs M, Hartmann KD, Diamantopoulos P, Simanova E, Santrucek J** (2001) Effect of humidity on cuticular water permeability of isolated cuticular membranes and leaf disks. *Planta* **214**: 274-282

**Schroll B** (2010) Wirkstoffaufnahme an *Arabidopsis* Kutikula-Mutanten und deren Wildtypen mittels Chlorophyllfluoreszenzmessung. *Bachelorarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn*

**Shimakata T, Stumpf P** (1982) Isolation and function of spinach leaf  $\beta$ -ketoacyl [acyl-carrier-protein] synthases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **79**: 5808-12

**Sieber P, Schorderet M, Ryser U, Buchala A, Kolattukudy P, Metraux J-P, Nawrath C** (2000) Transgenic Arabidopsis Plants Expressing a Fungal Cutinase Show Alterations in the Structure and Properties of the Cuticle and Postgenital Organ Fusions. The Plant Cell **12**: 721-738

**Silcox D, Holloway PJ** (1986) Techniques suitable for the determination of foliar uptake, movement and metabolism of nonionic surfactants. Aspects of Applied Biology **11**: 1-11

**Sitte P, Rennie R** (1963) Untersuchungen an cuticularen Zellwandschichten. Planta **60**: 19-40

**Strand A, Hurry V, Henkes S, Huner N, Gustafsson P, Gardestrom P, 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 Physiology **119**: 1387-1398

**Suh MC, Samuels AL, Jetter R, Kunst L, Pollard M, Ohlrogge J, Beisson F** (2005) Cuticular lipid composition, surface structure, and gene expression in *Arabidopsis* stem epidermis. Plant Physiology **139**: 1649-1665

**Tanaka T, Tanaka H, Machida C, Watanabe M, Machida Y** (2004) A new method for rapid visualization of defects in leaf cuticle reveals five intrinsic patterns of surface defects in *Arabidopsis*. The Plant Journal **37**: 139-146

**Todd J, Post-Beittenmiller D, Jaworski JG** (1999) *KCS1* encodes a fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase affecting wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal **17**: 119-130

**Tukey HB** (1970) The leaching of substances from plants. Annual Review of Plant Physiology **21**: 305-324

**Villena JF, Dominguez E, Stewart D, Heredia A** (1999) Characterization and biosynthesis of non-degradable polymers in plant cuticles. Planta **208**: 181-187

**Walker GP** (1988) The role of leaf cuticles in leaf age preference by bayberry whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) on lemon. Annual Entomological Society American **81**: 365-369

**Walton TJ** (1990) Waxes, Cutin and Suberin. Methods in Plant Biochemistry **4**: 105-158

**Wattendorf J, Holloway PJ** (1980) Studies on the Ultrastructure and Histochemistry of Plant Cuticles: The Cuticular Membrane of *Agave americana* L. in situ. Annals of Botany **46**: 13-28

**Wellesen K, Durst F, Pinot F, Benveniste I, Nettesheim K, Wisman E, Steiner-Lange S, Saedler H, Yephremov A** (2001) Functional analysis of the LACERATA gene of *Arabidopsis* provides evidence for different robes of fatty acid omega-hydroxylation in development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**: 9694-9699

**Xia YJ, Nicolau BJ, Schnable PS** (1996) Cloning and characterization of *CER2*, an *Arabidopsis* gene that affects cuticular wax accumulation. The Plant Cell **8**: 1291-1304

**Xiao FM, Goodwin SM, Xiao YM, Sun ZY, Baker D, Tang XY, Jenks MA, Zhou JM** (2004) *Arabidopsis* CYP86A2 represses *Pseudomonas syringae* type III genes and is required for cuticle development. EMBO Journal **23**: 2903-2913

**Yephremov A, Wisman E, Huijser P, Huijser C, Wellesen K, Saedler H (1999)** Characterization of the *FIDDLEHEAD* gene of *Arabidopsis* reveals a link between adhesion response and cell differentiation in the epidermis. *The Plant Cell* **11**: 2187-2201

**Zheng H, Rowland O, Kunst L (2005)** Disruptions of the *Arabidopsis* enoyl-CoA reductase gene reveal an essential role for very-long-chain fatty acid synthesis in cell expansion during plant morphogenesis. *The Plant Cell* **17**: 1467–81

---

## **8. Anhang**

## 8.1. Wachs- und Kutinzusammensetzungen der Wildtypen

Tab. 8.1.1. Wachszusammensetzung von den Wildtypen Col-8, Col-0, Ler und Ws (absolut). Wachsmenge und -zusammensetzung der Wildtypen. Dargestellt sind die absoluten Werte ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) in Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung.

| Wachsmonomer (Kettenlänge)           | <u>Absolute Menge Wachs (<math>\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}</math>)</u> |               |               |               |               |               |               |               |
|--------------------------------------|---|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                                      | Col-8   |               | Col-0         |               | Ler           |               | Ws            |               |
|                                      | MW  | SA            | MW            | SA            | MW            | SA            | MW            | SA            |
| <b>Säuren</b>                        | <b>0,0927</b>   | <b>0,0207</b> | <b>0,1132</b> | <b>0,0180</b> | <b>0,0858</b> | <b>0,0269</b> | <b>0,0849</b> | <b>0,0127</b> |
| Tetracosansäure (C <sub>24</sub> )   | 0,0177  | 0,0036        | 0,0218        | 0,0054        | 0,0151        | 0,0028        | 0,0167        | 0,0035        |
| Hexacosansäure (C <sub>26</sub> )    | 0,0451  | 0,0093        | 0,0449        | 0,0081        | 0,0260        | 0,0033        | 0,0292        | 0,0037        |
| Octacosansäure (C <sub>28</sub> )    | 0,0056  | 0,0016        | 0,0082        | 0,0017        | 0,0080        | 0,0025        | 0,0063        | 0,0012        |
| Triacosansäure (C <sub>30</sub> )    | 0,0049  | 0,0028        | 0,0081        | 0,0014        | 0,0075        | 0,0057        | 0,0064        | 0,0021        |
| Dotriacontansäure (C <sub>32</sub> ) | 0,0103  | 0,0040        | 0,0138        | 0,0055        | 0,0171        | 0,0098        | 0,0134        | 0,0032        |
| Tetracontansäure (C <sub>34</sub> )  | 0,0090  | 0,0053        | 0,0163        | 0,0045        | 0,0120        | 0,0081        | 0,0129        | 0,0035        |
| <b>Aldehyde</b>                      | <b>0,1185</b>   | <b>0,0216</b> | <b>0,1258</b> | <b>0,0288</b> | <b>0,1243</b> | <b>0,0362</b> | <b>0,1182</b> | <b>0,0122</b> |
| Octacosanal (C <sub>28</sub> )       | 0,0085  | 0,0020        | 0,0100        | 0,0018        | 0,0092        | 0,0036        | 0,0099        | 0,0009        |
| Triacosanal (C <sub>30</sub> )       | 0,0199  | 0,0037        | 0,0256        | 0,0103        | 0,0334        | 0,0162        | 0,0208        | 0,0016        |
| Dotriacontanal (C <sub>32</sub> )    | 0,0569  | 0,0084        | 0,0563        | 0,0095        | 0,0552        | 0,0087        | 0,0517        | 0,0035        |
| Tetracontanal (C <sub>34</sub> )     | 0,0332  | 0,0075        | 0,0339        | 0,0072        | 0,0263        | 0,0077        | 0,0358        | 0,0062        |
| <b>Alkohole</b>                      | <b>0,2797</b>   | <b>0,0422</b> | <b>0,3069</b> | <b>0,0744</b> | <b>0,2999</b> | <b>0,0564</b> | <b>0,3118</b> | <b>0,0450</b> |
| Hexacosanol (C <sub>26</sub> )       | 0,0237  | 0,0091        | 0,0233        | 0,0091        | 0,0426        | 0,0097        | 0,0524        | 0,0074        |
| Octacosanol (C <sub>28</sub> )       | 0,0388  | 0,0067        | 0,0389        | 0,0109        | 0,0532        | 0,0141        | 0,0615        | 0,0100        |
| Triacosanol (C <sub>30</sub> )       | 0,0534  | 0,0051        | 0,0609        | 0,0045        | 0,0638        | 0,0070        | 0,0668        | 0,0079        |
| Hentriacontanol (C <sub>31</sub> )   | 0,0052  | 0,0011        | 0,0076        | 0,0024        | 0,0056        | 0,0034        | 0,0065        | 0,0022        |
| Dotriacontanol (C <sub>32</sub> )    | 0,1386  | 0,0178        | 0,1566        | 0,0422        | 0,1137        | 0,0185        | 0,0912        | 0,0143        |
| Tetracontanol (C <sub>34</sub> )     | 0,0201  | 0,0023        | 0,0196        | 0,0052        | 0,0209        | 0,0038        | 0,0333        | 0,0032        |
| <b>Alkane</b>                        | <b>0,1303</b>   | <b>0,0296</b> | <b>0,1441</b> | <b>0,0298</b> | <b>0,1797</b> | <b>0,0475</b> | <b>0,1827</b> | <b>0,0448</b> |
| Nonacosan (C <sub>29</sub> )         | 0,0475  | 0,0113        | 0,0596        | 0,0161        | 0,0828        | 0,0260        | 0,0653        | 0,0234        |
| Hentriacontan (C <sub>31</sub> )     | 0,0578  | 0,0126        | 0,0591        | 0,0102        | 0,0692        | 0,0173        | 0,0877        | 0,0159        |
| Trtriacontan (C <sub>33</sub> )      | 0,0249  | 0,0057        | 0,0253        | 0,0035        | 0,0276        | 0,0042        | 0,0298        | 0,0056        |
| <b>Total</b>                         | <b>0,6212</b>   | <b>0,0879</b> | <b>0,6899</b> | <b>0,0818</b> | <b>0,6896</b> | <b>0,0722</b> | <b>0,6977</b> | <b>0,0742</b> |

Tab. 8.1.2. **Wachszusammensetzung von den Wildtypen Col-8, Col-0, Ler und Ws (prozentual).**  
Wachsmenge und -zusammensetzung der Wildtypen. Dargestellt sind die prozentualen Werte (%) in Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung.

| Wachsmonomer (Kettenlänge)              | <b>Absolute Menge Wachs (%)</b> |             |              |             |              |             |              |             |
|---|---------------------------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
|   | Col-8                           |             | Col-0        |             | Ler          |             | Ws           |             |
|   | MW                              | SA          | MW           | SA          | MW           | SA          | MW           | SA          |
| <b>Säuren</b>                           | <b>14.81</b>                    | <b>1.74</b> | <b>16.36</b> | <b>0.96</b> | <b>12.31</b> | <b>2.83</b> | <b>12.17</b> | <b>1.30</b> |
| Tetracosansäure (C <sub>24</sub> )      | 2.85                            | 0.42        | 3.24         | 1.15        | 2.20         | 0.41        | 2.38         | 0.37        |
| Hexacosansäure (C <sub>26</sub> )       | 7.22                            | 0.64        | 6.47         | 0.52        | 3.78         | 0.42        | 4.19         | 0.45        |
| Octacosansäure (C <sub>28</sub> )       | 0.91                            | 0.23        | 1.19         | 0.17        | 1.14         | 0.26        | 0.90         | 0.13        |
| Triacotansäure (C <sub>30</sub> )       | 0.77                            | 0.35        | 1.17         | 0.17        | 1.06         | 0.72        | 0.91         | 0.25        |
| Dotriacontansäure (C <sub>32</sub> )    | 1.65                            | 0.56        | 1.95         | 0.59        | 2.43         | 1.18        | 1.91         | 0.33        |
| Tetratriacontansäure (C <sub>34</sub> ) | 1.41                            | 0.77        | 2.34         | 0.44        | 1.70         | 1.05        | 1.88         | 0.56        |
| <b>Aldehyde</b>                         | <b>19.14</b>                    | <b>2.35</b> | <b>18.47</b> | <b>3.31</b> | <b>18.35</b> | <b>5.52</b> | <b>17.06</b> | <b>1.91</b> |
| Octacosanal (C <sub>28</sub> )          | 1.37                            | 0.25        | 1.49         | 0.44        | 1.39         | 0.69        | 1.43         | 0.07        |
| Triacotantal (C <sub>30</sub> )         | 3.23                            | 0.50        | 3.88         | 2.15        | 5.03         | 2.98        | 2.99         | 0.16        |
| Dotriacontantal (C <sub>32</sub> )      | 9.21                            | 1.09        | 8.17         | 1.14        | 8.09         | 1.62        | 7.45         | 0.64        |
| Tetratriacontantal (C <sub>34</sub> )   | 5.34                            | 0.80        | 4.92         | 0.97        | 3.84         | 1.16        | 5.20         | 1.13        |
| <b>Alkohole</b>                         | <b>45.20</b>                    | <b>2.05</b> | <b>44.09</b> | <b>4.59</b> | <b>43.45</b> | <b>3.19</b> | <b>44.72</b> | <b>1.83</b> |
| Hexacosanol (C <sub>26</sub> )          | 3.71                            | 1.05        | 3.31         | 1.01        | 6.16         | 1.12        | 7.51         | 0.58        |
| Octacosanol (C <sub>28</sub> )          | 6.22                            | 0.40        | 5.54         | 1.08        | 7.67         | 1.75        | 8.79         | 0.68        |
| Triacotanol (C <sub>30</sub> )          | 8.64                            | 0.46        | 8.88         | 0.60        | 9.29         | 0.89        | 9.61         | 1.00        |
| Hentriacontanol (C <sub>31</sub> )      | 0.86                            | 0.25        | 1.12         | 0.38        | 0.83         | 0.52        | 0.91         | 0.24        |
| Dotriacontanol (C <sub>32</sub> )       | 22.45                           | 2.26        | 22.38        | 3.92        | 16.48        | 2.19        | 13.11        | 2.02        |
| Tetratriacontanol (C <sub>34</sub> )    | 3.32                            | 0.78        | 2.85         | 0.75        | 3.03         | 0.47        | 4.78         | 0.34        |
| <b>Alkane</b>                           | <b>20.85</b>                    | <b>2.28</b> | <b>21.08</b> | <b>3.98</b> | <b>25.88</b> | <b>4.59</b> | <b>26.04</b> | <b>4.08</b> |
| Nonacosan (C <sub>29</sub> )            | 7.62                            | 1.08        | 8.83         | 3.07        | 11.86        | 2.79        | 9.24         | 2.62        |
| Hentriacontan (C <sub>31</sub> )        | 9.24                            | 1.10        | 8.57         | 1.11        | 9.99         | 2.13        | 12.54        | 1.50        |
| Trtriacontan (C <sub>33</sub> )         | 3.99                            | 0.61        | 3.68         | 0.35        | 4.03         | 0.66        | 4.26         | 0.54        |
| <b>Total</b>                            | <b>100</b>                      | <b>-</b>    | <b>100</b>   | <b>-</b>    | <b>100</b>   | <b>-</b>    | <b>100</b>   | <b>-</b>    |

## 8.2. Wachszusammensetzungen der Mutanten

Tab. 8.2.1. **Wachszusammensetzung von wax2.** Wachsmenge und -zusammensetzung von der Mutante wax2 im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Col-8. Dargestellt sind die absoluten ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) und die prozentualen Mengen (%) in Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung.

| Wachsmonomer (Kettenlänge)              | <u>Absolute Menge Wachs (<math>\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}</math>)</u> |               |               |               | <u>Relative Menge Wachs (%)</u> |             |              |             |
|---|---|---------------|---------------|---------------|---------------------------------|-------------|--------------|-------------|
|   | Col-8   |               | wax2          |               | Col-8                           |             | wax2         |             |
|   | MW  | SA            | MW            | SA            | MW                              | SA          | MW           | SA          |
| <b>Säuren</b>                           | <b>0,1079</b>   | <b>0,0173</b> | <b>0,0820</b> | <b>0,0237</b> | <b>16,68</b>                    | <b>0,84</b> | <b>59,48</b> | <b>6,90</b> |
| Tetracosansäure (C <sub>24</sub> )      | 0,0101  | 0,0010        | 0,0057        | 0,0010        | 1,57                            | 0,09        | 4,30         | 0,71        |
| Hexacosansäure (C <sub>26</sub> )       | 0,0473  | 0,0072        | 0,0339        | 0,0043        | 7,32                            | 0,48        | 25,31        | 2,91        |
| Octacosansäure (C <sub>28</sub> )       | 0,0106  | 0,0020        | 0,0091        | 0,0018        | 1,63                            | 0,15        | 6,75         | 0,68        |
| Triacosansäure (C <sub>30</sub> )       | 0,0076  | 0,0017        | 0,0021        | 0,0017        | 1,17                            | 0,13        | 1,37         | 1,00        |
| Dotriacontansäure (C <sub>32</sub> )    | 0,0140  | 0,0041        | 0,0074        | 0,0033        | 2,15                            | 0,51        | 5,20         | 1,50        |
| Tritriacontansäure (C <sub>33</sub> )   | 0,0000  | 0,0000        | 0,0025        | 0,0019        | 0,00                            | 0,00        | 1,70         | 1,22        |
| Tetratriacontansäure (C <sub>34</sub> ) | 0,0184  | 0,0046        | 0,0213        | 0,0107        | 2,83                            | 0,55        | 14,87        | 5,89        |
| <b>Aldehyde</b>                         | <b>0,1267</b>   | <b>0,0209</b> | -             | -             | <b>19,60</b>                    | <b>1,72</b> | -            | -           |
| Octacosanal (C <sub>28</sub> )          | 0,0116  | 0,0017        | -             | -             | 1,79                            | 0,12        | -            | -           |
| Triacosanal (C <sub>30</sub> )          | 0,0197  | 0,0038        | -             | -             | 3,04                            | 0,30        | -            | -           |
| Dotriacontanal (C <sub>32</sub> )       | 0,0528  | 0,0098        | -             | -             | 8,16                            | 0,93        | -            | -           |
| Tetratriacontanal (C <sub>34</sub> )    | 0,0426  | 0,0062        | -             | -             | 6,61                            | 0,54        | -            | -           |
| <b>Alkohole</b>                         | <b>0,2395</b>   | <b>0,0300</b> | <b>0,0537</b> | <b>0,0057</b> | <b>37,15</b>                    | <b>0,83</b> | <b>40,52</b> | <b>6,90</b> |
| Hexacosanol (C <sub>26</sub> )          | 0,0243  | 0,0051        | 0,0151        | 0,0017        | 3,74                            | 0,43        | 11,44        | 2,13        |
| Octacosanol (C <sub>28</sub> )          | 0,0458  | 0,0086        | 0,0326        | 0,0029        | 7,10                            | 0,88        | 24,62        | 4,34        |
| Triacosanol (C <sub>30</sub> )          | 0,0517  | 0,0064        | 0,0034        | 0,0004        | 8,01                            | 0,10        | 2,58         | 0,71        |
| Hentriacontanol (C <sub>31</sub> )      | 0,0048  | 0,0012        | -             | -             | 0,74                            | 0,11        | -            | -           |
| Dotriacontanol (C <sub>32</sub> )       | 0,0966  | 0,0099        | 0,0026        | 0,0015        | 15,01                           | 0,44        | 1,87         | 0,76        |
| Tetratriacontanol (C <sub>34</sub> )    | 0,0164  | 0,0018        | -             | -             | 2,54                            | 0,18        | -            | -           |
| <b>Alkane</b>                           | <b>0,1703</b>   | <b>0,0133</b> | -             | -             | <b>26,56</b>                    | <b>1,95</b> | -            | -           |
| Nonacosan (C <sub>29</sub> )            | 0,0492  | 0,0045        | -             | -             | 7,67                            | 0,59        | -            | -           |
| Hentriacontan (C <sub>31</sub> )        | 0,0921  | 0,0064        | -             | -             | 14,38                           | 1,12        | -            | -           |
| Tritriacontan (C <sub>33</sub> )        | 0,0290  | 0,0028        | -             | -             | 4,52                            | 0,33        | -            | -           |
| <b>Total</b>                            | <b>0,6444</b>   | <b>0,0752</b> | <b>0,1357</b> | <b>0,0257</b> | <b>100</b>                      | -           | <b>100</b>   | -           |

Tab. 8.2.2. **Kutinzusammensetzung von wax2.** Kutinmenge und -zusammensetzung von der Mutante wax2 im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Col-8. Dargestellt sind die absoluten Werte in Bezug auf die Fläche ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) und dem Trockengewicht der extrahierten Blätter ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}_\text{ig}^{-1}$ ) in Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung.

| Kutinmonomer (Kettenlänge)                              | Absolute Menge Kutin ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) |               |               |               | Absolute Menge Kutin ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}_{\text{kg}}^{-1}$ ) |               |               |               |
|---|---|---------------|---------------|---------------|---|---------------|---------------|---------------|
|   | Col-8   |               | wax2          |               | Col-8   |               | wax2          |               |
|   | Mw  | Sa            | Mw            | Sa            | Mw  | Sa            | Mw            | Sa            |
| <b>Säuren</b>   | <b>0,7768</b>   | <b>0,2367</b> | <b>0,8537</b> | <b>0,1096</b> | <b>1,3912</b>   | <b>0,2503</b> | <b>1,3459</b> | <b>0,1493</b> |
| Hexadecansäure (C <sub>16</sub> )                       | 0,3285  | 0,0930        | 0,3719        | 0,0355        | 0,5893  | 0,0938        | 0,5863        | 0,0433        |
| Octadecansäure (C <sub>18</sub> )                       | 0,0127  | 0,0034        | 0,0126        | 0,0012        | 0,0231  | 0,0060        | 0,0199        | 0,0017        |
| Octadecensäure (C <sub>18 (1)</sub> )                   | 0,0455  | 0,0212        | 0,0464        | 0,0114        | 0,0805  | 0,0273        | 0,0731        | 0,0164        |
| Octadecadiensäure (C <sub>18 (2)</sub> )                | 0,1529  | 0,0580        | 0,1621        | 0,0213        | 0,2723  | 0,0688        | 0,2561        | 0,0370        |
| Octadecatriensäure (C <sub>18 (3)</sub> )               | 0,1326  | 0,0532        | 0,1377        | 0,0180        | 0,2358  | 0,0647        | 0,2170        | 0,0229        |
| Eicosansäure (C <sub>20</sub> )                         | 0,0074  | 0,0026        | 0,0088        | 0,0026        | 0,0131  | 0,0030        | 0,0138        | 0,0035        |
| Docosansäure (C <sub>22</sub> )                         | 0,0222  | 0,0032        | 0,0295        | 0,0075        | 0,0403  | 0,0016        | 0,0463        | 0,0101        |
| Tricosansäure (C <sub>23</sub> )                        | 0,0026  | 0,0017        | 0,0022        | 0,0005        | 0,0046  | 0,0027        | 0,0035        | 0,0007        |
| Tetracosansäure (C <sub>24</sub> )                      | 0,0518  | 0,0052        | 0,0659        | 0,0142        | 0,0943  | 0,0036        | 0,1035        | 0,0185        |
| Pentacosansäure (C <sub>25</sub> )                      | 0,0052  | 0,0009        | 0,0053        | 0,0012        | 0,0095  | 0,0022        | 0,0084        | 0,0015        |
| Triacotansäure (C <sub>30</sub> )                       | 0,0035  | 0,0017        | 0,0034        | 0,0017        | 0,0064  | 0,0035        | 0,0054        | 0,0024        |
| Ditriacotansäure (C <sub>32</sub> )                     | 0,0020  | 0,0018        | 0,0025        | 0,0014        | 0,0040  | 0,0035        | 0,0040        | 0,0021        |
| Tetracontansäure (C <sub>34</sub> )                     | 0,0098  | 0,0009        | 0,0055        | 0,0030        | 0,0179  | 0,0020        | 0,0088        | 0,0052        |
| <b>Alkohole</b>   | <b>0,0350</b>   | <b>0,0061</b> | <b>0,0305</b> | <b>0,0064</b> | <b>0,0632</b>   | <b>0,0034</b> | <b>0,0483</b> | <b>0,0106</b> |
| Hexadecanol (C <sub>16</sub> )                          | 0,0063  | 0,0001        | 0,0066        | 0,0021        | 0,0115  | 0,0011        | 0,0105        | 0,0036        |
| Octadecanol (C <sub>18</sub> )                          | 0,0168  | 0,0030        | 0,0222        | 0,0080        | 0,0303  | 0,0028        | 0,0349        | 0,0121        |
| Hexacosanol (C <sub>26</sub> )                          | 0,0047  | 0,0018        | 0,0003        | 0,0005        | 0,0084  | 0,0024        | 0,0004        | 0,0008        |
| Octacosanol (C <sub>28</sub> )                          | 0,0072  | 0,0017        | 0,0015        | 0,0002        | 0,0130  | 0,0017        | 0,0024        | 0,0002        |
| <b><math>\omega</math>-Hydroxysäuren</b>                | <b>0,0107</b>   | <b>0,0032</b> | <b>0,0085</b> | <b>0,0014</b> | <b>0,0192</b>   | <b>0,0034</b> | <b>0,0133</b> | <b>0,0015</b> |
| Hydroxyhexadecansäure (C <sub>16</sub> )                | 0,0107  | 0,0032        | 0,0085        | 0,0014        | 0,0192  | 0,0034        | 0,0133        | 0,0015        |
| <b><math>\alpha</math>-<math>\omega</math>-Disäuren</b> | <b>0,4639</b>   | <b>0,0501</b> | <b>0,4460</b> | <b>0,0220</b> | <b>0,8431</b>   | <b>0,0125</b> | <b>0,7043</b> | <b>0,0444</b> |
| Hexadecan-1,16-disäure (C <sub>16</sub> )               | 0,0602  | 0,0014        | 0,0450        | 0,0028        | 0,1103  | 0,0112        | 0,0711        | 0,0059        |
| Octadecan-1,18-disäure (C <sub>18</sub> )               | 0,0139  | 0,0016        | 0,0102        | 0,0005        | 0,0252  | 0,0003        | 0,0162        | 0,0015        |
| Octadecen-1,18-disäure (C <sub>18 (1)</sub> )           | 0,0596  | 0,0061        | 0,0485        | 0,0065        | 0,1084  | 0,0017        | 0,0766        | 0,0103        |
| Octadecadien-1,18-disäure (C <sub>18 (2)</sub> )        | 0,3302  | 0,0417        | 0,3423        | 0,0129        | 0,5993  | 0,0088        | 0,5405        | 0,0283        |
| <b>2-Hydroxysäuren</b>                                  | <b>0,5141</b>   | <b>0,0609</b> | <b>0,5869</b> | <b>0,0958</b> | <b>0,9400</b>   | <b>0,1390</b> | <b>0,9224</b> | <b>0,1067</b> |
| 2-Hydroxyhexadecansäure (C <sub>16</sub> )              | 0,0317  | 0,0054        | 0,0366        | 0,0068        | 0,0577  | 0,0094        | 0,0575        | 0,0072        |
| 2-Hydroxyeicosansäure (C <sub>20</sub> )                | 0,0043  | 0,0012        | 0,0057        | 0,0015        | 0,0077  | 0,0017        | 0,0090        | 0,0026        |
| 2-Hydroxydocosansäure (C <sub>22</sub> )                | 0,0456  | 0,0062        | 0,0560        | 0,0095        | 0,0836  | 0,0149        | 0,0879        | 0,0103        |
| 2-Hydroxytricosansäure (C <sub>23</sub> )               | 0,0062  | 0,0017        | 0,0084        | 0,0012        | 0,0112  | 0,0021        | 0,0131        | 0,0011        |
| 2-Hydroxytetracosansäure (C <sub>24</sub> )             | 0,2060  | 0,0264        | 0,2411        | 0,0373        | 0,3769  | 0,0610        | 0,3789        | 0,0404        |
| 2-Hydroxytetracosensäure (C <sub>24 (1)</sub> )         | 0,1277  | 0,0097        | 0,1426        | 0,0276        | 0,2335  | 0,0257        | 0,2241        | 0,0343        |
| 2-Hydroxypentacosansäure (C <sub>25</sub> )             | 0,0114  | 0,0022        | 0,0121        | 0,0018        | 0,0208  | 0,0041        | 0,0191        | 0,0017        |
| 2-Hydroxypentacosensäure (C <sub>25 (1)</sub> )         | 0,0073  | 0,0008        | 0,0080        | 0,0013        | 0,0134  | 0,0019        | 0,0126        | 0,0014        |
| 2-Hydroxyhexacosansäure (C <sub>26</sub> )              | 0,0538  | 0,0069        | 0,0560        | 0,0084        | 0,0985  | 0,0165        | 0,0881        | 0,0093        |
| 2-Hydroxyhexacosensäure (C <sub>26 (1)</sub> )          | 0,0144  | 0,0013        | 0,0147        | 0,0022        | 0,0264  | 0,0041        | 0,0231        | 0,0029        |
| 2-Hydroxyheptacosansäure (C <sub>27</sub> )             | 0,0056  | 0,0009        | 0,0058        | 0,0010        | 0,0103  | 0,0022        | 0,0090        | 0,0010        |
| <b>"midchain" oxygenierte Hydroxysäure</b>              | <b>0,0157</b>   | <b>0,0129</b> | <b>0,0056</b> | <b>0,0008</b> | <b>0,0294</b>   | <b>0,0256</b> | <b>0,0088</b> | <b>0,0009</b> |
| 9 (10),16-Dihydroxyhexadecansäure (C <sub>16</sub> )    | 0,0157  | 0,0129        | 0,0056        | 0,0008        | 0,0294  | 0,0256        | 0,0088        | 0,0009        |
| <b>Total</b>  | <b>1,8161</b>   | <b>0,3138</b> | <b>1,9312</b> | <b>0,1952</b> | <b>3,2862</b>   | <b>0,2216</b> | <b>3,0429</b> | <b>0,2137</b> |

Tab. 8.2.3. **Wachszusammensetzung von cer3.** Wachsmenge und -zusammensetzung von der Mutante cer3 im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Col-0. Dargestellt sind die absoluten ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) und die prozentualen Mengen (%) in Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung.

| Wachsmonomer (Kettenlänge)             | Absolute Menge Wachs ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) |               |               |               | Relative Menge Wachs (%) |             |              |             |
|--|---|---------------|---------------|---------------|--------------------------|-------------|--------------|-------------|
|  | Col-0   |               | cer3          |               | Col-0                    |             | cer3         |             |
|  | MW  | SA            | MW            | SA            | MW                       | SA          | MW           | SA          |
| <b>Säuren</b>                          | <b>0,0754</b>   | <b>0,0220</b> | <b>0,0479</b> | <b>0,0069</b> | <b>17,52</b>             | <b>3,84</b> | <b>69,48</b> | <b>5,61</b> |
| Tetracosansäure (C <sub>24</sub> )     | 0,0082  | 0,0015        | 0,0056        | 0,0006        | 1,93                     | 0,20        | 8,22         | 1,08        |
| Hexacosansäure (C <sub>26</sub> )      | 0,0339  | 0,0076        | 0,0241        | 0,0022        | 7,91                     | 1,03        | 35,27        | 3,58        |
| Octacosansäure (C <sub>28</sub> )      | 0,0087  | 0,0008        | -             | -             | 2,06                     | 0,09        | -            | -           |
| Triacosansäure (C <sub>30</sub> )      | 0,0037  | 0,0014        | 0,0050        | 0,0013        | 0,86                     | 0,26        | 7,25         | 1,16        |
| Dotriacosansäure (C <sub>32</sub> )    | 0,0111  | 0,0033        | 0,0131        | 0,0044        | 2,61                     | 0,78        | 18,75        | 4,84        |
| Tetratriacosansäure (C <sub>34</sub> ) | 0,0096  | 0,0090        | -             | -             | 2,15                     | 1,98        | -            | -           |
| <b>Aldehyde</b>                        | <b>0,0893</b>   | <b>0,0128</b> | -             | -             | <b>20,93</b>             | <b>0,78</b> | -            | -           |
| Octacosanal (C <sub>28</sub> )         | 0,0086  | 0,0007        | -             | -             | 2,04                     | 0,25        | -            | -           |
| Triacosanal (C <sub>30</sub> )         | 0,0153  | 0,0012        | -             | -             | 3,62                     | 0,21        | -            | -           |
| Dotriacosanal (C <sub>32</sub> )       | 0,0396  | 0,0042        | -             | -             | 9,31                     | 0,15        | -            | -           |
| Tetratriacosanal (C <sub>34</sub> )    | 0,0257  | 0,0076        | -             | -             | 5,95                     | 1,17        | -            | -           |
| <b>Alkohole</b>                        | <b>0,1526</b>   | <b>0,0100</b> | <b>0,0212</b> | <b>0,0054</b> | <b>36,02</b>             | <b>2,12</b> | <b>30,52</b> | <b>5,61</b> |
| Hexacosanol (C <sub>26</sub> )         | 0,0096  | 0,0017        | 0,0069        | 0,0018        | 2,25                     | 0,36        | 9,88         | 1,87        |
| Octacosanol (C <sub>28</sub> )         | 0,0202  | 0,0027        | 0,0143        | 0,0036        | 4,74                     | 0,41        | 20,64        | 3,74        |
| Nonacosanol (C <sub>29</sub> )         | 0,0007  | 0,0005        | -             | -             | 0,17                     | 0,10        | 0,00         | 0,00        |
| Triacosanol (C <sub>30</sub> )         | 0,0344  | 0,0016        | -             | -             | 8,13                     | 0,59        | 0,00         | 0,00        |
| Hentriacosanol (C <sub>31</sub> )      | 0,0029  | 0,0007        | -             | -             | 0,68                     | 0,13        | 0,00         | 0,00        |
| Dotriacosanol (C <sub>32</sub> )       | 0,0707  | 0,0035        | -             | -             | 16,70                    | 1,19        | 0,00         | 0,00        |
| Tetratriacosanol (C <sub>34</sub> )    | 0,0142  | 0,0011        | -             | -             | 3,35                     | 0,17        | 0,00         | 0,00        |
| <b>Alkane</b>                          | <b>0,1083</b>   | <b>0,0136</b> | -             | -             | <b>25,53</b>             | <b>2,73</b> | -            | -           |
| Nonacosan (C <sub>29</sub> )           | 0,0324  | 0,0030        | -             | -             | 7,64                     | 0,55        | -            | -           |
| Hentriacosan (C <sub>31</sub> )        | 0,0563  | 0,0078        | -             | -             | 13,31                    | 1,98        | -            | -           |
| Triacosan (C <sub>33</sub> )           | 0,0197  | 0,0041        | -             | -             | 4,59                     | 0,55        | -            | -           |
| <b>Total</b>                           | <b>0,4256</b>   | <b>0,0482</b> | <b>0,0691</b> | <b>0,0094</b> | <b>100</b>               | <b>-</b>    | <b>100</b>   | <b>-</b>    |

Tab. 8.2.4. **Wachszusammensetzung von yre.** Wachsmenge und -zusammensetzung von der Mutante yre im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Col-0. Dargestellt sind die absoluten ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) und die prozentualen Mengen (%) in Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung.

| Wachsmonomer (Kettenlänge)              | Absolute Menge Wachs ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) |               |               |               | Relative Menge Wachs (%) |             |              |             |
|---|---|---------------|---------------|---------------|--------------------------|-------------|--------------|-------------|
|   | Col-0   |               | yre           |               | Col-0                    |             | yre          |             |
|   | MW  | SA            | MW            | SA            | MW                       | SA          | MW           | SA          |
| <b>Säuren</b>                           | <b>0,1088</b>   | <b>0,0062</b> | <b>0,0965</b> | <b>0,0145</b> | <b>19,28</b>             | <b>0,62</b> | <b>72,92</b> | <b>1,52</b> |
| Tetracosansäure (C <sub>24</sub> )      | 0,0089  | 0,0010        | 0,0078        | 0,0011        | 1,58                     | 0,18        | 5,90         | 0,71        |
| Hexacosansäure (C <sub>26</sub> )       | 0,0407  | 0,0045        | 0,0370        | 0,0054        | 7,21                     | 0,70        | 28,06        | 2,57        |
| Octacosansäure (C <sub>28</sub> )       | 0,0112  | 0,0008        | 0,0104        | 0,0016        | 1,99                     | 0,07        | 7,87         | 0,31        |
| Triacosansäure (C <sub>30</sub> )       | 0,0062  | 0,0006        | 0,0033        | 0,0006        | 1,09                     | 0,09        | 2,50         | 0,20        |
| Dotriacontansäure (C <sub>32</sub> )    | 0,0144  | 0,0023        | 0,0085        | 0,0015        | 2,55                     | 0,35        | 6,44         | 0,32        |
| Tritriacontansäure (C <sub>33</sub> )   | 0,0047  | 0,0008        | 0,0033        | 0,0012        | 0,84                     | 0,13        | 1,95         | 1,20        |
| Tetratriacontansäure (C <sub>34</sub> ) | 0,0226  | 0,0028        | 0,0268        | 0,0056        | 4,01                     | 0,51        | 20,21        | 2,33        |
| <b>Aldehyde</b>                         | <b>0,1204</b>   | <b>0,0068</b> | -             | -             | <b>21,39</b>             | <b>1,80</b> | -            | -           |
| Octacosanal (C <sub>28</sub> )          | 0,0119  | 0,0006        | -             | -             | 2,12                     | 0,11        | -            | -           |
| Triacosanal (C <sub>30</sub> )          | 0,0200  | 0,0009        | -             | -             | 3,54                     | 0,25        | -            | -           |
| Dotriacontanal (C <sub>32</sub> )       | 0,0504  | 0,0022        | -             | -             | 8,95                     | 0,54        | -            | -           |
| Tetratriacontanal (C <sub>34</sub> )    | 0,0380  | 0,0058        | -             | -             | 6,77                     | 1,19        | -            | -           |
| <b>Alkohole</b>                         | <b>0,2034</b>   | <b>0,0177</b> | <b>0,0355</b> | <b>0,0026</b> | <b>36,00</b>             | <b>1,64</b> | <b>27,08</b> | <b>1,52</b> |
| Hexacosanol (C <sub>26</sub> )          | 0,0183  | 0,0044        | 0,0108        | 0,0006        | 3,22                     | 0,64        | 8,27         | 0,84        |
| Octacosanol (C <sub>28</sub> )          | 0,0357  | 0,0064        | 0,0223        | 0,0019        | 6,29                     | 0,86        | 17,00        | 0,80        |
| Nonacosanol (C <sub>29</sub> )          | 0,0013  | 0,0004        | -             | -             | 0,24                     | 0,06        | -            | -           |
| Triacosanol (C <sub>30</sub> )          | 0,0430  | 0,0026        | 0,0024        | 0,0004        | 7,63                     | 0,27        | 1,81         | 0,17        |
| Hentriacontanol (C <sub>31</sub> )      | 0,0039  | 0,0010        | -             | -             | 0,68                     | 0,15        | -            | -           |
| Dotriacontanol (C <sub>32</sub> )       | 0,0814  | 0,0036        | -             | -             | 14,44                    | 0,70        | -            | -           |
| Tritriacontanol (C <sub>33</sub> )      | 0,0023  | 0,0006        | -             | -             | 0,40                     | 0,10        | -            | -           |
| Tetratriacontanol (C <sub>34</sub> )    | 0,0175  | 0,0014        | -             | -             | 3,09                     | 0,17        | -            | -           |
| <b>Alkane</b>                           | <b>0,1318</b>   | <b>0,0118</b> | -             | -             | <b>23,33</b>             | <b>1,10</b> | -            | -           |
| Nonacosan (C <sub>29</sub> )            | 0,0439  | 0,0041        | -             | -             | 7,76                     | 0,38        | -            | -           |
| Hentriacontan (C <sub>31</sub> )        | 0,0654  | 0,0063        | -             | -             | 11,58                    | 0,73        | -            | -           |
| Tritriacontan (C <sub>33</sub> )        | 0,0226  | 0,0026        | -             | -             | 4,00                     | 0,32        | -            | -           |
| <b>Total</b>                            | <b>0,5644</b>   | <b>0,0303</b> | <b>0,1320</b> | <b>0,0171</b> | <b>100</b>               | -           | <b>100</b>   | -           |

Tab. 8.2.5. **Wachszusammensetzung von *cer5***. Wachsmenge und -zusammensetzung von der Mutante *cer5* im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Col-8. Dargestellt sind die absoluten ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) und die prozentualen Mengen (%) in Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung.

| Wachsmonomer (Kettenlänge)             | <u>Absolute Menge Wachs (<math>\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}</math>)</u> |               |               |               | <u>Relative Menge Wachs (%)</u> |              |              |             |
|--|---|---------------|---------------|---------------|---------------------------------|--------------|--------------|-------------|
|  | Col-8   |               | <i>cer5</i>   |               | Col-8                           |              | <i>cer5</i>  |             |
|  | MW  | SA            | MW            | SA            | MW                              | SA           | MW           | SA          |
| <b>Säuren</b>                          | <b>0,0363</b>   | <b>0,0184</b> | <b>0,0103</b> | <b>0,0009</b> | <b>17,40</b>                    | <b>11,16</b> | <b>7,87</b>  | <b>0,89</b> |
| Tetracosansäure (C <sub>24</sub> )     | 0,0031  | 0,0011        | 0,0023        | 0,0003        | 1,55                            | 0,90         | 1,77         | 0,29        |
| Hexacosansäure (C <sub>26</sub> )      | 0,0096  | 0,0020        | 0,0043        | 0,0014        | 4,48                            | 1,00         | 3,32         | 1,11        |
| Octacosansäure (C <sub>28</sub> )      | 0,0038  | 0,0009        | -             | -             | 1,78                            | 0,53         | -            | -           |
| Triacosansäure (C <sub>30</sub> )      | 0,0065  | 0,0102        | -             | -             | 3,67                            | 6,57         | -            | -           |
| Dotriacosansäure (C <sub>32</sub> )    | 0,0054  | 0,0028        | 0,0026        | 0,0013        | 2,54                            | 1,52         | 2,00         | 1,06        |
| Tetratriacosansäure (C <sub>34</sub> ) | 0,0079  | 0,0076        | 0,0010        | 0,0007        | 3,38                            | 2,52         | 0,77         | 0,47        |
| <b>Aldehyde</b>                        | <b>0,0199</b>   | <b>0,0135</b> | <b>0,0079</b> | <b>0,0016</b> | <b>8,48</b>                     | <b>3,56</b>  | <b>5,98</b>  | <b>0,92</b> |
| Octacosanal (C <sub>28</sub> )         | 0,0014  | 0,0002        | 0,0031        | 0,0004        | 0,67                            | 0,23         | 2,35         | 0,33        |
| Triacosanal (C <sub>30</sub> )         | 0,0031  | 0,0008        | 0,0010        | 0,0010        | 1,43                            | 0,35         | 0,76         | 0,70        |
| Dotriacosanal (C <sub>32</sub> )       | 0,0071  | 0,0042        | 0,0038        | 0,0006        | 3,04                            | 1,18         | 2,87         | 0,37        |
| Tetratriacosanal (C <sub>34</sub> )    | 0,0083  | 0,0087        | -             | -             | 3,34                            | 2,63         | -            | -           |
| <b>Alkohole</b>                        | <b>0,0927</b>   | <b>0,0278</b> | <b>0,0381</b> | <b>0,0035</b> | <b>41,69</b>                    | <b>7,93</b>  | <b>29,08</b> | <b>2,39</b> |
| Hexacosanol (C <sub>26</sub> )         | 0,0034  | 0,0004        | 0,0011        | 0,0003        | 1,62                            | 0,46         | 0,81         | 0,26        |
| Octacosanol (C <sub>28</sub> )         | 0,0083  | 0,0017        | 0,0053        | 0,0004        | 3,85                            | 0,67         | 4,07         | 0,42        |
| Nonacosanol (C <sub>29</sub> )         | 0,0012  | 0,0003        | 0,0011        | 0,0011        | 0,56                            | 0,18         | 0,86         | 0,86        |
| Triacosanol (C <sub>30</sub> )         | 0,0228  | 0,0040        | 0,0091        | 0,0007        | 10,47                           | 0,65         | 6,93         | 0,64        |
| Hentriacosanol (C <sub>31</sub> )      | 0,0036  | 0,0011        | 0,0017        | 0,0001        | 1,71                            | 0,55         | 1,26         | 0,09        |
| Dotriacosanol (C <sub>32</sub> )       | 0,0407  | 0,0197        | 0,0133        | 0,0022        | 17,66                           | 7,25         | 10,16        | 1,50        |
| Tritriacosanol (C <sub>33</sub> )      | 0,0025  | 0,0012        | -             | -             | 1,13                            | 0,54         | -            | -           |
| Tetratriacosanol (C <sub>34</sub> )    | 0,0103  | 0,0020        | 0,0065        | 0,0004        | 4,70                            | 0,21         | 4,99         | 0,33        |
| <b>Alkane</b>                          | <b>0,0709</b>   | <b>0,0163</b> | <b>0,0747</b> | <b>0,0059</b> | <b>32,43</b>                    | <b>4,88</b>  | <b>57,07</b> | <b>2,86</b> |
| Nonacosan (C <sub>29</sub> )           | 0,0197  | 0,0033        | 0,0187        | 0,0020        | 9,15                            | 1,51         | 14,31        | 1,22        |
| Hentriacosan (C <sub>31</sub> )        | 0,0384  | 0,0097        | 0,0407        | 0,0020        | 17,48                           | 2,81         | 31,14        | 1,33        |
| Tritriacosan (C <sub>33</sub> )        | 0,0128  | 0,0036        | 0,0153        | 0,0027        | 5,81                            | 1,04         | 11,62        | 1,54        |
| <b>Total</b>                           | <b>0,2198</b>   | <b>0,0508</b> | <b>0,1309</b> | <b>0,0071</b> | <b>100</b>                      | <b>-</b>     | <b>100</b>   | <b>-</b>    |

Tab. 8.2.6. **Kutinzusammensetzung von *cer5***. Kutinmenge und -zusammensetzung von der Mutante *cer5* im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Col-8. Dargestellt sind die absoluten Werte in Bezug auf die Fläche ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) und dem Trockengewicht der extrahierten Blätter ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}_{\text{tg}}^{-1}$ ) in Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung.

| Kutinmonomer (Kettenlänge)                              | Absolute Menge Kutin [ $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ] |               |               |               | Absolute Menge Kutin [ $\mu\text{g}\cdot\text{mg}_{\text{tg}}^{-1}$ ] |               |               |               |
|---|---|---------------|---------------|---------------|---|---------------|---------------|---------------|
|   | Col-8   |               | <i>cer5</i>   |               | Col-8   |               | <i>cer5</i>   |               |
|   | Mw  | Sa            | Mw            | Sa            | Mw  | Sa            | Mw            | Sa            |
| <b>Säuren</b>   | <b>0,1974</b>   | <b>0,0140</b> | <b>0,1870</b> | <b>0,0302</b> | <b>0,3920</b>   | <b>0,0430</b> | <b>0,3824</b> | <b>0,0629</b> |
| Hexadecansäure (C <sub>16</sub> )                       | 0,0700  | 0,0018        | 0,0661        | 0,0138        | 0,1386  | 0,0040        | 0,1351        | 0,0280        |
| Octadecansäure (C <sub>18</sub> )                       | 0,0143  | 0,0118        | 0,0097        | 0,0058        | 0,0288  | 0,0248        | 0,0199        | 0,0122        |
| Octadecensäure (C <sub>18 (1)</sub> )                   | 0,0143  | 0,0012        | 0,0144        | 0,0025        | 0,0283  | 0,0033        | 0,0296        | 0,0054        |
| Octadecadiensäure (C <sub>18 (2)</sub> )                | 0,0391  | 0,0034        | 0,0365        | 0,0084        | 0,0777  | 0,0095        | 0,0747        | 0,0172        |
| Octadecatriensäure (C <sub>18 (3)</sub> )               | 0,0301  | 0,0001        | 0,0293        | 0,0050        | 0,0596  | 0,0022        | 0,0599        | 0,0106        |
| Tetracosansäure (C <sub>24</sub> )                      | 0,0297  | 0,0017        | 0,0309        | 0,0011        | 0,0590  | 0,0048        | 0,0632        | 0,0016        |
| <b>Alkohole</b>   | <b>0,0180</b>   | <b>0,0021</b> | <b>0,0216</b> | <b>0,0072</b> | <b>0,0357</b>   | <b>0,0055</b> | <b>0,0439</b> | <b>0,0142</b> |
| Octadecanol (C <sub>18</sub> )                          | 0,0156  | 0,0017        | 0,0172        | 0,0010        | 0,0311  | 0,0045        | 0,0351        | 0,0015        |
| Hexacosanol (C <sub>26</sub> )                          | 0,0015  | 0,0002        | 0,0032        | 0,0048        | 0,0031  | 0,0006        | 0,0065        | 0,0097        |
| Octacosanal (C <sub>28</sub> )                          | 0,0008  | 0,0003        | 0,0011        | 0,0023        | 0,0015  | 0,0006        | 0,0023        | 0,0046        |
| <b><math>\omega</math>-Hydroxysäuren</b>                | <b>0,0067</b>   | <b>0,0013</b> | <b>0,0052</b> | <b>0,0014</b> | <b>0,0133</b>   | <b>0,0030</b> | <b>0,0106</b> | <b>0,0028</b> |
| Hydroxyhexadecansäure (C <sub>16</sub> )                | 0,0067  | 0,0013        | 0,0052        | 0,0014        | 0,0133  | 0,0030        | 0,0106        | 0,0028        |
| <b><math>\alpha</math>-<math>\omega</math>-Disäuren</b> | <b>0,2861</b>   | <b>0,0068</b> | <b>0,2525</b> | <b>0,0148</b> | <b>0,5672</b>   | <b>0,0264</b> | <b>0,5159</b> | <b>0,0236</b> |
| Hexadecan-1,16-disäure (C <sub>16</sub> )               | 0,0367  | 0,0019        | 0,0332        | 0,0013        | 0,0729  | 0,0057        | 0,0678        | 0,0023        |
| Octadecan-1,18-disäure (C <sub>18</sub> )               | 0,0093  | 0,0007        | 0,0086        | 0,0024        | 0,0184  | 0,0019        | 0,0175        | 0,0047        |
| Octadecen-1,18-disäure (C <sub>18 (1)</sub> )           | 0,0369  | 0,0022        | 0,0243        | 0,0020        | 0,0733  | 0,0056        | 0,0498        | 0,0040        |
| Octadecadien-1,18-disäure (C <sub>18 (2)</sub> )        | 0,2031  | 0,0027        | 0,1864        | 0,0117        | 0,4026  | 0,0138        | 0,3809        | 0,0191        |
| <b>2-Hydroxysäuren</b>                                  | <b>0,3696</b>   | <b>0,0020</b> | <b>0,3560</b> | <b>0,0327</b> | <b>0,7326</b>   | <b>0,0259</b> | <b>0,7272</b> | <b>0,0584</b> |
| 2-Hydroxyhexadecansäure (C <sub>16</sub> )              | 0,0182  | 0,0009        | 0,0161        | 0,0020        | 0,0360  | 0,0029        | 0,0329        | 0,0039        |
| 2-Hydroxydocosansäure (C <sub>22</sub> )                | 0,0357  | 0,0017        | 0,0344        | 0,0034        | 0,0709  | 0,0062        | 0,0703        | 0,0063        |
| 2-Hydroxytetracosansäure (C <sub>24</sub> )             | 0,1566  | 0,0047        | 0,1418        | 0,0080        | 0,3103  | 0,0090        | 0,2898        | 0,0136        |
| 2-Hydroxytetracosensäure (C <sub>24 (1)</sub> )         | 0,0916  | 0,0018        | 0,0898        | 0,0088        | 0,1816  | 0,0081        | 0,1835        | 0,0158        |
| 2-Hydroxypentacosansäure (C <sub>25</sub> )             | 0,0069  | 0,0001        | 0,0079        | 0,0036        | 0,0137  | 0,0003        | 0,0162        | 0,0072        |
| 2-Hydroxypentacosensäure (C <sub>25 (1)</sub> )         | 0,0047  | 0,0002        | 0,0050        | 0,0017        | 0,0093  | 0,0007        | 0,0103        | 0,0034        |
| 2-Hydroxyhexacosansäure (C <sub>26</sub> )              | 0,0403  | 0,0017        | 0,0420        | 0,0036        | 0,0798  | 0,0021        | 0,0858        | 0,0063        |
| 2-Hydroxyhexacosensäure (C <sub>26 (1)</sub> )          | 0,0123  | 0,0007        | 0,0147        | 0,0045        | 0,0244  | 0,0023        | 0,0299        | 0,0089        |
| 2-Hydroxyheptacosansäure (C <sub>27</sub> )             | 0,0033  | 0,0003        | 0,0042        | 0,0017        | 0,0066  | 0,0007        | 0,0085        | 0,0035        |
| <b>"midchain" oxygenierte Hydroxysäure</b>              | <b>0,0079</b>   | <b>0,0026</b> | <b>0,0058</b> | <b>0,0030</b> | <b>0,0159</b>   | <b>0,0059</b> | <b>0,0118</b> | <b>0,0060</b> |
| 9 (10),16-Dihydroxyhexadecansäure (C <sub>16</sub> )    | 0,0079  | 0,0026        | 0,0058        | 0,0030        | 0,0159  | 0,0059        | 0,0118        | 0,0060        |
| <b>Total</b>  | <b>0,8857</b>   | <b>0,0201</b> | <b>0,8280</b> | <b>0,0438</b> | <b>1,7567</b>   | <b>0,1059</b> | <b>1,6919</b> | <b>0,0663</b> |

Tab. 8.2.7. **Wachszusammensetzung von *cut1***. Wachsmenge und -zusammensetzung von der Mutante *cut1* im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Col-8. Dargestellt sind die absoluten ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) und die prozentualen Mengen (%) in Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung.

| Wachsmonomer (Kettenlänge)              | <b>Absolute Menge Wachs (<math>\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}</math>)</b> |               |                    |               | <b>Relative Menge Wachs (%)</b> |             |                    |             |
|---|---|---------------|--------------------|---------------|---------------------------------|-------------|--------------------|-------------|
|   | <b>Col-8</b>  |               | <b><i>cut1</i></b> |               | <b>Col-8</b>                    |             | <b><i>cut1</i></b> |             |
|   | MW  | SA            | MW                 | SA            | MW                              | SA          | MW                 | SA          |
| <b>Säuren</b>                           | <b>0,0275</b>   | <b>0,0153</b> | <b>0,0329</b>      | <b>0,0042</b> | <b>8,08</b>                     | <b>3,36</b> | <b>22,56</b>       | <b>2,65</b> |
| Tetracosansäure (C <sub>24</sub> )      | 0,0031  | 0,0015        | 0,0151             | 0,0015        | 0,94                            | 0,38        | 10,39              | 1,10        |
| Hexacosansäure (C <sub>26</sub> )       | 0,0122  | 0,0042        | 0,0125             | 0,0023        | 2,89                            | 1,68        | 8,54               | 1,28        |
| Octacosansäure (C <sub>28</sub> )       | 0,0080  | 0,0029        | 0,0030             | 0,0007        | 2,42                            | 0,69        | 2,09               | 0,60        |
| Dotriacontansäure (C <sub>32</sub> )    | 0,0028  | 0,0005        | 0,0013             | 0,0001        | 0,85                            | 0,12        | 0,89               | 0,10        |
| Tetratriacontansäure (C <sub>34</sub> ) | 0,0064  | 0,0051        | 0,0010             | 0,0003        | 0,97                            | 1,25        | 0,65               | 0,16        |
| <b>Aldehyde</b>                         | <b>0,0430</b>   | <b>0,0174</b> | <b>0,0058</b>      | <b>0,0006</b> | <b>13,18</b>                    | <b>4,73</b> | <b>3,94</b>        | <b>0,09</b> |
| Octacosanal (C <sub>28</sub> )          | 0,0051  | 0,0014        | 0,0000             | 0,0000        | 1,12                            | 0,68        | 0,00               | 0,00        |
| Triaccontanal (C <sub>30</sub> )        | 0,0107  | 0,0024        | 0,0016             | 0,0002        | 3,45                            | 1,57        | 1,12               | 0,06        |
| Dotriacontanal (C <sub>32</sub> )       | 0,0182  | 0,0086        | 0,0018             | 0,0002        | 5,49                            | 2,04        | 1,22               | 0,04        |
| Tetratriacontanal (C <sub>34</sub> )    | 0,0125  | 0,0058        | 0,0023             | 0,0002        | 3,12                            | 2,09        | 1,60               | 0,09        |
| <b>Alkohole</b>                         | <b>0,1459</b>   | <b>0,0489</b> | <b>0,0608</b>      | <b>0,0104</b> | <b>42,84</b>                    | <b>8,14</b> | <b>41,29</b>       | <b>3,33</b> |
| Hexacosanol (C <sub>26</sub> )          | 0,0176  | 0,0075        | 0,0165             | 0,0043        | 5,25                            | 2,01        | 6,65               | 6,15        |
| Octacosanol (C <sub>28</sub> )          | 0,0376  | 0,0088        | 0,0153             | 0,0061        | 8,48                            | 5,48        | 10,40              | 4,07        |
| Nonacosanol (C <sub>29</sub> )          | 0,0000  | 0,0000        | 0,0009             | 0,0001        | 0,00                            | 0,00        | 0,46               | 0,27        |
| Triaccontanol (C <sub>30</sub> )        | 0,0425  | 0,0117        | 0,0255             | 0,0031        | 9,36                            | 5,64        | 17,38              | 0,42        |
| Dotriacontanol (C <sub>32</sub> )       | 0,0513  | 0,0099        | 0,0083             | 0,0012        | 15,80                           | 3,18        | 5,68               | 0,74        |
| Tetratriacontanol (C <sub>34</sub> )    | 0,0130  | 0,0032        | 0,0011             | 0,0002        | 3,96                            | 0,70        | 0,72               | 0,12        |
| <b>Alkane</b>                           | <b>0,1158</b>   | <b>0,0141</b> | <b>0,0472</b>      | <b>0,0079</b> | <b>35,90</b>                    | <b>6,49</b> | <b>32,21</b>       | <b>4,76</b> |
| Nonacosan (C <sub>29</sub> )            | 0,0385  | 0,0016        | 0,0198             | 0,0041        | 12,18                           | 3,48        | 13,48              | 2,44        |
| Hentriacontan (C <sub>31</sub> )        | 0,0583  | 0,0098        | 0,0193             | 0,0042        | 17,85                           | 2,52        | 13,21              | 2,69        |
| Tritriacontan (C <sub>33</sub> )        | 0,0191  | 0,0045        | 0,0080             | 0,0006        | 5,87                            | 1,40        | 5,52               | 0,56        |
| <b>Total</b>                            | <b>0,3322</b>   | <b>0,0739</b> | <b>0,1467</b>      | <b>0,0160</b> | <b>100</b>                      | <b>-</b>    | <b>100</b>         | <b>-</b>    |

Tab. 8.2.8. **Kutinmenge und -zusammensetzung von *cut1***. Kutinmenge und -zusammensetzung von der Mutante *cut1* im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Col-8. Dargestellt sind die absoluten Werte in Bezug auf die Fläche ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) und dem Trockengewicht der extrahierten Blätter ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}_{\text{tg}}^{-1}$ ) in Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung.

| Kutinmonomer (Kettenlänge)                              | Absolute Menge Kutin ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) |               |               |               | Absolute Menge Kutin ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}_c^{-1}$ ) |               |               |               |
|---|---|---------------|---------------|---------------|---|---------------|---------------|---------------|
|   | Col-8   |               | cut1          |               | Col-8   |               | cut1          |               |
|   | Mw  | Sa            | Mw            | Sa            | Mw  | Sa            | Mw            | Sa            |
| <b>Säuren</b>   | <b>0,7768</b>   | <b>0,2367</b> | <b>0,8334</b> | <b>0,1392</b> | <b>1,3912</b>   | <b>0,2503</b> | <b>1,3963</b> | <b>0,2458</b> |
| Hexadecansäure (C <sub>16</sub> )                       | 0,3285  | 0,0930        | 0,3174        | 0,0260        | 0,5893  | 0,0938        | 0,5331        | 0,0757        |
| Octadecansäure (C <sub>18</sub> )                       | 0,0127  | 0,0034        | 0,0153        | 0,0034        | 0,0231  | 0,0060        | 0,0255        | 0,0051        |
| Octadecensäure (C <sub>18 (1)</sub> )                   | 0,0455  | 0,0212        | 0,0467        | 0,0054        | 0,0805  | 0,0273        | 0,0785        | 0,0131        |
| Octadecadiensäure (C <sub>18 (2)</sub> )                | 0,1529  | 0,0580        | 0,1910        | 0,0740        | 0,2723  | 0,0688        | 0,3184        | 0,1158        |
| Octadecatriensäure (C <sub>18 (3)</sub> )               | 0,1326  | 0,0532        | 0,1473        | 0,0366        | 0,2358  | 0,0647        | 0,2464        | 0,0586        |
| Eicosansäure (C <sub>20</sub> )                         | 0,0074  | 0,0026        | 0,0059        | 0,0002        | 0,0131  | 0,0030        | 0,0099        | 0,0008        |
| Docosansäure (C <sub>22</sub> )                         | 0,0222  | 0,0032        | 0,0209        | 0,0006        | 0,0403  | 0,0016        | 0,0351        | 0,0030        |
| Tricosansäure (C <sub>23</sub> )                        | 0,0026  | 0,0017        | 0,0026        | 0,0020        | 0,0046  | 0,0027        | 0,0043        | 0,0032        |
| Tetracosansäure (C <sub>24</sub> )                      | 0,0518  | 0,0052        | 0,0711        | 0,0036        | 0,0943  | 0,0036        | 0,1194        | 0,0146        |
| Pentacosansäure (C <sub>25</sub> )                      | 0,0052  | 0,0009        | 0,0057        | 0,0012        | 0,0095  | 0,0022        | 0,0096        | 0,0023        |
| Triacosansäure (C <sub>30</sub> )                       | 0,0035  | 0,0017        | 0,0021        | 0,0007        | 0,0064  | 0,0035        | 0,0035        | 0,0014        |
| Ditriacosansäure (C <sub>32</sub> )                     | 0,0020  | 0,0018        | 0,0015        | 0,0005        | 0,0040  | 0,0035        | 0,0025        | 0,0011        |
| Tetraacosansäure (C <sub>34</sub> )                     | 0,0098  | 0,0009        | 0,0060        | 0,0008        | 0,0179  | 0,0020        | 0,0101        | 0,0021        |
| <b>Alkohole</b>   | <b>0,0350</b>   | <b>0,0061</b> | <b>0,0343</b> | <b>0,0097</b> | <b>0,0632</b>   | <b>0,0034</b> | <b>0,0573</b> | <b>0,0147</b> |
| Hexadecanol (C <sub>16</sub> )                          | 0,0063  | 0,0001        | 0,0074        | 0,0010        | 0,0115  | 0,0011        | 0,0123        | 0,0013        |
| Octadecanol (C <sub>18</sub> )                          | 0,0168  | 0,0030        | 0,0268        | 0,0089        | 0,0303  | 0,0028        | 0,0448        | 0,0137        |
| Hexacosanol (C <sub>26</sub> )                          | 0,0047  | 0,0018        | 0,0001        | 0,0002        | 0,0084  | 0,0024        | 0,0002        | 0,0004        |
| Octacosanol (C <sub>28</sub> )                          | 0,0072  | 0,0017        | 0,0000        | 0,0000        | 0,0130  | 0,0017        | 0,0000        | 0,0000        |
| <b><math>\omega</math>-Hydroxysäuren</b>                | <b>0,0107</b>   | <b>0,0032</b> | <b>0,0073</b> | <b>0,0013</b> | <b>0,0192</b>   | <b>0,0034</b> | <b>0,0123</b> | <b>0,0022</b> |
| Hydroxyhexadecansäure (C <sub>16</sub> )                | 0,0107  | 0,0032        | 0,0073        | 0,0013        | 0,0192  | 0,0034        | 0,0123        | 0,0022        |
| <b><math>\alpha</math>-<math>\omega</math>-Disäuren</b> | <b>0,4639</b>   | <b>0,0501</b> | <b>0,4281</b> | <b>0,0131</b> | <b>0,8431</b>   | <b>0,0125</b> | <b>0,7166</b> | <b>0,0427</b> |
| Hexadecan-1,16-disäure (C <sub>16</sub> )               | 0,0602  | 0,0014        | 0,0522        | 0,0013        | 0,1103  | 0,0112        | 0,0875        | 0,0087        |
| Octadecan-1,18-disäure (C <sub>18</sub> )               | 0,0139  | 0,0016        | 0,0095        | 0,0004        | 0,0252  | 0,0003        | 0,0160        | 0,0013        |
| Octadecen-1,18-disäure (C <sub>18 (1)</sub> )           | 0,0596  | 0,0061        | 0,0432        | 0,0024        | 0,1084  | 0,0017        | 0,0726        | 0,0095        |
| Octadecadien-1,18-disäure (C <sub>18 (2)</sub> )        | 0,3302  | 0,0417        | 0,3232        | 0,0150        | 0,5993  | 0,0088        | 0,5405        | 0,0253        |
| <b>2-Hydroxysäuren</b>                                  | <b>0,5141</b>   | <b>0,0609</b> | <b>0,3974</b> | <b>0,1648</b> | <b>0,9400</b>   | <b>0,1390</b> | <b>0,6700</b> | <b>0,2888</b> |
| 2-Hydroxyhexadecansäure (C <sub>16</sub> )              | 0,0317  | 0,0054        | 0,0195        | 0,0092        | 0,0577  | 0,0094        | 0,0329        | 0,0158        |
| 2-Hydroxyeicosansäure (C <sub>20</sub> )                | 0,0043  | 0,0012        | 0,0028        | 0,0029        | 0,0077  | 0,0017        | 0,0047        | 0,0047        |
| 2-Hydroxydocosansäure (C <sub>22</sub> )                | 0,0456  | 0,0062        | 0,0246        | 0,0100        | 0,0836  | 0,0149        | 0,0415        | 0,0172        |
| 2-Hydroxytricosansäure (C <sub>23</sub> )               | 0,0062  | 0,0017        | 0,0065        | 0,0022        | 0,0112  | 0,0021        | 0,0110        | 0,0040        |
| 2-Hydroxytetracosansäure (C <sub>24</sub> )             | 0,2060  | 0,0264        | 0,1758        | 0,0692        | 0,3769  | 0,0610        | 0,2965        | 0,1226        |
| 2-Hydroxytetracosensäure (C <sub>24 (1)</sub> )         | 0,1277  | 0,0097        | 0,1118        | 0,0487        | 0,2335  | 0,0257        | 0,1886        | 0,0853        |
| 2-Hydroxypentacosansäure (C <sub>25</sub> )             | 0,0114  | 0,0022        | 0,0088        | 0,0030        | 0,0208  | 0,0041        | 0,0148        | 0,0054        |
| 2-Hydroxypentacosensäure (C <sub>25 (1)</sub> )         | 0,0073  | 0,0008        | 0,0055        | 0,0029        | 0,0134  | 0,0019        | 0,0093        | 0,0048        |
| 2-Hydroxyhexacosansäure (C <sub>26</sub> )              | 0,0538  | 0,0069        | 0,0302        | 0,0116        | 0,0985  | 0,0165        | 0,0510        | 0,0207        |
| 2-Hydroxyhexacosensäure (C <sub>26 (1)</sub> )          | 0,0144  | 0,0013        | 0,0105        | 0,0043        | 0,0264  | 0,0041        | 0,0178        | 0,0076        |
| 2-Hydroxyheptacosansäure (C <sub>27</sub> )             | 0,0056  | 0,0009        | 0,0013        | 0,0022        | 0,0103  | 0,0022        | 0,0020        | 0,0035        |
| <b>"midchain" oxygenierte Hydroxysäure</b>              | <b>0,0157</b>   | <b>0,0129</b> | <b>0,0022</b> | <b>0,0011</b> | <b>0,0294</b>   | <b>0,0256</b> | <b>0,0036</b> | <b>0,0017</b> |
| 9 (10),16-Dihydroxyhexadecansäure (C <sub>16</sub> )    | 0,0157  | 0,0129        | 0,0022        | 0,0011        | 0,0294  | 0,0256        | 0,0036        | 0,0017        |
| <b>Total</b>  | <b>1,8161</b>   | <b>0,3138</b> | <b>1,7028</b> | <b>0,0465</b> | <b>3,2862</b>   | <b>0,2216</b> | <b>2,8561</b> | <b>0,2837</b> |

Tab. 8.2.9. **Wachszusammensetzung von *cer10***. Wachsmenge und -zusammensetzung von der Mutante *cer10* im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Ler. Dargestellt sind die absoluten ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) und die prozentualen Mengen (%) in Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung.

| Wachsmonomer (Kettenlänge)             | <u>Absolute Menge Wachs (<math>\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}</math>)</u> |               |               |               | <u>Relative Menge Wachs (%)</u> |             |              |             |
|--|---|---------------|---------------|---------------|---------------------------------|-------------|--------------|-------------|
|  | Ler   |               | <i>cer10</i>  |               | Ler                             |             | <i>cer10</i> |             |
|  | MW  | SA            | MW            | SA            | MW                              | SA          | MW           | SA          |
| <b>Säuren</b>                          | <b>0,0939</b>   | <b>0,0134</b> | <b>0,0622</b> | <b>0,0021</b> | <b>15,76</b>                    | <b>0,78</b> | <b>13,54</b> | <b>0,81</b> |
| Tetracosansäure (C <sub>24</sub> )     | 0,0097  | 0,0014        | 0,0044        | 0,0005        | 1,63                            | 0,17        | 0,96         | 0,12        |
| Hexacosansäure (C <sub>26</sub> )      | 0,0484  | 0,0061        | 0,0254        | 0,0038        | 8,14                            | 0,59        | 5,52         | 0,81        |
| Octacosansäure (C <sub>28</sub> )      | 0,0108  | 0,0021        | 0,0069        | 0,0003        | 1,80                            | 0,15        | 1,49         | 0,01        |
| Triacosansäure (C <sub>30</sub> )      | 0,0048  | 0,0008        | 0,0029        | 0,0001        | 0,80                            | 0,12        | 0,62         | 0,04        |
| Dotriacosansäure (C <sub>32</sub> )    | 0,0099  | 0,0020        | 0,0082        | 0,0010        | 1,65                            | 0,19        | 1,79         | 0,25        |
| Tetratriacosansäure (C <sub>34</sub> ) | 0,0104  | 0,0027        | 0,0144        | 0,0023        | 1,74                            | 0,30        | 3,15         | 0,58        |
| <b>Aldehyde</b>                        | <b>0,1044</b>   | <b>0,0118</b> | <b>0,0842</b> | <b>0,0143</b> | <b>17,66</b>                    | <b>2,43</b> | <b>18,41</b> | <b>3,75</b> |
| Octacosanal (C <sub>28</sub> )         | 0,0129  | 0,0018        | 0,0091        | 0,0002        | 2,17                            | 0,08        | 1,99         | 0,12        |
| Triacosanal (C <sub>30</sub> )         | 0,0183  | 0,0017        | 0,0106        | 0,0018        | 3,10                            | 0,42        | 2,33         | 0,49        |
| Dotriacosanal (C <sub>32</sub> )       | 0,0396  | 0,0052        | 0,0267        | 0,0058        | 6,71                            | 1,19        | 5,85         | 1,48        |
| Tetratriacosanal (C <sub>34</sub> )    | 0,0336  | 0,0045        | 0,0377        | 0,0067        | 5,67                            | 0,83        | 8,25         | 1,72        |
| <b>Alkohole</b>                        | <b>0,2012</b>   | <b>0,0082</b> | <b>0,1340</b> | <b>0,0088</b> | <b>33,98</b>                    | <b>2,08</b> | <b>29,15</b> | <b>1,24</b> |
| Hexacosanol (C <sub>26</sub> )         | 0,0206  | 0,0040        | 0,0169        | 0,0020        | 3,44                            | 0,29        | 3,69         | 0,40        |
| Octacosanol (C <sub>28</sub> )         | 0,0399  | 0,0063        | 0,0360        | 0,0046        | 6,69                            | 0,37        | 7,83         | 0,85        |
| Nonacosanol (C <sub>29</sub> )         | 0,0012  | 0,0003        | 0,0006        | 0,0003        | 0,19                            | 0,04        | 0,14         | 0,05        |
| Triacosanol (C <sub>30</sub> )         | 0,0439  | 0,0011        | 0,0203        | 0,0011        | 7,44                            | 0,80        | 4,41         | 0,15        |
| Hentriacosanol (C <sub>31</sub> )      | 0,0063  | 0,0004        | 0,0029        | 0,0004        | 1,07                            | 0,17        | 0,63         | 0,10        |
| Dotriacosanol (C <sub>32</sub> )       | 0,0792  | 0,0030        | 0,0482        | 0,0034        | 13,43                           | 1,74        | 10,48        | 0,39        |
| Tetratriacosanol (C <sub>34</sub> )    | 0,0101  | 0,0009        | 0,0090        | 0,0015        | 1,71                            | 0,16        | 1,97         | 0,41        |
| <b>Alkane</b>                          | <b>0,1951</b>   | <b>0,0398</b> | <b>0,1791</b> | <b>0,0222</b> | <b>32,60</b>                    | <b>3,25</b> | <b>38,90</b> | <b>3,52</b> |
| Nonacosan (C <sub>29</sub> )           | 0,0559  | 0,0077        | 0,0446        | 0,0042        | 9,38                            | 0,47        | 9,68         | 0,64        |
| Hentriacosan (C <sub>31</sub> )        | 0,1033  | 0,0212        | 0,0954        | 0,0105        | 17,27                           | 1,73        | 20,72        | 1,59        |
| Tritriacosan (C <sub>33</sub> )        | 0,0359  | 0,0109        | 0,0392        | 0,0081        | 5,95                            | 1,15        | 8,50         | 1,48        |
| <b>Total</b>                           | <b>0,5946</b>   | <b>0,0628</b> | <b>0,4595</b> | <b>0,0162</b> | <b>100</b>                      | <b>-</b>    | <b>100</b>   | <b>-</b>    |

Tab. 8.2.10. **Kutinzusammensetzung von *cer10***. Kutinmenge und -zusammensetzung von der Mutante *cer10* im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Ler. Dargestellt sind die absoluten Werte in Bezug auf die Fläche ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) und dem Trockengewicht der extrahierten Blätter ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) in Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung.

| Kutinmonomer (Kettenlänge)                              | Absolute Menge Kutin ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) |               |               |               | Absolute Menge Kutin ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}_{\text{kg}}^{-1}$ ) |               |               |               |
|---|---|---------------|---------------|---------------|---|---------------|---------------|---------------|
|   | Ler   |               | cer10         |               | Ler   |               | cer10         |               |
|   | Mw  | Sa            | Mw            | Sa            | Mw  | Sa            | Mw            | Sa            |
| <b>Säuren</b>   | <b>3,4906</b>   | <b>0,6368</b> | <b>2,8275</b> | <b>0,7584</b> | <b>4,7430</b>   | <b>0,7383</b> | <b>4,1269</b> | <b>0,8703</b> |
| Hexadecansäure (C <sub>16</sub> )                       | 1,5535  | 0,2911        | 1,2020        | 0,3342        | 2,1100  | 0,3329        | 1,7566        | 0,4014        |
| Octadecansäure (C <sub>18</sub> )                       | 0,0592  | 0,0192        | 0,0646        | 0,0229        | 0,0804  | 0,0239        | 0,0942        | 0,0286        |
| Octadecensäure (C <sub>18 (1)</sub> )                   | 0,2815  | 0,0931        | 0,1997        | 0,0999        | 0,3820  | 0,1157        | 0,2878        | 0,1263        |
| Octadecadiensäure (C <sub>18 (2)</sub> )                | 0,8839  | 0,1201        | 0,7764        | 0,1870        | 1,2009  | 0,1230        | 1,1338        | 0,2064        |
| Octadecatriensäure (C <sub>18 (3)</sub> )               | 0,4749  | 0,0591        | 0,3689        | 0,0828        | 0,6458  | 0,0636        | 0,5380        | 0,0841        |
| Eicosansäure (C <sub>20</sub> )                         | 0,0489  | 0,0328        | 0,0485        | 0,0219        | 0,0665  | 0,0429        | 0,0704        | 0,0277        |
| Docosansäure (C <sub>22</sub> )                         | 0,0568  | 0,0256        | 0,0576        | 0,0154        | 0,0776  | 0,0347        | 0,0841        | 0,0178        |
| Tricosansäure (C <sub>23</sub> )                        | 0,0159  | 0,0097        | 0,0113        | 0,0035        | 0,0216  | 0,0124        | 0,0165        | 0,0040        |
| Tetracosansäure (C <sub>24</sub> )                      | 0,0875  | 0,0056        | 0,0711        | 0,0077        | 0,1194  | 0,0121        | 0,1045        | 0,0079        |
| Pentacosansäure (C <sub>25</sub> )                      | 0,0074  | 0,0013        | 0,0056        | 0,0029        | 0,0101  | 0,0012        | 0,0081        | 0,0040        |
| Triacotansäure (C <sub>30</sub> )                       | 0,0056  | 0,0042        | 0,0055        | 0,0052        | 0,0075  | 0,0053        | 0,0085        | 0,0086        |
| Ditriacotansäure (C <sub>32</sub> )                     | 0,0032  | 0,0041        | 0,0047        | 0,0042        | 0,0043  | 0,0053        | 0,0073        | 0,0070        |
| Tetracontansäure (C <sub>34</sub> )                     | 0,0123  | 0,0008        | 0,0116        | 0,0009        | 0,0168  | 0,0022        | 0,0171        | 0,0009        |
| <b>Alkohole</b>   | <b>0,0732</b>   | <b>0,0223</b> | <b>0,0561</b> | <b>0,0160</b> | <b>0,1000</b>   | <b>0,0310</b> | <b>0,0816</b> | <b>0,0178</b> |
| Hexadecanol (C <sub>16</sub> )                          | 0,0371  | 0,0147        | 0,0296        | 0,0134        | 0,0502  | 0,0180        | 0,0428        | 0,0167        |
| Octadecanol (C <sub>18</sub> )                          | 0,0267  | 0,0069        | 0,0254        | 0,0043        | 0,0363  | 0,0089        | 0,0371        | 0,0038        |
| Hexacosanol (C <sub>26</sub> )                          | 0,0064  | 0,0102        | 0,0000        | 0,0000        | 0,0095  | 0,0152        | 0,0000        | 0,0000        |
| Octacosanal (C <sub>28</sub> )                          | 0,0029  | 0,0014        | 0,0011        | 0,0010        | 0,0040  | 0,0020        | 0,0017        | 0,0015        |
| <b><math>\omega</math>-Hydroxysäuren</b>                | <b>0,0466</b>   | <b>0,0354</b> | <b>0,0507</b> | <b>0,0226</b> | <b>0,0633</b>   | <b>0,0459</b> | <b>0,0734</b> | <b>0,0280</b> |
| Hydroxyhexadecansäure (C <sub>16</sub> )                | 0,0466  | 0,0354        | 0,0507        | 0,0226        | 0,0633  | 0,0459        | 0,0734        | 0,0280        |
| <b><math>\alpha</math>-<math>\omega</math>-Disäuren</b> | <b>0,9074</b>   | <b>0,1388</b> | <b>0,9308</b> | <b>0,1431</b> | <b>1,2376</b>   | <b>0,1996</b> | <b>1,3622</b> | <b>0,1147</b> |
| Hexadecan-1,16-disäure (C <sub>16</sub> )               | 0,1050  | 0,0347        | 0,0908        | 0,0270        | 0,1427  | 0,0437        | 0,1322        | 0,0307        |
| Octadecan-1,18-disäure (C <sub>18</sub> )               | 0,0436  | 0,0227        | 0,0506        | 0,0276        | 0,0605  | 0,0345        | 0,0727        | 0,0354        |
| Octadecen-1,18-disäure (C <sub>18 (1)</sub> )           | 0,0956  | 0,0283        | 0,0917        | 0,0190        | 0,1302  | 0,0372        | 0,1339        | 0,0187        |
| Octadecadien-1,18-disäure (C <sub>18 (2)</sub> )        | 0,6632  | 0,0620        | 0,6977        | 0,0712        | 0,9043  | 0,0965        | 1,0234        | 0,0302        |
| <b>2-Hydroxysäuren</b>                                  | <b>0,4791</b>   | <b>0,0874</b> | <b>0,4379</b> | <b>0,0801</b> | <b>0,6519</b>   | <b>0,1091</b> | <b>0,6410</b> | <b>0,0876</b> |
| 2-Hydroxyhexadecansäure (C <sub>16</sub> )              | 0,0356  | 0,0224        | 0,0400        | 0,0164        | 0,0480  | 0,0282        | 0,0577        | 0,0202        |
| 2-Hydroxyeicosansäure (C <sub>20</sub> )                | 0,0189  | 0,0122        | 0,0206        | 0,0067        | 0,0260  | 0,0164        | 0,0300        | 0,0081        |
| 2-Hydroxydocosansäure (C <sub>22</sub> )                | 0,0354  | 0,0098        | 0,0366        | 0,0100        | 0,0482  | 0,0127        | 0,0536        | 0,0129        |
| 2-Hydroxytricosansäure (C <sub>23</sub> )               | 0,0604  | 0,0414        | 0,0250        | 0,0192        | 0,0819  | 0,0537        | 0,0373        | 0,0292        |
| 2-Hydroxytetracosansäure (C <sub>24</sub> )             | 0,1680  | 0,0427        | 0,1596        | 0,0363        | 0,2288  | 0,0555        | 0,2338        | 0,0460        |
| 2-Hydroxytetracosensäure (C <sub>24 (1)</sub> )         | 0,0914  | 0,0248        | 0,1000        | 0,0285        | 0,1245  | 0,0325        | 0,1463        | 0,0374        |
| 2-Hydroxypentacosansäure (C <sub>25</sub> )             | 0,0060  | 0,0015        | 0,0051        | 0,0022        | 0,0082  | 0,0019        | 0,0075        | 0,0031        |
| 2-Hydroxypentacosensäure (C <sub>25 (1)</sub> )         | 0,0117  | 0,0017        | 0,0073        | 0,0013        | 0,0160  | 0,0024        | 0,0108        | 0,0018        |
| 2-Hydroxyhexacosansäure (C <sub>26</sub> )              | 0,0413  | 0,0092        | 0,0328        | 0,0079        | 0,0563  | 0,0125        | 0,0481        | 0,0099        |
| 2-Hydroxyhexacosensäure (C <sub>26 (1)</sub> )          | 0,0103  | 0,0027        | 0,0109        | 0,0026        | 0,0140  | 0,0037        | 0,0159        | 0,0033        |
| <b>"midchain" oxygenierte Hydroxysäure</b>              | <b>0,0200</b>   | <b>0,0116</b> | <b>0,0309</b> | <b>0,0154</b> | <b>0,0277</b>   | <b>0,0170</b> | <b>0,0445</b> | <b>0,0195</b> |
| 9 (10),16-Dihydroxyhexadecansäure (C <sub>16</sub> )    | 0,0200  | 0,0116        | 0,0309        | 0,0154        | 0,0277  | 0,0170        | 0,0445        | 0,0195        |
| <b>Total</b>  | <b>5,0168</b>   | <b>0,9109</b> | <b>4,3340</b> | <b>0,9648</b> | <b>6,8235</b>   | <b>1,1117</b> | <b>6,3294</b> | <b>1,0132</b> |

Tab. 8.2.11. **Wachszusammensetzung von *shn1***. Wachsmenge und -zusammensetzung von der Mutante *shn1* im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Ws. Dargestellt sind die absoluten ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) und die prozentualen Mengen (%) in Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung.

| Wachsmonomer (Kettenlänge)              | Absolute Menge Wachs ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) |               |               |               | Relative Menge Wachs (%) |             |              |             |
|---|---|---------------|---------------|---------------|--------------------------|-------------|--------------|-------------|
|   | Ws  |               | <i>shn1</i>   |               | Ws                       |             | <i>shn1</i>  |             |
|   | MW  | SA            | MW            | SA            | MW                       | SA          | MW           | SA          |
| <b>Säuren</b>                           | <b>0,0504</b>   | <b>0,0146</b> | <b>0,0807</b> | <b>0,0165</b> | <b>15,96</b>             | <b>2,55</b> | <b>9,51</b>  | <b>0,92</b> |
| Tetracosansäure (C <sub>24</sub> )      | 0,0072  | 0,0024        | 0,0044        | 0,0012        | 2,26                     | 0,49        | 0,53         | 0,17        |
| Hexacosansäure (C <sub>26</sub> )       | 0,0159  | 0,0066        | 0,0116        | 0,0015        | 4,88                     | 0,74        | 1,38         | 0,12        |
| Octacosansäure (C <sub>28</sub> )       | 0,0041  | 0,0014        | 0,0117        | 0,0026        | 1,30                     | 0,25        | 1,39         | 0,29        |
| Triacosansäure (C <sub>30</sub> )       | 0,0031  | 0,0006        | 0,0115        | 0,0040        | 1,02                     | 0,32        | 1,33         | 0,35        |
| Dotriacontansäure (C <sub>32</sub> )    | 0,0111  | 0,0052        | 0,0262        | 0,0065        | 3,63                     | 1,61        | 3,06         | 0,33        |
| Tetratriacontansäure (C <sub>34</sub> ) | 0,0090  | 0,0029        | 0,0154        | 0,0045        | 2,88                     | 0,83        | 1,81         | 0,46        |
| <b>Aldehyde</b>                         | <b>0,0391</b>   | <b>0,0186</b> | <b>0,1021</b> | <b>0,0256</b> | <b>9,94</b>              | <b>3,61</b> | <b>12,02</b> | <b>1,85</b> |
| Octacosanal (C <sub>28</sub> )          | 0,0040  | 0,0019        | 0,0200        | 0,0032        | 1,28                     | 0,60        | 2,37         | 0,16        |
| Triacosanal (C <sub>30</sub> )          | 0,0062  | 0,0035        | 0,0277        | 0,0072        | 2,03                     | 1,18        | 3,25         | 0,48        |
| Dotriacontanal (C <sub>32</sub> )       | 0,0129  | 0,0037        | 0,0391        | 0,0105        | 4,13                     | 1,05        | 4,62         | 1,00        |
| Tetratriacontanal (C <sub>34</sub> )    | 0,0078  | 0,0028        | 0,0154        | 0,0063        | 2,50                     | 0,83        | 1,79         | 0,52        |
| <b>Alkohole</b>                         | <b>0,1468</b>   | <b>0,0475</b> | <b>0,1848</b> | <b>0,0243</b> | <b>45,63</b>             | <b>2,10</b> | <b>21,97</b> | <b>2,20</b> |
| Hexacosanol (C <sub>26</sub> )          | 0,0158  | 0,0064        | 0,0348        | 0,0062        | 4,82                     | 1,08        | 4,11         | 0,39        |
| Octacosanol (C <sub>28</sub> )          | 0,0199  | 0,0073        | 0,0547        | 0,0094        | 6,11                     | 1,01        | 6,45         | 0,46        |
| Nonacosanol (C <sub>29</sub> )          | 0,0007  | 0,0009        | 0,0013        | 0,0005        | 0,22                     | 0,31        | 0,15         | 0,06        |
| Triacosanol (C <sub>30</sub> )          | 0,0458  | 0,0169        | 0,0397        | 0,0037        | 14,17                    | 1,87        | 4,75         | 0,66        |
| Hentriacontanol (C <sub>31</sub> )      | 0,0029  | 0,0026        | 0,0030        | 0,0011        | 0,95                     | 0,88        | 0,37         | 0,17        |
| Dotriacontanol (C <sub>32</sub> )       | 0,0470  | 0,0139        | 0,0340        | 0,0036        | 14,88                    | 2,13        | 4,07         | 0,50        |
| Tetratriacontanol (C <sub>34</sub> )    | 0,0147  | 0,0061        | 0,0174        | 0,0023        | 4,49                     | 0,64        | 2,07         | 0,30        |
| <b>Alkane</b>                           | <b>0,0912</b>   | <b>0,0293</b> | <b>0,5275</b> | <b>0,1544</b> | <b>28,47</b>             | <b>4,06</b> | <b>56,50</b> | <b>2,10</b> |
| Nonacosan (C <sub>29</sub> )            | 0,0342  | 0,0162        | 0,1383        | 0,0199        | 10,61                    | 4,48        | 16,46        | 1,98        |
| Hentriacontan (C <sub>31</sub> )        | 0,0431  | 0,0147        | 0,2473        | 0,0640        | 13,44                    | 1,29        | 28,85        | 2,19        |
| Trtriacontan (C <sub>33</sub> )         | 0,0139  | 0,0047        | 0,0954        | 0,0217        | 4,42                     | 1,07        | 11,19        | 1,22        |
| <b>Total</b>                            | <b>0,3194</b>   | <b>0,0907</b> | <b>0,8487</b> | <b>0,1523</b> | <b>100</b>               | <b>-</b>    | <b>100</b>   | <b>-</b>    |

Tab. 8.2.12. **Kutinzusammensetzung von *shn1***. Kutinmenge und -zusammensetzung von der Mutante *shn1* im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Ws. Dargestellt sind die absoluten Werte in Bezug auf die Fläche ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) und dem Trockengewicht der extrahierten Blätter ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) in Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung.

| Kutinmonomer (Kettenlänge)                              | Absolute Menge Kutin ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) |               |               |               | Absolute Menge Kutin ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}_{\text{lg}}^{-1}$ ) |               |               |               |
|---|---|---------------|---------------|---------------|---|---------------|---------------|---------------|
|   | Ws  |               | shn1          |               | Ws  |               | shn1          |               |
|   | Mw  | Sa            | Mw            | Sa            | Mw  | Sa            | Mw            | Sa            |
| <b>Säuren</b>   | <b>0,3178</b>   | <b>0,0574</b> | <b>0,2858</b> | <b>0,0283</b> | <b>0,6945</b>   | <b>0,0771</b> | <b>0,6507</b> | <b>0,1086</b> |
| Hexadecansäure (C <sub>16</sub> )                       | 0,1242  | 0,0339        | 0,0847        | 0,0090        | 0,2702  | 0,0550        | 0,1928        | 0,0332        |
| Octadecansäure (C <sub>18</sub> )                       | 0,0073  | 0,0015        | 0,0057        | 0,0007        | 0,0160  | 0,0022        | 0,0129        | 0,0006        |
| Octadecensäure (C <sub>18 (1)</sub> )                   | 0,0166  | 0,0026        | 0,0165        | 0,0014        | 0,0364  | 0,0035        | 0,0376        | 0,0057        |
| Octadecadiensäure (C <sub>18 (2)</sub> )                | 0,0416  | 0,0034        | 0,0476        | 0,0090        | 0,0912  | 0,0012        | 0,1088        | 0,0273        |
| Octadecatriensäure (C <sub>18 (3)</sub> )               | 0,0434  | 0,0044        | 0,0338        | 0,0059        | 0,0953  | 0,0031        | 0,0771        | 0,0180        |
| Eicosansäure (C <sub>20</sub> )                         | 0,0043  | 0,0010        | 0,0080        | 0,0015        | 0,0095  | 0,0018        | 0,0180        | 0,0033        |
| Docosansäure (C <sub>22</sub> )                         | 0,0154  | 0,0032        | 0,0165        | 0,0009        | 0,0337  | 0,0045        | 0,0374        | 0,0038        |
| Tricosansäure (C <sub>23</sub> )                        | 0,0014  | 0,0010        | 0,0027        | 0,0008        | 0,0029  | 0,0019        | 0,0060        | 0,0018        |
| Tetracosansäure (C <sub>24</sub> )                      | 0,0306  | 0,0029        | 0,0339        | 0,0032        | 0,0671  | 0,0029        | 0,0771        | 0,0125        |
| Tetracosensäure (C <sub>24 (1)</sub> )                  | 0,0063  | 0,0016        | 0,0052        | 0,0020        | 0,0138  | 0,0027        | 0,0120        | 0,0051        |
| Pentacosansäure (C <sub>25</sub> )                      | 0,0032  | 0,0012        | 0,0020        | 0,0005        | 0,0070  | 0,0022        | 0,0047        | 0,0015        |
| Triacotansäure (C <sub>30</sub> )                       | 0,0064  | 0,0010        | 0,0110        | 0,0008        | 0,0140  | 0,0013        | 0,0249        | 0,0020        |
| Ditriacotansäure (C <sub>32</sub> )                     | 0,0122  | 0,0025        | 0,0119        | 0,0018        | 0,0269  | 0,0065        | 0,0269        | 0,0043        |
| Tetracontansäure (C <sub>34</sub> )                     | 0,0048  | 0,0018        | 0,0063        | 0,0005        | 0,0105  | 0,0034        | 0,0144        | 0,0021        |
| <b>Alkohole</b>   | <b>0,0334</b>   | <b>0,0076</b> | <b>0,0580</b> | <b>0,0037</b> | <b>0,0729</b>   | <b>0,0136</b> | <b>0,1315</b> | <b>0,0139</b> |
| Hexadecanol (C <sub>16</sub> )                          | 0,0039  | 0,0007        | 0,0038        | 0,0012        | 0,0086  | 0,0016        | 0,0088        | 0,0029        |
| Octadecanol (C <sub>18</sub> )                          | 0,0124  | 0,0007        | 0,0172        | 0,0005        | 0,0273  | 0,0020        | 0,0391        | 0,0030        |
| Hexacosanol (C <sub>26</sub> )                          | 0,0079  | 0,0031        | 0,0200        | 0,0028        | 0,0172  | 0,0061        | 0,0453        | 0,0064        |
| Octacosanal (C <sub>28</sub> )                          | 0,0091  | 0,0033        | 0,0169        | 0,0019        | 0,0198  | 0,0064        | 0,0384        | 0,0065        |
| <b><math>\omega</math>-Hydroxysäuren</b>                | <b>0,0094</b>   | <b>0,0008</b> | <b>0,3720</b> | <b>0,0510</b> | <b>0,0207</b>   | <b>0,0005</b> | <b>0,8402</b> | <b>0,1083</b> |
| Hydroxyhexadecansäure (C <sub>16</sub> )                | 0,0094  | 0,0008        | 0,3720        | 0,0510        | 0,0207  | 0,0005        | 0,8402        | 0,1083        |
| <b><math>\alpha</math>-<math>\omega</math>-Disäuren</b> | <b>0,3708</b>   | <b>0,0110</b> | <b>2,3961</b> | <b>0,1100</b> | <b>0,8164</b>   | <b>0,0385</b> | <b>5,4203</b> | <b>0,3072</b> |
| Hexadecan-1,16-disäure (C <sub>16</sub> )               | 0,0426  | 0,0011        | 0,9693        | 0,0638        | 0,0938  | 0,0043        | 2,1918        | 0,1483        |
| Octadecan-1,18-disäure (C <sub>18</sub> )               | 0,0111  | 0,0013        | 0,0864        | 0,0063        | 0,0243  | 0,0010        | 0,1955        | 0,0153        |
| Octadecen-1,18-disäure (C <sub>18 (1)</sub> )           | 0,0419  | 0,0023        | 0,2233        | 0,0296        | 0,0924  | 0,0071        | 0,5048        | 0,0663        |
| Octadecadien-1,18-disäure (C <sub>18 (2)</sub> )        | 0,2752  | 0,0073        | 1,1171        | 0,0248        | 0,6058  | 0,0290        | 2,5282        | 0,1379        |
| <b>2-Hydroxysäuren</b>                                  | <b>0,4679</b>   | <b>0,0578</b> | <b>0,4597</b> | <b>0,0165</b> | <b>1,0259</b>   | <b>0,0709</b> | <b>1,0410</b> | <b>0,0781</b> |
| 2-Hydroxyhexadecansäure (C <sub>16</sub> )              | 0,0215  | 0,0039        | 0,0150        | 0,0050        | 0,0470  | 0,0057        | 0,0345        | 0,0134        |
| 2-Hydroxyeicosansäure (C <sub>20</sub> )                | 0,0058  | 0,0027        | 0,0037        | 0,0004        | 0,0125  | 0,0048        | 0,0085        | 0,0016        |
| 2-Hydroxydocosansäure (C <sub>22</sub> )                | 0,0510  | 0,0045        | 0,0645        | 0,0015        | 0,1120  | 0,0031        | 0,1459        | 0,0078        |
| 2-Hydroxytricosansäure (C <sub>23</sub> )               | 0,0092  | 0,0021        | 0,0078        | 0,0007        | 0,0200  | 0,0036        | 0,0179        | 0,0029        |
| 2-Hydroxytricosensäure (C <sub>23 (1)</sub> )           | 0,0058  | 0,0016        | 0,0050        | 0,0008        | 0,0128  | 0,0036        | 0,0114        | 0,0025        |
| 2-Hydroxytetracosansäure (C <sub>24</sub> )             | 0,1773  | 0,0194        | 0,1961        | 0,0077        | 0,3889  | 0,0214        | 0,4437        | 0,0267        |
| 2-Hydroxytetracosensäure (C <sub>24 (1)</sub> )         | 0,1040  | 0,0117        | 0,0853        | 0,0046        | 0,2281  | 0,0146        | 0,1931        | 0,0147        |
| 2-Hydroxypentacosansäure (C <sub>25</sub> )             | 0,0139  | 0,0033        | 0,0103        | 0,0009        | 0,0303  | 0,0056        | 0,0234        | 0,0031        |
| 2-Hydroxypentacosensäure (C <sub>25 (1)</sub> )         | 0,0082  | 0,0024        | 0,0044        | 0,0007        | 0,0179  | 0,0042        | 0,0099        | 0,0019        |
| 2-Hydroxyhexacosansäure (C <sub>26</sub> )              | 0,0534  | 0,0048        | 0,0544        | 0,0029        | 0,1172  | 0,0040        | 0,1231        | 0,0053        |
| 2-Hydroxyhexacosensäure (C <sub>26 (1)</sub> )          | 0,0121  | 0,0019        | 0,0066        | 0,0006        | 0,0267  | 0,0037        | 0,0149        | 0,0009        |
| 2-Hydroxyheptacosansäure (C <sub>27</sub> )             | 0,0057  | 0,0013        | 0,0065        | 0,0008        | 0,0124  | 0,0027        | 0,0147        | 0,0012        |
| <b>"midchain" oxygenierte Hydroxysäure</b>              | <b>0,0069</b>   | <b>0,0009</b> | <b>0,0930</b> | <b>0,0162</b> | <b>0,0152</b>   | <b>0,0008</b> | <b>0,2105</b> | <b>0,0394</b> |
| 9 (10),16-Dihydroxyhexadecansäure (C <sub>16</sub> )    | 0,0069  | 0,0009        | 0,0930        | 0,0162        | 0,0152  | 0,0008        | 0,2105        | 0,0394        |
| <b>Total</b>  | <b>1,2062</b>   | <b>0,1310</b> | <b>3,6647</b> | <b>0,1524</b> | <b>2,6455</b>   | <b>0,1176</b> | <b>8,2941</b> | <b>0,5469</b> |

Tab. 8.2.13. **Wachszusammensetzung von *shn3***. Wachsmenge und -zusammensetzung von der Mutante *shn3* im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Ws. Dargestellt sind die absoluten ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) und die prozentualen Mengen (%) in Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung.

| Wachsmonomer (Kettenlänge)              | Absolute Menge Wachs ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) |               |               |               | Relative Menge Wachs (%) |             |              |             |
|---|---|---------------|---------------|---------------|--------------------------|-------------|--------------|-------------|
|   | Ws  |               | <i>shn3</i>   |               | Ws                       |             | <i>shn3</i>  |             |
|   | MW  | SA            | MW            | SA            | MW                       | SA          | MW           | SA          |
| <b>Säuren</b>                           | <b>0,0853</b>   | <b>0,0047</b> | <b>0,1413</b> | <b>0,0100</b> | <b>11,86</b>             | <b>0,55</b> | <b>15,67</b> | <b>1,78</b> |
| Tetracosansäure (C <sub>24</sub> )      | 0,0087  | 0,0011        | 0,0051        | 0,0012        | 1,20                     | 0,10        | 0,55         | 0,12        |
| Hexacosansäure (C <sub>26</sub> )       | 0,0286  | 0,0036        | 0,0164        | 0,0040        | 3,96                     | 0,31        | 1,80         | 0,39        |
| Octacosansäure (C <sub>28</sub> )       | 0,0096  | 0,0008        | 0,0121        | 0,0009        | 1,33                     | 0,06        | 1,33         | 0,08        |
| Triacosansäure (C <sub>30</sub> )       | 0,0061  | 0,0009        | 0,0117        | 0,0009        | 0,84                     | 0,06        | 1,30         | 0,19        |
| Dotriacontansäure (C <sub>32</sub> )    | 0,0139  | 0,0039        | 0,0385        | 0,0060        | 1,98                     | 0,74        | 4,28         | 0,85        |
| Tetratriacontansäure (C <sub>34</sub> ) | 0,0184  | 0,0025        | 0,0576        | 0,0042        | 2,54                     | 0,18        | 6,40         | 0,87        |
| <b>Aldehyde</b>                         | <b>0,1191</b>   | <b>0,0236</b> | <b>0,1817</b> | <b>0,0461</b> | <b>16,41</b>             | <b>2,00</b> | <b>19,75</b> | <b>2,27</b> |
| Octacosanal (C <sub>28</sub> )          | 0,0130  | 0,0016        | 0,0131        | 0,0036        | 1,80                     | 0,07        | 1,43         | 0,20        |
| Triacosanal (C <sub>30</sub> )          | 0,0209  | 0,0024        | 0,0273        | 0,0059        | 2,89                     | 0,14        | 2,98         | 0,28        |
| Dotriacontanal (C <sub>32</sub> )       | 0,0459  | 0,0084        | 0,0704        | 0,0172        | 6,35                     | 0,79        | 7,67         | 0,83        |
| Tetratriacontanal (C <sub>34</sub> )    | 0,0393  | 0,0117        | 0,0708        | 0,0197        | 5,37                     | 1,20        | 7,68         | 1,04        |
| <b>Alkohole</b>                         | <b>0,2874</b>   | <b>0,0208</b> | <b>0,1773</b> | <b>0,0141</b> | <b>39,90</b>             | <b>1,03</b> | <b>19,62</b> | <b>1,77</b> |
| Hexacosanol (C <sub>26</sub> )          | 0,0491  | 0,0046        | 0,0186        | 0,0031        | 6,83                     | 0,57        | 2,05         | 0,28        |
| Octacosanol (C <sub>28</sub> )          | 0,0609  | 0,0060        | 0,0364        | 0,0050        | 8,44                     | 0,54        | 4,01         | 0,41        |
| Nonacosanol (C <sub>29</sub> )          | 0,0019  | 0,0004        | 0,0017        | 0,0003        | 0,27                     | 0,04        | 0,19         | 0,04        |
| Triacosanol (C <sub>30</sub> )          | 0,0749  | 0,0062        | 0,0422        | 0,0043        | 10,40                    | 0,49        | 4,68         | 0,65        |
| Hentriacontanol (C <sub>31</sub> )      | 0,0056  | 0,0011        | 0,0032        | 0,0009        | 0,78                     | 0,09        | 0,35         | 0,09        |
| Dotriacontanol (C <sub>32</sub> )       | 0,0720  | 0,0049        | 0,0435        | 0,0045        | 10,00                    | 0,48        | 4,82         | 0,54        |
| Tetratriacontanol (C <sub>34</sub> )    | 0,0230  | 0,0027        | 0,0317        | 0,0025        | 3,18                     | 0,24        | 3,53         | 0,51        |
| <b>Alkane</b>                           | <b>0,2296</b>   | <b>0,0228</b> | <b>0,4101</b> | <b>0,0638</b> | <b>31,83</b>             | <b>1,19</b> | <b>44,95</b> | <b>1,56</b> |
| Nonacosan (C <sub>29</sub> )            | 0,0597  | 0,0069        | 0,0708        | 0,0068        | 8,30                     | 0,85        | 7,81         | 0,40        |
| Hentriacontan (C <sub>31</sub> )        | 0,1298  | 0,0118        | 0,2475        | 0,0397        | 17,99                    | 0,31        | 27,12        | 1,10        |
| Triatriacontan (C <sub>33</sub> )       | 0,0401  | 0,0069        | 0,0918        | 0,0179        | 5,53                     | 0,59        | 10,02        | 0,73        |
| <b>Total</b>                            | <b>0,7214</b>   | <b>0,0671</b> | <b>0,9103</b> | <b>0,1210</b> | <b>100</b>               | <b>-</b>    | <b>100</b>   | <b>-</b>    |

Tab. 8.2.14. **Kutinzusammensetzung von *shn3***. Kutinmenge und -zusammensetzung von der Mutante *shn3* im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Ws. Dargestellt sind die absoluten Werte in Bezug auf die Fläche ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) und dem Trockengewicht der extrahierten Blätter ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) in Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung.

| Kutinmonomer (Kettenlänge)                              | Absolute Menge Kutin ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) |               |               |               | Absolute Menge Kutin ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}_{\text{tg}}^{-1}$ ) |               |               |               |
|---|---|---------------|---------------|---------------|---|---------------|---------------|---------------|
|   | Ws  |               | shn3          |               | Ws  |               | shn3          |               |
|   | Mw  | Sa            | Mw            | Sa            | Mw  | Sa            | Mw            | Sa            |
| <b>Säuren</b>   | <b>0,3178</b>   | <b>0,0574</b> | <b>0,2649</b> | <b>0,0390</b> | <b>0,6945</b>   | <b>0,0771</b> | <b>0,6628</b> | <b>0,0171</b> |
| Hexadecansäure (C <sub>16</sub> )                       | 0,1242  | 0,0339        | 0,0875        | 0,0213        | 0,2702  | 0,0550        | 0,2170        | 0,0299        |
| Octadecansäure (C <sub>18</sub> )                       | 0,0073  | 0,0015        | 0,0075        | 0,0032        | 0,0160  | 0,0022        | 0,0184        | 0,0060        |
| Octadecensäure (C <sub>18 (1)</sub> )                   | 0,0166  | 0,0026        | 0,0144        | 0,0016        | 0,0364  | 0,0035        | 0,0362        | 0,0029        |
| Octadecadiensäure (C <sub>18 (2)</sub> )                | 0,0416  | 0,0034        | 0,0348        | 0,0089        | 0,0912  | 0,0012        | 0,0864        | 0,0120        |
| Octadecatriensäure (C <sub>18 (3)</sub> )               | 0,0434  | 0,0044        | 0,0361        | 0,0102        | 0,0953  | 0,0031        | 0,0893        | 0,0154        |
| Eicosansäure (C <sub>20</sub> )                         | 0,0043  | 0,0010        | 0,0026        | 0,0007        | 0,0095  | 0,0018        | 0,0064        | 0,0010        |
| Docosansäure (C <sub>22</sub> )                         | 0,0154  | 0,0032        | 0,0141        | 0,0001        | 0,0337  | 0,0045        | 0,0356        | 0,0047        |
| Tricosansäure (C <sub>23</sub> )                        | 0,0014  | 0,0010        | 0,0004        | 0,0005        | 0,0029  | 0,0019        | 0,0010        | 0,0011        |
| Tetracosansäure (C <sub>24</sub> )                      | 0,0306  | 0,0029        | 0,0323        | 0,0025        | 0,0671  | 0,0029        | 0,0824        | 0,0172        |
| Tetracosensäure (C <sub>24 (1)</sub> )                  | 0,0063  | 0,0016        | 0,0056        | 0,0025        | 0,0138  | 0,0027        | 0,0148        | 0,0085        |
| Pentacosansäure (C <sub>25</sub> )                      | 0,0032  | 0,0012        | 0,0027        | 0,0006        | 0,0070  | 0,0022        | 0,0069        | 0,0019        |
| Triacosansäure (C <sub>30</sub> )                       | 0,0064  | 0,0010        | 0,0068        | 0,0003        | 0,0140  | 0,0013        | 0,0171        | 0,0018        |
| Ditriacosansäure (C <sub>32</sub> )                     | 0,0122  | 0,0025        | 0,0127        | 0,0020        | 0,0269  | 0,0065        | 0,0326        | 0,0095        |
| Tetraacosansäure (C <sub>34</sub> )                     | 0,0048  | 0,0018        | 0,0074        | 0,0011        | 0,0105  | 0,0034        | 0,0185        | 0,0006        |
| <b>Alkohole</b>   | <b>0,0334</b>   | <b>0,0076</b> | <b>0,0482</b> | <b>0,0001</b> | <b>0,0729</b>   | <b>0,0136</b> | <b>0,1221</b> | <b>0,0159</b> |
| Hexadecanol (C <sub>16</sub> )                          | 0,0039  | 0,0007        | 0,0027        | 0,0013        | 0,0086  | 0,0016        | 0,0066        | 0,0028        |
| Octadecanol (C <sub>18</sub> )                          | 0,0124  | 0,0007        | 0,0169        | 0,0042        | 0,0273  | 0,0020        | 0,0436        | 0,0167        |
| Hexacosanol (C <sub>26</sub> )                          | 0,0079  | 0,0031        | 0,0146        | 0,0014        | 0,0172  | 0,0061        | 0,0367        | 0,0024        |
| Octacosanal (C <sub>28</sub> )                          | 0,0091  | 0,0033        | 0,0140        | 0,0015        | 0,0198  | 0,0064        | 0,0352        | 0,0015        |
| <b><math>\omega</math>-Hydroxysäuren</b>                | <b>0,0094</b>   | <b>0,0008</b> | <b>0,0409</b> | <b>0,0134</b> | <b>0,0207</b>   | <b>0,0005</b> | <b>0,1027</b> | <b>0,0301</b> |
| Hydroxyhexadecansäure (C <sub>16</sub> )                | 0,0094  | 0,0008        | 0,0409        | 0,0134        | 0,0207  | 0,0005        | 0,1027        | 0,0301        |
| <b><math>\alpha</math>-<math>\omega</math>-Disäuren</b> | <b>0,3708</b>   | <b>0,0110</b> | <b>0,5245</b> | <b>0,1266</b> | <b>0,8164</b>   | <b>0,0385</b> | <b>1,3154</b> | <b>0,2555</b> |
| Hexadecan-1,16-disäure (C <sub>16</sub> )               | 0,0426  | 0,0011        | 0,1138        | 0,0367        | 0,0938  | 0,0043        | 0,2867        | 0,0878        |
| Octadecan-1,18-disäure (C <sub>18</sub> )               | 0,0111  | 0,0013        | 0,0187        | 0,0048        | 0,0243  | 0,0010        | 0,0471        | 0,0114        |
| Octadecen-1,18-disäure (C <sub>18 (1)</sub> )           | 0,0419  | 0,0023        | 0,0468        | 0,0092        | 0,0924  | 0,0071        | 0,1177        | 0,0206        |
| Octadecadien-1,18-disäure (C <sub>18 (2)</sub> )        | 0,2752  | 0,0073        | 0,3452        | 0,0789        | 0,6058  | 0,0290        | 0,8638        | 0,1398        |
| <b>2-Hydroxysäuren</b>                                  | <b>0,4679</b>   | <b>0,0578</b> | <b>0,4566</b> | <b>0,0664</b> | <b>1,0259</b>   | <b>0,0709</b> | <b>1,1604</b> | <b>0,2529</b> |
| 2-Hydroxyhexadecansäure (C <sub>16</sub> )              | 0,0215  | 0,0039        | 0,0197        | 0,0031        | 0,0470  | 0,0057        | 0,0502        | 0,0124        |
| 2-Hydroxyeicosansäure (C <sub>20</sub> )                | 0,0058  | 0,0027        | 0,0050        | 0,0008        | 0,0125  | 0,0048        | 0,0127        | 0,0033        |
| 2-Hydroxydocosansäure (C <sub>22</sub> )                | 0,0510  | 0,0045        | 0,0538        | 0,0111        | 0,1120  | 0,0031        | 0,1368        | 0,0370        |
| 2-Hydroxytricosansäure (C <sub>23</sub> )               | 0,0092  | 0,0021        | 0,0083        | 0,0017        | 0,0200  | 0,0036        | 0,0214        | 0,0071        |
| 2-Hydroxytricosensäure (C <sub>23 (1)</sub> )           | 0,0058  | 0,0016        | 0,0043        | 0,0005        | 0,0128  | 0,0036        | 0,0111        | 0,0025        |
| 2-Hydroxytetracosansäure (C <sub>24</sub> )             | 0,1773  | 0,0194        | 0,1852        | 0,0293        | 0,3889  | 0,0214        | 0,4710        | 0,1080        |
| 2-Hydroxytetracosensäure (C <sub>24 (1)</sub> )         | 0,1040  | 0,0117        | 0,0940        | 0,0123        | 0,2281  | 0,0146        | 0,2382        | 0,0440        |
| 2-Hydroxypentacosansäure (C <sub>25</sub> )             | 0,0139  | 0,0033        | 0,0120        | 0,0009        | 0,0303  | 0,0056        | 0,0306        | 0,0060        |
| 2-Hydroxypentacosensäure (C <sub>25 (1)</sub> )         | 0,0082  | 0,0024        | 0,0061        | 0,0005        | 0,0179  | 0,0042        | 0,0156        | 0,0034        |
| 2-Hydroxyhexacosansäure (C <sub>26</sub> )              | 0,0534  | 0,0048        | 0,0533        | 0,0069        | 0,1172  | 0,0040        | 0,1353        | 0,0260        |
| 2-Hydroxyhexacosensäure (C <sub>26 (1)</sub> )          | 0,0121  | 0,0019        | 0,0096        | 0,0009        | 0,0267  | 0,0037        | 0,0244        | 0,0039        |
| 2-Hydroxyheptacosansäure (C <sub>27</sub> )             | 0,0057  | 0,0013        | 0,0051        | 0,0006        | 0,0124  | 0,0027        | 0,0130        | 0,0023        |
| <b>"midchain" oxygenierte Hydroxysäure</b>              | <b>0,0069</b>   | <b>0,0009</b> | <b>0,0130</b> | <b>0,0039</b> | <b>0,0152</b>   | <b>0,0008</b> | <b>0,0330</b> | <b>0,0098</b> |
| 9 (10),16-Dihydroxyhexadecansäure (C <sub>16</sub> )    | 0,0069  | 0,0009        | 0,0130        | 0,0039        | 0,0152  | 0,0008        | 0,0330        | 0,0098        |
| <b>Total</b>  | <b>1,2062</b>   | <b>0,1310</b> | <b>1,3481</b> | <b>0,2150</b> | <b>2,6455</b>   | <b>0,1176</b> | <b>3,3963</b> | <b>0,5060</b> |

Tab. 8.2.15. **Wachszusammensetzung von *bdg***. Wachsmenge und -zusammensetzung von der Mutante *bdg* im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Col-8. Dargestellt sind die absoluten ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) und die prozentualen Mengen (%) in Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung.

| Wachsmonomer (Kettenlänge)             | <u>Absolute Menge Wachs (<math>\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}</math>)</u> |               |               |               | <u>Relative Menge Wachs (%)</u> |             |              |             |
|--|---|---------------|---------------|---------------|---------------------------------|-------------|--------------|-------------|
|  | Col-8   |               | <i>bdg</i>    |               | Col-8                           |             | <i>bdg</i>   |             |
|  | MW  | SA            | MW            | SA            | MW                              | SA          | MW           | SA          |
| <b>Säuren</b>                          | <b>0,1033</b>   | <b>0,0390</b> | <b>0,1336</b> | <b>0,0373</b> | <b>18,89</b>                    | <b>3,08</b> | <b>17,24</b> | <b>3,21</b> |
| Tetracosansäure (C <sub>24</sub> )     | 0,0182  | 0,0098        | 0,0215        | 0,0043        | 3,29                            | 1,03        | 2,80         | 0,38        |
| Hexacosansäure (C <sub>26</sub> )      | 0,0290  | 0,0064        | 0,0450        | 0,0099        | 5,50                            | 0,79        | 5,83         | 0,79        |
| Octacosansäure (C <sub>28</sub> )      | 0,0080  | 0,0015        | 0,0113        | 0,0032        | 1,55                            | 0,38        | 1,47         | 0,33        |
| Triacosansäure (C <sub>30</sub> )      | 0,0090  | 0,0055        | 0,0080        | 0,0024        | 1,56                            | 0,65        | 1,03         | 0,22        |
| Dotriacosansäure (C <sub>32</sub> )    | 0,0138  | 0,0052        | 0,0205        | 0,0055        | 2,54                            | 0,61        | 2,64         | 0,45        |
| Tetratriacosansäure (C <sub>34</sub> ) | 0,0254  | 0,0130        | 0,0273        | 0,0139        | 4,46                            | 1,03        | 3,47         | 1,45        |
| <b>Aldehyde</b>                        | <b>0,0859</b>   | <b>0,0200</b> | <b>0,1099</b> | <b>0,0261</b> | <b>16,22</b>                    | <b>1,57</b> | <b>14,30</b> | <b>2,77</b> |
| Octacosanal (C <sub>28</sub> )         | 0,0072  | 0,0014        | 0,0109        | 0,0024        | 1,39                            | 0,27        | 1,44         | 0,37        |
| Triacosanal (C <sub>30</sub> )         | 0,0134  | 0,0027        | 0,0189        | 0,0046        | 2,57                            | 0,45        | 2,48         | 0,66        |
| Dotriacosanal (C <sub>32</sub> )       | 0,0414  | 0,0093        | 0,0540        | 0,0105        | 7,83                            | 0,83        | 7,03         | 0,88        |
| Tetratriacosanal (C <sub>34</sub> )    | 0,0239  | 0,0080        | 0,0260        | 0,0118        | 4,43                            | 0,65        | 3,35         | 1,28        |
| <b>Alkohole</b>                        | <b>0,2385</b>   | <b>0,1053</b> | <b>0,3028</b> | <b>0,0452</b> | <b>42,66</b>                    | <b>6,06</b> | <b>39,50</b> | <b>3,10</b> |
| Hexacosanol (C <sub>26</sub> )         | 0,0429  | 0,0294        | 0,0518        | 0,0218        | 7,34                            | 3,04        | 6,76         | 2,56        |
| Octacosanol (C <sub>28</sub> )         | 0,0684  | 0,0443        | 0,0890        | 0,0108        | 11,58                           | 4,22        | 11,65        | 1,08        |
| Nonacosanol (C <sub>29</sub> )         | 0,0004  | 0,0003        | 0,0014        | 0,0005        | 0,09                            | 0,09        | 0,18         | 0,07        |
| Triacosanol (C <sub>30</sub> )         | 0,0385  | 0,0110        | 0,0503        | 0,0093        | 7,19                            | 0,90        | 6,56         | 0,80        |
| Hentriacosanol (C <sub>31</sub> )      | 0,0065  | 0,0015        | 0,0095        | 0,0028        | 1,23                            | 0,22        | 1,26         | 0,45        |
| Dotriacosanol (C <sub>32</sub> )       | 0,0609  | 0,0197        | 0,0758        | 0,0292        | 11,41                           | 2,76        | 9,85         | 3,04        |
| Tetratriacosanol (C <sub>34</sub> )    | 0,0210  | 0,0082        | 0,0250        | 0,0059        | 3,81                            | 0,55        | 3,24         | 0,49        |
| <b>Alkane</b>                          | <b>0,1134</b>   | <b>0,0287</b> | <b>0,2194</b> | <b>0,0494</b> | <b>22,22</b>                    | <b>7,58</b> | <b>28,96</b> | <b>7,18</b> |
| Nonacosan (C <sub>29</sub> )           | 0,0433  | 0,0065        | 0,0760        | 0,0119        | 8,39                            | 1,72        | 10,00        | 1,82        |
| Hentriacosan (C <sub>31</sub> )        | 0,0502  | 0,0191        | 0,1068        | 0,0296        | 9,96                            | 4,83        | 14,13        | 4,25        |
| Tritriacosan (C <sub>33</sub> )        | 0,0199  | 0,0066        | 0,0367        | 0,0086        | 3,87                            | 1,32        | 4,83         | 1,15        |
| <b>Total</b>                           | <b>0,5412</b>   | <b>0,1720</b> | <b>0,7657</b> | <b>0,0884</b> | <b>100</b>                      | <b>-</b>    | <b>100</b>   | <b>-</b>    |

Tab. 8.2.16. **Wachszusammensetzung von att1.** Wachsmenge und -zusammensetzung von der Mutante *att1* im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Col-8. Dargestellt sind die absoluten ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) und die prozentualen Mengen (%) in Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung.

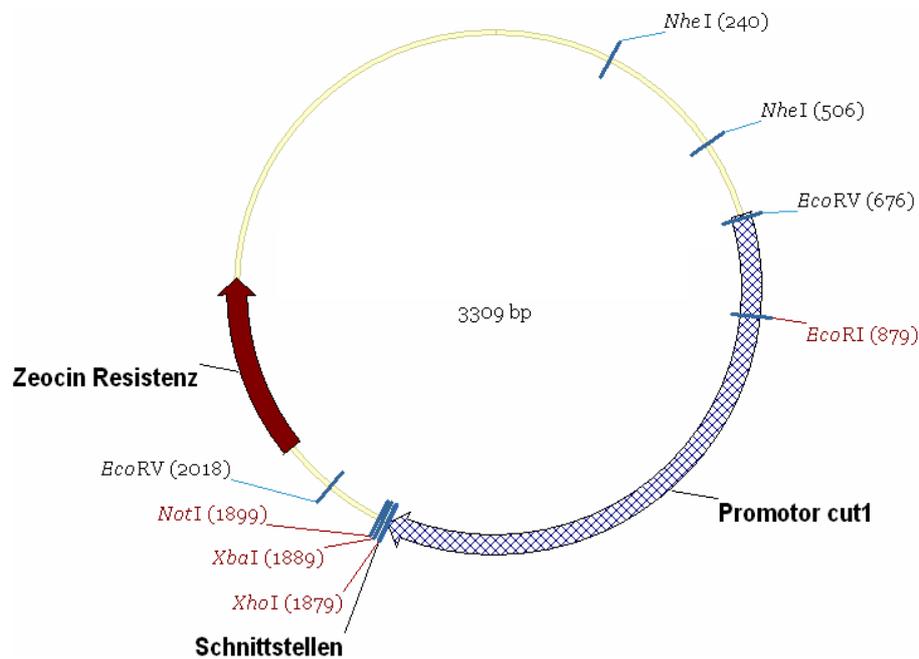
| Wachsmonomer (Kettenlänge)              | <u>Absolute Menge Wachs (<math>\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}</math>)</u> |               |               |               | <u>Relative Menge Wachs (%)</u> |             |              |             |
|---|---|---------------|---------------|---------------|---------------------------------|-------------|--------------|-------------|
|   | Col-8   |               | <i>att1</i>   |               | Col-8                           |             | <i>att1</i>  |             |
|   | MW  | SA            | MW            | SA            | MW                              | SA          | MW           | SA          |
| <b>Säuren</b>                           | <b>0,0600</b>   | <b>0,0103</b> | <b>0,0849</b> | <b>0,0043</b> | <b>18,47</b>                    | <b>0,36</b> | <b>22,66</b> | <b>1,17</b> |
| Tetracosansäure (C <sub>24</sub> )      | 0,0053  | 0,0009        | 0,0084        | 0,0003        | 1,64                            | 0,11        | 2,24         | 0,10        |
| Hexacosansäure (C <sub>26</sub> )       | 0,0218  | 0,0033        | 0,0348        | 0,0015        | 6,73                            | 0,07        | 9,30         | 0,44        |
| Octacosansäure (C <sub>28</sub> )       | 0,0059  | 0,0005        | 0,0081        | 0,0001        | 1,82                            | 0,19        | 2,15         | 0,02        |
| Triacotansäure (C <sub>30</sub> )       | 0,0035  | 0,0005        | 0,0042        | 0,0004        | 1,08                            | 0,05        | 1,12         | 0,09        |
| Dotriacotansäure (C <sub>32</sub> )     | 0,0104  | 0,0011        | 0,0139        | 0,0023        | 3,24                            | 0,35        | 3,71         | 0,64        |
| Tetratriacontansäure (C <sub>34</sub> ) | 0,0132  | 0,0049        | 0,0155        | 0,0040        | 3,97                            | 1,07        | 4,14         | 1,05        |
| <b>Aldehyde</b>                         | <b>0,0420</b>   | <b>0,0301</b> | <b>0,0527</b> | <b>0,0089</b> | <b>12,16</b>                    | <b>7,34</b> | <b>14,04</b> | <b>2,25</b> |
| Octacosanal (C <sub>28</sub> )          | 0,0041  | 0,0027        | 0,0052        | 0,0005        | 1,20                            | 0,62        | 1,38         | 0,12        |
| Triacotanal (C <sub>30</sub> )          | 0,0073  | 0,0056        | 0,0095        | 0,0015        | 2,12                            | 1,34        | 2,52         | 0,38        |
| 22.66Dotriacotanal (C <sub>32</sub> )   | 0,0182  | 0,0123        | 0,0230        | 0,0037        | 5,30                            | 2,93        | 6,12         | 0,94        |
| Tetratriacontanal (C <sub>34</sub> )    | 0,0123  | 0,0097        | 0,0151        | 0,0032        | 3,54                            | 2,48        | 4,02         | 0,82        |
| <b>Alkohole</b>                         | <b>0,1320</b>   | <b>0,0156</b> | <b>0,1303</b> | <b>0,0018</b> | <b>40,90</b>                    | <b>2,63</b> | <b>34,78</b> | <b>0,42</b> |
| Hexacosanol (C <sub>26</sub> )          | 0,0095  | 0,0003        | 0,0109        | 0,0013        | 2,99                            | 0,54        | 2,90         | 0,37        |
| Octacosanol (C <sub>28</sub> )          | 0,0188  | 0,0016        | 0,0211        | 0,0022        | 5,85                            | 0,59        | 5,65         | 0,63        |
| Nonacosanol (C <sub>29</sub> )          | 0,0010  | 0,0000        | 0,0012        | 0,0001        | 0,31                            | 0,05        | 0,33         | 0,04        |
| Triacotanol (C <sub>30</sub> )          | 0,0333  | 0,0050        | 0,0310        | 0,0011        | 10,30                           | 0,63        | 8,27         | 0,23        |
| Hentriacontanol (C <sub>31</sub> )      | 0,0027  | 0,0003        | 0,0031        | 0,0002        | 0,85                            | 0,09        | 0,83         | 0,06        |
| Dotriacotanol (C <sub>32</sub> )        | 0,0569  | 0,0084        | 0,0540        | 0,0024        | 17,58                           | 0,74        | 14,40        | 0,51        |
| Tetratriacontanol (C <sub>34</sub> )    | 0,0097  | 0,0018        | 0,0090        | 0,0006        | 3,02                            | 0,62        | 2,40         | 0,15        |
| <b>Alkane</b>                           | <b>0,0906</b>   | <b>0,0036</b> | <b>0,1068</b> | <b>0,0080</b> | <b>28,47</b>                    | <b>5,36</b> | <b>28,51</b> | <b>2,32</b> |
| Nonacosan (C <sub>29</sub> )            | 0,0298  | 0,0017        | 0,0340        | 0,0030        | 9,39                            | 2,03        | 9,07         | 0,87        |
| Hentriacontan (C <sub>31</sub> )        | 0,0451  | 0,0031        | 0,0547        | 0,0040        | 14,20                           | 2,81        | 14,60        | 1,15        |
| Triacotant (C <sub>33</sub> )           | 0,0156  | 0,0006        | 0,0181        | 0,0010        | 4,88                            | 0,64        | 4,83         | 0,31        |
| <b>Total</b>                            | <b>0,3246</b>   | <b>0,0524</b> | <b>0,3746</b> | <b>0,0032</b> | <b>100</b>                      | <b>-</b>    | <b>100</b>   | <b>-</b>    |

Tab. 8.2.17. **Kutinmenge und -zusammensetzung von att1.** Kutinmenge und -zusammensetzung von der Mutante *att1* im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Col-8. Dargestellt sind die absoluten Werte in Bezug auf die Fläche ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) und dem Trockengewicht der extrahierten Blätter ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}_{\text{tg}}^{-1}$ ) in Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung. Bei *att1* konnte nur eine Parallele untersucht werden, so dass keine Standardabweichung berechnet werden konnte.

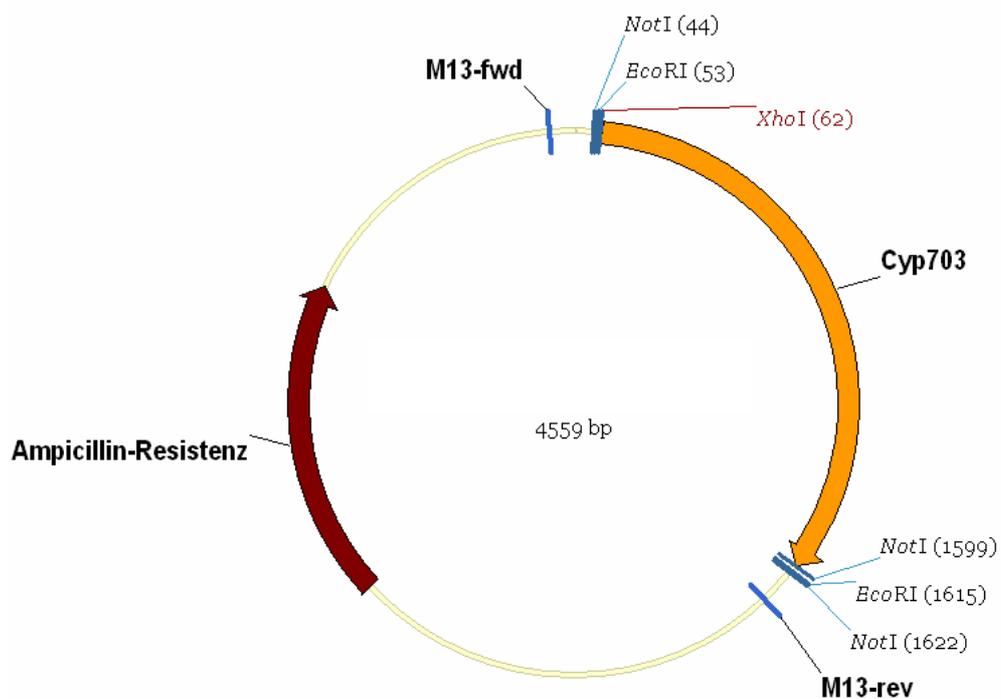
| Kutinmonomer (Kettenlänge)                              | Absolute Menge Kutin ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) |               |               |    | Absolute Menge Kutin ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}_{\text{ig}}^{-1}$ ) |               |               |    |
|---|---|---------------|---------------|----|---|---------------|---------------|----|
|   | Col-8   |               | att1          |    | Col-8   |               | att1          |    |
|   | Mw  | Sa            | Mw            | Sa | Mw  | Sa            | Mw            | Sa |
| <b>Säuren</b>   | <b>0,4963</b>   | <b>0,1078</b> | <b>0,3297</b> | -  | <b>0,9157</b>   | <b>0,1856</b> | <b>0,6392</b> | -  |
| Hexadecansäure (C16)                                    | 0,1908  | 0,0520        | 0,1067        | -  | 0,3519  | 0,0909        | 0,2068        | -  |
| Octadecansäure (C18)                                    | 0,0117  | 0,0023        | 0,0154        | -  | 0,0216  | 0,0035        | 0,0299        | -  |
| Octadecensäure (C18 (1))                                | 0,0270  | 0,0042        | 0,0180        | -  | 0,0500  | 0,0079        | 0,0349        | -  |
| Octadecadiensäure (C18 (2))                             | 0,0844  | 0,0247        | 0,0242        | -  | 0,1553  | 0,0416        | 0,0468        | -  |
| Octadecatriensäure (C18 (3))                            | 0,0710  | 0,0135        | 0,0370        | -  | 0,1313  | 0,0251        | 0,0717        | -  |
| Eicosansäure (C20)                                      | 0,0088  | 0,0021        | 0,0060        | -  | 0,0163  | 0,0036        | 0,0117        | -  |
| Docosansäure (C22)                                      | 0,0210  | 0,0028        | 0,0172        | -  | 0,0388  | 0,0050        | 0,0334        | -  |
| Tricosansäure (C23)                                     | 0,0022  | 0,0027        | 0,0015        | -  | 0,0039  | 0,0048        | 0,0029        | -  |
| Tetracosansäure (C24)                                   | 0,0427  | 0,0020        | 0,0626        | -  | 0,0790  | 0,0050        | 0,1215        | -  |
| Tetracosensäure (C24 (1))                               | 0,0077  | 0,0019        | 0,0086        | -  | 0,0141  | 0,0031        | 0,0167        | -  |
| Pentacosansäure (C25)                                   | 0,0041  | 0,0011        | 0,0055        | -  | 0,0076  | 0,0020        | 0,0108        | -  |
| Triacosansäure (C30)                                    | 0,0069  | 0,0009        | 0,0082        | -  | 0,0128  | 0,0016        | 0,0160        | -  |
| Ditriacosansäure (C32)                                  | 0,0127  | 0,0009        | 0,0131        | -  | 0,0234  | 0,0012        | 0,0255        | -  |
| Tetraacosansäure (C34)                                  | 0,0052  | 0,0012        | 0,0056        | -  | 0,0097  | 0,0023        | 0,0108        | -  |
| <b>Alkohole</b>   | <b>0,0306</b>   | <b>0,0056</b> | <b>0,0497</b> | -  | <b>0,0566</b>   | <b>0,0105</b> | <b>0,0964</b> | -  |
| Hexadecanol (C16)                                       | 0,0090  | 0,0030        | 0,0034        | -  | 0,0165  | 0,0051        | 0,0066        | -  |
| Octadecanol (C18)                                       | 0,0138  | 0,0012        | 0,0306        | -  | 0,0256  | 0,0031        | 0,0593        | -  |
| Hexacosanol (C26)                                       | 0,0030  | 0,0011        | 0,0065        | -  | 0,0056  | 0,0022        | 0,0126        | -  |
| Octacosanal (C28)                                       | 0,0048  | 0,0015        | 0,0092        | -  | 0,0089  | 0,0028        | 0,0179        | -  |
| <b><math>\omega</math>-Hydroxysäuren</b>                | <b>0,0093</b>   | <b>0,0005</b> | <b>0,0070</b> | -  | <b>0,0172</b>   | <b>0,0003</b> | <b>0,0135</b> | -  |
| Hydroxyhexadecansäure (C16)                             | 0,0093  | 0,0005        | 0,0070        | -  | 0,0172  | 0,0003        | 0,0135        | -  |
| <b><math>\alpha</math>-<math>\omega</math>-Disäuren</b> | <b>0,5229</b>   | <b>0,0702</b> | <b>0,1059</b> | -  | <b>0,9639</b>   | <b>0,0978</b> | <b>0,2053</b> | -  |
| Hexadecan-1,16-disäure (C16)                            | 0,0601  | 0,0029        | 0,0123        | -  | 0,1111  | 0,0027        | 0,0239        | -  |
| Octadecan-1,18-disäure (C18)                            | 0,0135  | 0,0013        | 0,0034        | -  | 0,0248  | 0,0016        | 0,0067        | -  |
| Octadecen-1,18-disäure (C18 (1))                        | 0,0606  | 0,0036        | 0,0141        | -  | 0,1119  | 0,0029        | 0,0274        | -  |
| Octadecadien-1,18-disäure (C18 (2))                     | 0,3887  | 0,0649        | 0,0760        | -  | 0,7161  | 0,0967        | 0,1474        | -  |
| <b>2-Hydroxysäuren</b>                                  | <b>0,4880</b>   | <b>0,0556</b> | <b>0,6132</b> | -  | <b>0,9003</b>   | <b>0,0766</b> | <b>1,1891</b> | -  |
| 2-Hydroxyhexadecansäure (C16)                           | 0,0244  | 0,0047        | 0,0343        | -  | 0,0449  | 0,0075        | 0,0666        | -  |
| 2-Hydroxyeicosansäure (C20)                             | 0,0049  | 0,0014        | 0,0028        | -  | 0,0090  | 0,0023        | 0,0055        | -  |
| 2-Hydroxydocosansäure (C22)                             | 0,0422  | 0,0051        | 0,0513        | -  | 0,0779  | 0,0068        | 0,0996        | -  |
| 2-Hydroxytricosansäure (C23)                            | 0,0068  | 0,0007        | 0,0096        | -  | 0,0125  | 0,0011        | 0,0187        | -  |
| 2-Hydroxytricosensäure (C23 (1))                        | 0,0054  | 0,0016        | 0,0079        | -  | 0,0100  | 0,0027        | 0,0154        | -  |
| 2-Hydroxytetracosansäure (C24)                          | 0,1945  | 0,0205        | 0,2557        | -  | 0,3589  | 0,0285        | 0,4959        | -  |
| 2-Hydroxytetracosensäure (C24 (1))                      | 0,1233  | 0,0148        | 0,1336        | -  | 0,2273  | 0,0194        | 0,2591        | -  |
| 2-Hydroxypentacosansäure (C25)                          | 0,0099  | 0,0012        | 0,0163        | -  | 0,0183  | 0,0025        | 0,0315        | -  |
| 2-Hydroxypentacosensäure (C25 (1))                      | 0,0068  | 0,0009        | 0,0110        | -  | 0,0126  | 0,0016        | 0,0214        | -  |
| 2-Hydroxyhexacosansäure (C26)                           | 0,0509  | 0,0047        | 0,0677        | -  | 0,0939  | 0,0063        | 0,1312        | -  |
| 2-Hydroxyhexacosensäure (C26 (1))                       | 0,0150  | 0,0013        | 0,0173        | -  | 0,0277  | 0,0015        | 0,0335        | -  |
| 2-Hydroxyheptacosansäure (C27)                          | 0,0040  | 0,0008        | 0,0056        | -  | 0,0073  | 0,0013        | 0,0108        | -  |
| <b>"midchain" oxygenierte Hydroxysäure</b>              | <b>0,0103</b>   | <b>0,0011</b> | <b>0,0041</b> | -  | <b>0,0191</b>   | <b>0,0015</b> | <b>0,0079</b> | -  |
| 9 (10),16-Dihydroxyhexadecansäure (C16)                 | 0,0103  | 0,0011        | 0,0041        | -  | 0,0191  | 0,0015        | 0,0079        | -  |
| <b>Total</b>  | <b>1,5574</b>   | <b>0,2259</b> | <b>1,1096</b> | -  | <b>2,8728</b>   | <b>0,3480</b> | <b>2,1515</b> | -  |

### 8.3. Die Klonierung des Gens *CYP703A2*

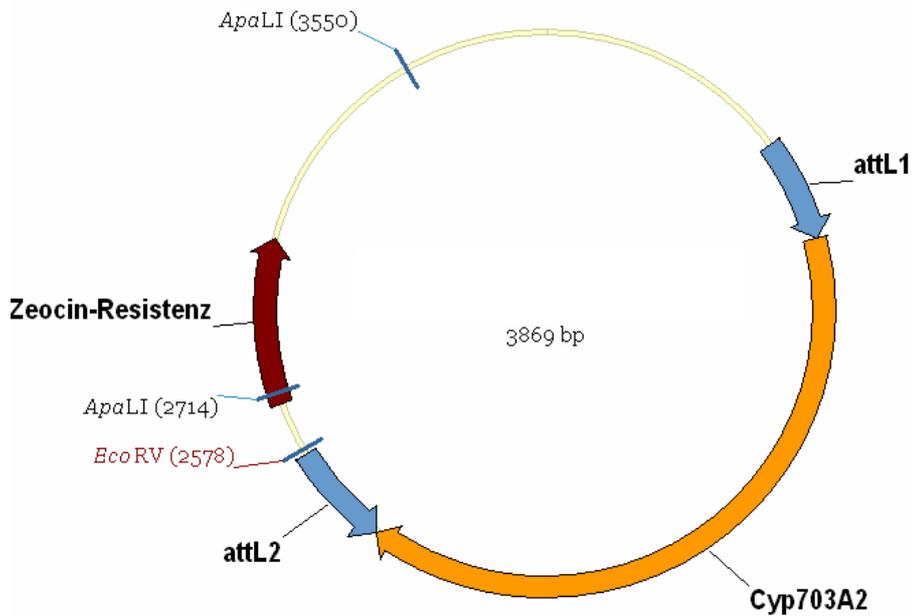
#### 8.3.1. Vektorkarten



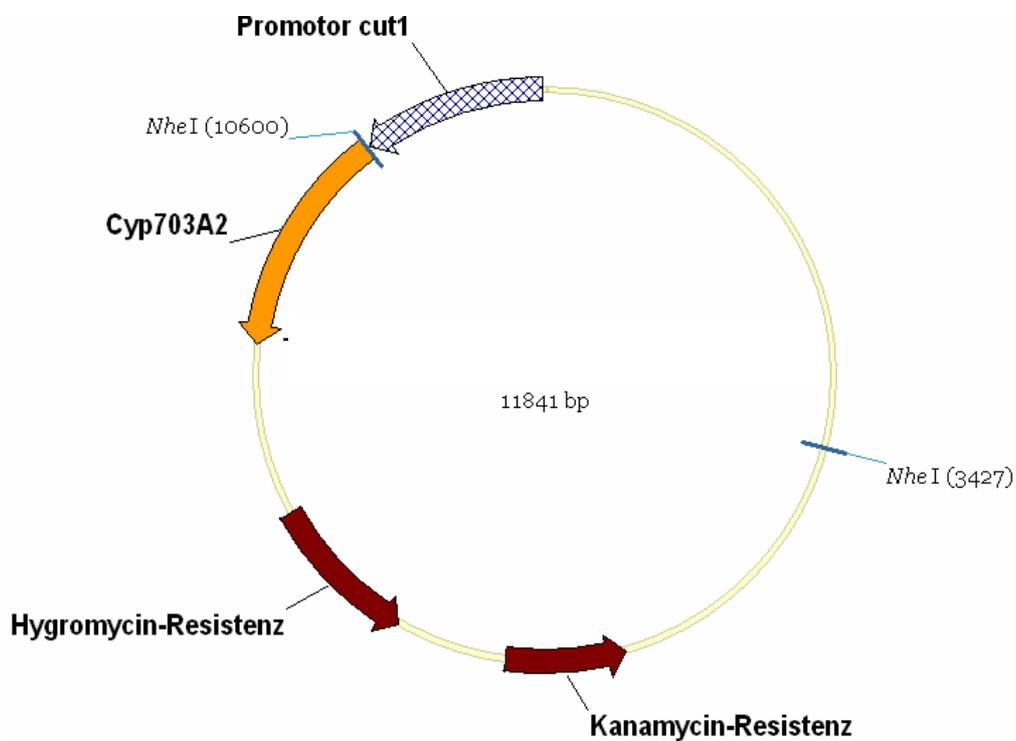
**Abb. 8.1. Vektorkarte des Konstruktes Promotor<sub>CUT1</sub>-pDONRzeo.** Der per PCR amplifizierte Promotor<sub>CUT1</sub> wurde mittels Gateway<sup>®</sup>-System in den Vektor pDONRzeo eingebracht.



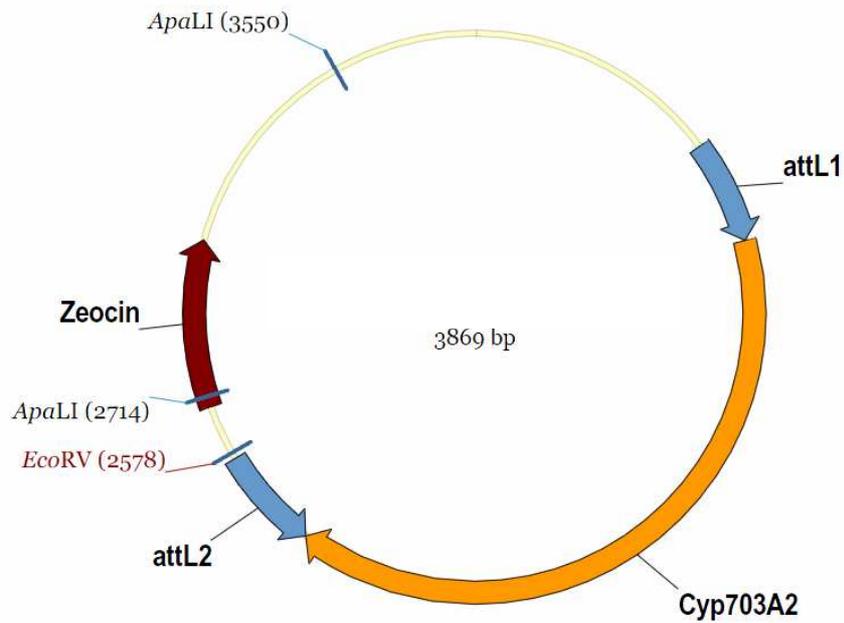
**Abb. 8.2. Vektorkarte des Konstruktes *CYP703A2*-pGEM<sup>®</sup>-T Easy.** Das per PCR amplifizierte Gen *CYP703A2* wurde mittels TA-Klonierung in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy eingebracht.



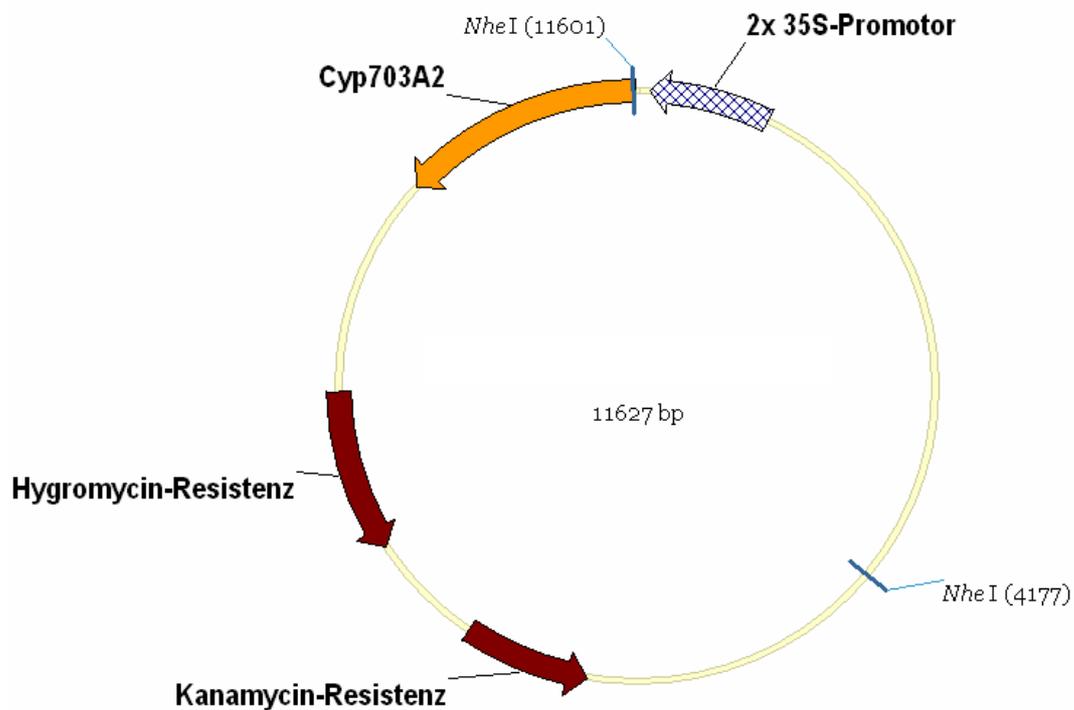
**Abb. 8.3. Vektorkarte des Konstruktes Promotor<sub>CUT1</sub>-CYP703A2-pDONRzeo.** Das Gen CYP703A2 wurde per Ligation in den Vektor Promotor<sub>CUT1</sub>-pDONRzeo eingebracht.



**Abb. 8.4. Vektorkarte des Konstruktes Promotor<sub>CUT1</sub>-CYP703A2-pDMDC99.** Das Konstrukt Promotor<sub>CUT1</sub>-CYP703A2-pDONRzeo wurde mittels Gateway<sup>®</sup>-System mit dem Vektor pDMDC99 rekombiniert.



**Abb. 8.5. Vektorkarte des Konstruktes CYP703A2-pDONRzeo.** Das Gen CYP703A2 wurde mittels Gateway<sup>®</sup>-System in den Vektor pMDC32 kloniert.



**Abb. 8.6. Vektorkarte des Konstruktes Promotor<sub>35S</sub>-CYP703A2-pMDC32.** Das Gen CYP703A2 wurde mittels Gateway<sup>®</sup>-System in den Vektor pMDC32 kloniert.

### 8.3.2. Wachs- und Kutinanalysen der transgenen Linien

Tab. 8.3.2.1. **Wachsanalyse der transgenen Linien mit dem Konstrukt Prom<sub>CUT1</sub>-CYP703A2.** Dargestellt sind die absoluten ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) Werte in Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung für den Wildtyp und als Einzelwert für die transgenen Linien.

| Wachsmonomer (Kettenlänge)             | Absolute Menge Wachs ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) |               |                                |               |               |               |               |               |               |               |
|--|---|---------------|--------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|  | Col-8   |               | Prom <sub>CUT1</sub> -CYP703A2 |               |               |               |               |               |               |               |
|  | Mw  | Sa            | Linie 01                       | Linie 07      | Linie 08      | Linie 09      | Linie 11      | Linie 13      | Linie 15      | Linie 16      |
| <b>Säuren</b>                          | <b>0,0703</b>   | <b>0,0175</b> | <b>0,0791</b>                  | <b>0,0761</b> | <b>0,1146</b> | <b>0,0493</b> | <b>0,0711</b> | <b>0,0609</b> | <b>0,0427</b> | <b>0,0519</b> |
| Tetracosansäure (C <sub>24</sub> )     | 0,0052  | 0,0021        | 0,0041                         | 0,0028        | 0,0045        | 0,0037        | 0,0076        | 0,0060        | 0,0047        | 0,0045        |
| Hexacosansäure (C <sub>26</sub> )      | 0,0229  | 0,0073        | 0,0191                         | 0,0151        | 0,0234        | 0,0149        | 0,0332        | 0,0265        | 0,0207        | 0,0214        |
| Octacosansäure (C <sub>28</sub> )      | 0,0088  | 0,0035        | 0,0073                         | 0,0084        | 0,0113        | 0,0076        | 0,0084        | 0,0061        | 0,0059        | 0,0071        |
| Triacosansäure (C <sub>30</sub> )      | 0,0061  | 0,0035        | 0,0061                         | 0,0073        | 0,0088        | 0,0044        | 0,0045        | 0,0038        | 0,0029        | 0,0040        |
| Dotriacosansäure (C <sub>32</sub> )    | 0,0127  | 0,0064        | 0,0160                         | 0,0197        | 0,0270        | 0,0105        | 0,0093        | 0,0103        | 0,0047        | 0,0088        |
| Tetratriacosansäure (C <sub>34</sub> ) | 0,0144  | 0,0107        | 0,0265                         | 0,0228        | 0,0396        | 0,0081        | 0,0080        | 0,0083        | 0,0038        | 0,0061        |
| <b>Aldehyde</b>                        | <b>0,0510</b>   | <b>0,0161</b> | <b>0,0590</b>                  | <b>0,0546</b> | <b>0,0534</b> | <b>0,0640</b> | <b>0,0736</b> | <b>0,0503</b> | <b>0,0504</b> | <b>0,0539</b> |
| Octacosanal (C <sub>28</sub> )         | 0,0056  | 0,0013        | 0,0060                         | 0,0056        | 0,0073        | 0,0051        | 0,0068        | 0,0046        | 0,0040        | 0,0059        |
| Triacosanal (C <sub>30</sub> )         | 0,0103  | 0,0048        | 0,0119                         | 0,0101        | 0,0104        | 0,0109        | 0,0114        | 0,0091        | 0,0100        | 0,0092        |
| Dotriacosanal (C <sub>32</sub> )       | 0,0193  | 0,0062        | 0,0214                         | 0,0214        | 0,0201        | 0,0257        | 0,0244        | 0,0200        | 0,0193        | 0,0195        |
| Tetratriacosanal (C <sub>34</sub> )    | 0,0159  | 0,0062        | 0,0198                         | 0,0173        | 0,0156        | 0,0224        | 0,0310        | 0,0166        | 0,0170        | 0,0192        |
| <b>Alkohole</b>                        | <b>0,1800</b>   | <b>0,0174</b> | <b>0,1999</b>                  | <b>0,1547</b> | <b>0,1878</b> | <b>0,1476</b> | <b>0,2070</b> | <b>0,1838</b> | <b>0,1728</b> | <b>0,2346</b> |
| Hexacosanol (C <sub>26</sub> )         | 0,0119  | 0,0023        | 0,0112                         | 0,0136        | 0,0210        | 0,0067        | 0,0115        | 0,0077        | 0,0025        | 0,0223        |
| Octacosanol (C <sub>28</sub> )         | 0,0293  | 0,0032        | 0,0315                         | 0,0340        | 0,0472        | 0,0164        | 0,0289        | 0,0217        | 0,0125        | 0,0497        |
| Nonacosanol (C <sub>29</sub> )         | 0,0014  | 0,0003        | 0,0014                         | 0,0012        | 0,0011        | 0,0006        | 0,0018        | 0,0009        | 0,0006        | 0,0015        |
| Triacosanol (C <sub>30</sub> )         | 0,0549  | 0,0120        | 0,0621                         | 0,0399        | 0,0479        | 0,0504        | 0,0680        | 0,0555        | 0,0527        | 0,0601        |
| Hentriacosanol (C <sub>31</sub> )      | 0,0049  | 0,0014        | 0,0069                         | 0,0038        | 0,0043        | 0,0050        | 0,0061        | 0,0057        | 0,0063        | 0,0065        |
| Dotriacosanol (C <sub>32</sub> )       | 0,0691  | 0,0067        | 0,0760                         | 0,0538        | 0,0580        | 0,0616        | 0,0816        | 0,0853        | 0,0902        | 0,0856        |
| Tetratriacosanol (C <sub>34</sub> )    | 0,0084  | 0,0017        | 0,0108                         | 0,0083        | 0,0083        | 0,0069        | 0,0091        | 0,0069        | 0,0081        | 0,0089        |
| <b>Alkane</b>                          | <b>0,1892</b>   | <b>0,0356</b> | <b>0,1653</b>                  | <b>0,1214</b> | <b>0,1825</b> | <b>0,1968</b> | <b>0,2354</b> | <b>0,1434</b> | <b>0,1166</b> | <b>0,2592</b> |
| Nonacosan (C <sub>29</sub> )           | 0,0536  | 0,0093        | 0,0547                         | 0,0373        | 0,0553        | 0,0482        | 0,0631        | 0,0386        | 0,0350        | 0,0649        |
| Hentriacosan (C <sub>31</sub> )        | 0,1010  | 0,0187        | 0,0790                         | 0,0633        | 0,0963        | 0,1065        | 0,1270        | 0,0787        | 0,0596        | 0,1435        |
| Tritriacosan (C <sub>33</sub> )        | 0,0347  | 0,0085        | 0,0316                         | 0,0208        | 0,0309        | 0,0420        | 0,0453        | 0,0261        | 0,0220        | 0,0508        |
| <b>Total</b>                           | <b>0,4905</b>   | <b>0,0464</b> | <b>0,5034</b>                  | <b>0,4068</b> | <b>0,5383</b> | <b>0,4576</b> | <b>0,5871</b> | <b>0,4385</b> | <b>0,3825</b> | <b>0,5995</b> |

Tab. 8.3.2.2. **Kutinanalyse der transgenen Linien mit dem Konstrukt Prom<sub>CUT1</sub>-CYP703A2.** Dargestellt sind die absoluten ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) Werte in Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung für den Wildtyp und als Einzelwert für die transgenen Linien.

| Kutinmonomer (Kettenlänge)                              | Absolute Menge Kutin ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) |              |                                |              |              |              |              |              |              |              |
|---|---|--------------|--------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|   | Col-8   |              | Prom <sub>CUT1</sub> -CYP703A2 |              |              |              |              |              |              |              |
|   | Mw  | Sa           | Linie 01                       | Linie 07     | Linie 08     | Linie 09     | Linie 11     | Linie 13     | Linie 15     | Linie 16     |
| <b>Säuren</b>   | <b>1,647</b>  | <b>0,546</b> | <b>1,612</b>                   | <b>1,452</b> | <b>0,969</b> | <b>1,531</b> | <b>1,508</b> | <b>0,741</b> | <b>1,616</b> | <b>1,720</b> |
| Hexadecansäure (C <sub>16</sub> )                       | 0,926   | 0,336        | 0,844                          | 0,676        | 0,438        | 0,911        | 0,862        | 0,368        | 0,884        | 1,009        |
| Octadecansäure (C <sub>18</sub> )                       | 0,065   | 0,030        | 0,073                          | 0,042        | 0,029        | 0,054        | 0,050        | 0,074        | 0,055        | 0,055        |
| Octadecensäure (C <sub>18 (1)</sub> )                   | 0,097   | 0,035        | 0,075                          | 0,077        | 0,046        | 0,068        | 0,068        | 0,035        | 0,083        | 0,076        |
| Octadecadiensäure (C <sub>18 (2)</sub> )                | 0,227   | 0,110        | 0,291                          | 0,272        | 0,193        | 0,150        | 0,187        | 0,097        | 0,263        | 0,213        |
| Octadecatriensäure (C <sub>18 (3)</sub> )               | 0,123   | 0,057        | 0,177                          | 0,214        | 0,137        | 0,147        | 0,141        | 0,075        | 0,170        | 0,191        |
| Eicosansäure (C <sub>20</sub> )                         | 0,029   | 0,010        | 0,026                          | 0,023        | 0,012        | 0,029        | 0,028        | 0,013        | 0,041        | 0,024        |
| Docosansäure (C <sub>22</sub> )                         | 0,056   | 0,017        | 0,029                          | 0,029        | 0,029        | 0,048        | 0,052        | 0,039        | 0,033        | 0,042        |
| Tricosansäure (C <sub>23</sub> )                        | 0,024   | 0,021        | 0,008                          | 0,015        | 0,007        | 0,015        | 0,017        | 0,005        | 0,012        | 0,010        |
| Tetracosansäure (C <sub>24</sub> )                      | 0,064   | 0,011        | 0,053                          | 0,068        | 0,046        | 0,055        | 0,053        | 0,023        | 0,046        | 0,065        |
| Pentacosansäure (C <sub>25</sub> )                      | 0,011   | 0,003        | 0,006                          | 0,006        | 0,008        | 0,012        | 0,020        | 0,004        | 0,004        | 0,011        |
| Triacotansäure (C <sub>30</sub> )                       | 0,008   | 0,002        | 0,011                          | 0,006        | 0,005        | 0,008        | 0,009        | 0,004        | 0,006        | 0,008        |
| Ditriacotansäure (C <sub>32</sub> )                     | 0,012   | 0,003        | 0,015                          | 0,014        | 0,013        | 0,024        | 0,019        | 0,005        | 0,018        | 0,014        |
| Tetracontansäure (C <sub>34</sub> )                     | 0,006   | 0,004        | 0,004                          | 0,009        | 0,006        | 0,009        | 0,003        | 0,000        | 0,000        | 0,002        |
| <b>Alkohole</b>   | <b>0,084</b>  | <b>0,021</b> | <b>0,074</b>                   | <b>0,066</b> | <b>0,044</b> | <b>0,085</b> | <b>0,090</b> | <b>0,043</b> | <b>0,085</b> | <b>0,091</b> |
| Hexadecanol (C <sub>16</sub> )                          | 0,033   | 0,011        | 0,030                          | 0,022        | 0,014        | 0,026        | 0,037        | 0,015        | 0,036        | 0,040        |
| Octadecanol (C <sub>18</sub> )                          | 0,043   | 0,006        | 0,038                          | 0,036        | 0,024        | 0,045        | 0,045        | 0,024        | 0,046        | 0,042        |
| Hexacosanol (C <sub>26</sub> )                          | 0,003   | 0,002        | 0,001                          | 0,002        | 0,002        | 0,004        | 0,002        | 0,001        | 0,001        | 0,003        |
| Octacosanal (C <sub>28</sub> )                          | 0,005   | 0,002        | 0,004                          | 0,006        | 0,004        | 0,009        | 0,005        | 0,003        | 0,002        | 0,006        |
| <b><math>\omega</math>-Hydroxysäuren</b>                | <b>0,039</b>  | <b>0,019</b> | <b>0,031</b>                   | <b>0,027</b> | <b>0,017</b> | <b>0,031</b> | <b>0,033</b> | <b>0,020</b> | <b>0,036</b> | <b>0,031</b> |
| Hydroxyhexadecansäure (C <sub>16</sub> )                | 0,039   | 0,019        | 0,031                          | 0,027        | 0,017        | 0,031        | 0,033        | 0,020        | 0,036        | 0,031        |
| <b><math>\alpha</math>-<math>\omega</math>-Disäuren</b> | <b>0,577</b>  | <b>0,135</b> | <b>0,619</b>                   | <b>0,434</b> | <b>0,474</b> | <b>0,513</b> | <b>0,620</b> | <b>0,311</b> | <b>0,630</b> | <b>0,680</b> |
| Hexadecan-1,16-disäure (C <sub>16</sub> )               | 0,067   | 0,022        | 0,067                          | 0,045        | 0,048        | 0,063        | 0,076        | 0,036        | 0,074        | 0,075        |
| Octadecan-1,18-disäure (C <sub>18</sub> )               | 0,044   | 0,018        | 0,042                          | 0,044        | 0,028        | 0,050        | 0,048        | 0,023        | 0,032        | 0,026        |
| Octadecen-1,18-disäure (C <sub>18 (1)</sub> )           | 0,069   | 0,017        | 0,077                          | 0,052        | 0,049        | 0,065        | 0,079        | 0,037        | 0,092        | 0,084        |
| Octadecadien-1,18-disäure (C <sub>18 (2)</sub> )        | 0,398   | 0,093        | 0,434                          | 0,293        | 0,349        | 0,335        | 0,418        | 0,215        | 0,433        | 0,495        |
| <b>2-Hydroxysäuren</b>                                  | <b>0,401</b>  | <b>0,060</b> | <b>0,384</b>                   | <b>0,332</b> | <b>0,348</b> | <b>0,329</b> | <b>0,379</b> | <b>0,203</b> | <b>0,358</b> | <b>0,431</b> |
| 2-Hydroxyhexadecansäure (C <sub>16</sub> )              | 0,038   | 0,023        | 0,027                          | 0,022        | 0,023        | 0,026        | 0,028        | 0,013        | 0,024        | 0,031        |
| 2-Hydroxydocosansäure (C <sub>22</sub> )                | 0,035   | 0,007        | 0,036                          | 0,034        | 0,031        | 0,028        | 0,036        | 0,019        | 0,032        | 0,037        |
| 2-Hydroxytricosansäure (C <sub>23</sub> )               | 0,015   | 0,003        | 0,007                          | 0,006        | 0,011        | 0,017        | 0,018        | 0,005        | 0,005        | 0,016        |
| 2-Hydroxytetracosansäure (C <sub>24</sub> )             | 0,083   | 0,012        | 0,163                          | 0,140        | 0,149        | 0,136        | 0,161        | 0,085        | 0,153        | 0,175        |
| 2-Hydroxytetracosensäure (C <sub>24 (1)</sub> )         | 0,006   | 0,002        | 0,079                          | 0,070        | 0,075        | 0,061        | 0,070        | 0,048        | 0,084        | 0,095        |
| 2-Hydroxypentacosansäure (C <sub>25</sub> )             | 0,162   | 0,026        | 0,006                          | 0,005        | 0,005        | 0,005        | 0,005        | 0,003        | 0,005        | 0,008        |
| 2-Hydroxypentacosensäure (C <sub>25</sub> )             | 0,011   | 0,003        | 0,017                          | 0,012        | 0,009        | 0,012        | 0,010        | 0,006        | 0,008        | 0,013        |
| 2-Hydroxyhexacosansäure (C <sub>26</sub> )              | 0,046   | 0,007        | 0,049                          | 0,039        | 0,042        | 0,040        | 0,045        | 0,024        | 0,042        | 0,050        |
| 2-Hydroxyheptacosansäure (C <sub>27</sub> )             | 0,005   | 0,001        | 0,000                          | 0,004        | 0,004        | 0,004        | 0,008        | 0,002        | 0,004        | 0,005        |
| <b>"midchain" oxygenierte Hydroxysäure</b>              | <b>0,039</b>  | <b>0,013</b> | <b>0,055</b>                   | <b>0,022</b> | <b>0,021</b> | <b>0,031</b> | <b>0,031</b> | <b>0,014</b> | <b>0,032</b> | <b>0,030</b> |
| 9 (10),16-Dihydroxyhexadecansäure (C <sub>16</sub> )    | 0,039   | 0,013        | 0,055                          | 0,022        | 0,021        | 0,031        | 0,031        | 0,014        | 0,032        | 0,030        |
| <b>Total</b>  | <b>2,788</b>  | <b>0,642</b> | <b>2,776</b>                   | <b>2,333</b> | <b>1,872</b> | <b>2,519</b> | <b>2,661</b> | <b>1,332</b> | <b>2,757</b> | <b>2,984</b> |

Tab. 8.3.2.3. **Wachsanalyse der transgenen Linien mit dem Konstrukt Prom<sub>35S</sub>-CYP703A2 (I).** Dargestellt sind die absoluten ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) Werte in Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung für den Wildtyp und als Einzelwert für die transgenen Linien 1 - 5.

| Wachsmonomer (Kettenlänge)             | Absolute Menge Wachs ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) |               |                               |               |               |               |               |
|--|---|---------------|-------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|  | Col-8   |               | Prom <sub>35S</sub> -CYP703A2 |               |               |               |               |
|  | Mw  | Sa            | Linie 01                      | Linie 02      | Linie 03      | Linie 04      | Linie 05      |
| <b>Säuren</b>                          | <b>0,0703</b>   | <b>0,0175</b> | <b>0,0405</b>                 | <b>0,0297</b> | <b>0,0612</b> | <b>0,0480</b> | <b>0,0162</b> |
| Tetracosansäure (C <sub>24</sub> )     | 0,0052  | 0,0021        | 0,0040                        | 0,0027        | 0,0049        | 0,0042        | 0,0019        |
| Hexacosansäure (C <sub>26</sub> )      | 0,0229  | 0,0073        | 0,0163                        | 0,0130        | 0,0246        | 0,0186        | 0,0079        |
| Octacosansäure (C <sub>28</sub> )      | 0,0088  | 0,0035        | 0,0045                        | 0,0041        | 0,0076        | 0,0050        | 0,0031        |
| Triacotansäure (C <sub>30</sub> )      | 0,0061  | 0,0035        | 0,0026                        | 0,0017        | 0,0061        | 0,0041        | 0,0013        |
| Dotriacontansäure (C <sub>32</sub> )   | 0,0127  | 0,0064        | 0,0064                        | 0,0042        | 0,0096        | 0,0079        | 0,0011        |
| Tetatriacontansäure (C <sub>34</sub> ) | 0,0144  | 0,0107        | 0,0066                        | 0,0040        | 0,0084        | 0,0082        | 0,0009        |
| <b>Aldehyde</b>                        | <b>0,0510</b>   | <b>0,0161</b> | <b>0,0497</b>                 | <b>0,0359</b> | <b>0,0524</b> | <b>0,0621</b> | <b>0,0519</b> |
| Octacosanal (C <sub>28</sub> )         | 0,0056  | 0,0013        | 0,0041                        | 0,0045        | 0,0064        | 0,0052        | 0,0067        |
| Triacotanal (C <sub>30</sub> )         | 0,0103  | 0,0048        | 0,0086                        | 0,0060        | 0,0119        | 0,0108        | 0,0082        |
| Dotriacontanal (C <sub>32</sub> )      | 0,0193  | 0,0062        | 0,0209                        | 0,0143        | 0,0213        | 0,0274        | 0,0195        |
| Tetatriacontanal (C <sub>34</sub> )    | 0,0159  | 0,0062        | 0,0161                        | 0,0112        | 0,0127        | 0,0188        | 0,0175        |
| <b>Alkohole</b>                        | <b>0,1800</b>   | <b>0,0174</b> | <b>0,1301</b>                 | <b>0,1669</b> | <b>0,1531</b> | <b>0,1629</b> | <b>0,1688</b> |
| Hexacosanol (C <sub>26</sub> )         | 0,0119  | 0,0023        | 0,0062                        | 0,0208        | 0,0058        | 0,0106        | 0,0130        |
| Octacosanol (C <sub>28</sub> )         | 0,0293  | 0,0032        | 0,0192                        | 0,0427        | 0,0202        | 0,0269        | 0,0311        |
| Nonacosanol (C <sub>29</sub> )         | 0,0014  | 0,0003        | 0,0006                        | 0,0010        | 0,0012        | 0,0010        | 0,0015        |
| Triacotanol (C <sub>30</sub> )         | 0,0549  | 0,0120        | 0,0389                        | 0,0419        | 0,0473        | 0,0455        | 0,0507        |
| Hentriacontanol (C <sub>31</sub> )     | 0,0049  | 0,0014        | 0,0034                        | 0,0035        | 0,0029        | 0,0030        | 0,0060        |
| Dotriacontanol (C <sub>32</sub> )      | 0,0691  | 0,0067        | 0,0555                        | 0,0511        | 0,0700        | 0,0682        | 0,0587        |
| Tetatriacontanol (C <sub>34</sub> )    | 0,0084  | 0,0017        | 0,0063                        | 0,0059        | 0,0055        | 0,0076        | 0,0078        |
| <b>Alkane</b>                          | <b>0,1892</b>   | <b>0,0356</b> | <b>0,1144</b>                 | <b>0,1664</b> | <b>0,1954</b> | <b>0,1281</b> | <b>0,3074</b> |
| Nonacosan (C <sub>29</sub> )           | 0,0536  | 0,0093        | 0,0367                        | 0,0499        | 0,0714        | 0,0370        | 0,0684        |
| Hentriacontan (C <sub>31</sub> )       | 0,1010  | 0,0187        | 0,0590                        | 0,0889        | 0,0951        | 0,0674        | 0,1730        |
| Tritriacontan (C <sub>33</sub> )       | 0,0347  | 0,0085        | 0,0187                        | 0,0277        | 0,0290        | 0,0236        | 0,0661        |
| <b>Total</b>                           | <b>0,4905</b>   | <b>0,0464</b> | <b>0,3347</b>                 | <b>0,3990</b> | <b>0,4621</b> | <b>0,4011</b> | <b>0,5443</b> |

Tab. 8.3.2.4. **Wachsanalyse der transgenen Linien mit dem Konstrukt Prom<sub>35S</sub>-CYP703A2 (II).** Dargestellt sind die absoluten ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) Werte in Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung für den Wildtyp und als Einzelwert für die transgenen Linien 1 - 3.

| Wachsmonomer (Kettenlänge)              | Absolute Menge Wachs ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) |               |                               |               |               |
|---|---|---------------|-------------------------------|---------------|---------------|
|   | Col-8   |               | Prom <sub>35S</sub> -CYP703A2 |               |               |
|   | Mw  | Sa            | Linie 01                      | Linie 02      | Linie 03      |
| <b>Säuren</b>                           | <b>0,2988</b>   | <b>0,0804</b> | <b>0,3145</b>                 | <b>0,1670</b> | <b>0,1092</b> |
| Tetracosansäure (C <sub>24</sub> )      | 0,0104  | 0,0023        | 0,0162                        | 0,0126        | 0,0111        |
| Hexacosansäure (C <sub>26</sub> )       | 0,0619  | 0,0154        | 0,0719                        | 0,0496        | 0,0470        |
| Octacosansäure (C <sub>28</sub> )       | 0,0289  | 0,0027        | 0,0294                        | 0,0151        | 0,0132        |
| Triacotansäure (C <sub>30</sub> )       | 0,0243  | 0,0017        | 0,0220                        | 0,0133        | 0,0074        |
| Dotriacontansäure (C <sub>32</sub> )    | 0,0760  | 0,0336        | 0,0733                        | 0,0339        | 0,0166        |
| Tetratriacontansäure (C <sub>34</sub> ) | 0,0973  | 0,0602        | 0,1018                        | 0,0425        | 0,0140        |
| <b>Aldehyde</b>                         | <b>0,1361</b>   | <b>0,0119</b> | <b>0,2225</b>                 | <b>0,1605</b> | <b>0,1159</b> |
| Octacosanal (C <sub>28</sub> )          | 0,0151  | 0,0046        | 0,0207                        | 0,0181        | 0,0151        |
| Triacotanal (C <sub>30</sub> )          | 0,0259  | 0,0003        | 0,0392                        | 0,0266        | 0,0234        |
| Dotriacontanal (C <sub>32</sub> )       | 0,0530  | 0,0084        | 0,0883                        | 0,0650        | 0,0451        |
| Tetratriacontanal (C <sub>34</sub> )    | 0,0422  | 0,0084        | 0,0742                        | 0,0508        | 0,0324        |
| <b>Alkohole</b>                         | <b>0,4053</b>   | <b>0,0722</b> | <b>0,2840</b>                 | <b>0,3905</b> | <b>0,3641</b> |
| Hexacosanol (C <sub>26</sub> )          | 0,0340  | 0,0260        | 0,0465                        | 0,0303        | 0,0339        |
| Octacosanol (C <sub>28</sub> )          | 0,0895  | 0,0491        | 0,0927                        | 0,0700        | 0,0863        |
| Nonacosanol (C <sub>29</sub> )          | 0,0034  | 0,0010        | 0,0023                        | 0,0009        | 0,0022        |
| Triacotanol (C <sub>30</sub> )          | 0,1019  | 0,0031        | 0,0732                        | 0,1094        | 0,0943        |
| Hentriacontanol (C <sub>31</sub> )      | 0,0107  | 0,0016        | 0,0153                        | 0,0084        | 0,0064        |
| Dotriacontanol (C <sub>32</sub> )       | 0,1483  | 0,0069        | 0,0335                        | 0,1504        | 0,1273        |
| Tetratriacontanol (C <sub>34</sub> )    | 0,0175  | 0,0018        | 0,0205                        | 0,0212        | 0,0137        |
| <b>Alkane</b>                           | <b>0,5020</b>   | <b>0,0843</b> | <b>0,6806</b>                 | <b>0,3630</b> | <b>0,3771</b> |
| Nonacosan (C <sub>29</sub> )            | 0,1569  | 0,0426        | 0,1880                        | 0,1034        | 0,1245        |
| Hentriacontan (C <sub>31</sub> )        | 0,2628  | 0,0355        | 0,3722                        | 0,1716        | 0,1962        |
| Tritriacontan (C <sub>33</sub> )        | 0,0822  | 0,0062        | 0,1204                        | 0,0880        | 0,0564        |
| <b>Total</b>                            | <b>1,3422</b>   | <b>0,0642</b> | <b>1,5015</b>                 | <b>1,0810</b> | <b>0,9663</b> |

Tab. 8.3.2.5. **Kutinanalyse der transgenen Linien mit dem Konstrukt Prom<sub>35S</sub>-CYP703A2.** Dargestellt sind die absoluten ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) Werte in Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung für den Wildtyp und als Einzelwert für die transgenen Linien.

| Kutinmonomer (Kettenlänge)                              | Absolute Menge Kutin ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) |              |                               |              |              |              |              |              |              |              |
|---|---|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|   | Col-8   |              | Prom <sub>35S</sub> -CYP703A2 |              |              |              |              |              |              |              |
|   | Mw  | Sa           | Linie 01                      | Linie 02     | Linie 03     | Linie 04     | Linie 05     | Linie 09     | Linie 10     | Linie 11     |
| <b>Säuren</b>   | <b>1,647</b>  | <b>0,546</b> | <b>0,794</b>                  | <b>1,218</b> | <b>0,587</b> | <b>1,145</b> | <b>1,172</b> | <b>1,850</b> | <b>1,485</b> | <b>0,879</b> |
| Hexadecansäure (C <sub>16</sub> )                       | 0,926   | 0,336        | 0,401                         | 0,629        | 0,228        | 0,595        | 0,629        | 1,057        | 0,788        | 0,430        |
| Octadecansäure (C <sub>18</sub> )                       | 0,065   | 0,030        | 0,027                         | 0,043        | 0,095        | 0,034        | 0,033        | 0,041        | 0,063        | 0,037        |
| Octadecensäure (C <sub>18(1)</sub> )                    | 0,097   | 0,035        | 0,049                         | 0,079        | 0,029        | 0,052        | 0,056        | 0,059        | 0,096        | 0,061        |
| Octadecadiensäure (C <sub>18(2)</sub> )                 | 0,227   | 0,110        | 0,110                         | 0,184        | 0,075        | 0,152        | 0,138        | 0,242        | 0,220        | 0,142        |
| Octadecatriensäure (C <sub>18(3)</sub> )                | 0,123   | 0,057        | 0,108                         | 0,134        | 0,095        | 0,169        | 0,161        | 0,281        | 0,143        | 0,106        |
| Eicosansäure (C <sub>20</sub> )                         | 0,029   | 0,010        | 0,014                         | 0,027        | 0,005        | 0,017        | 0,018        | 0,024        | 0,025        | 0,012        |
| Docosansäure (C <sub>22</sub> )                         | 0,056   | 0,017        | 0,023                         | 0,027        | 0,009        | 0,037        | 0,036        | 0,034        | 0,046        | 0,023        |
| Tricosansäure (C <sub>23</sub> )                        | 0,024   | 0,021        | 0,002                         | 0,015        | 0,002        | 0,015        | 0,012        | 0,014        | 0,009        | 0,005        |
| Tetracosansäure (C <sub>24</sub> )                      | 0,064   | 0,011        | 0,034                         | 0,055        | 0,024        | 0,043        | 0,044        | 0,065        | 0,061        | 0,036        |
| Pentacosansäure (C <sub>25</sub> )                      | 0,011   | 0,003        | 0,006                         | 0,006        | 0,004        | 0,009        | 0,012        | 0,007        | 0,012        | 0,010        |
| Triacosansäure (C <sub>30</sub> )                       | 0,008   | 0,002        | 0,005                         | 0,006        | 0,010        | 0,006        | 0,012        | 0,009        | 0,006        | 0,005        |
| Ditriacosansäure (C <sub>32</sub> )                     | 0,012   | 0,003        | 0,014                         | 0,011        | 0,012        | 0,016        | 0,019        | 0,017        | 0,014        | 0,013        |
| Tetraacosansäure (C <sub>34</sub> )                     | 0,006   | 0,004        | 0,000                         | 0,001        | 0,000        | 0,000        | 0,000        | 0,002        | 0,001        | 0,000        |
| <b>Alkohole</b>   | <b>0,084</b>  | <b>0,021</b> | <b>0,050</b>                  | <b>0,074</b> | <b>0,053</b> | <b>0,067</b> | <b>0,064</b> | <b>0,062</b> | <b>0,057</b> | <b>0,061</b> |
| Hexadecanol (C <sub>16</sub> )                          | 0,033   | 0,011        | 0,015                         | 0,029        | 0,021        | 0,024        | 0,019        | 0,020        | 0,016        | 0,017        |
| Octadecanol (C <sub>18</sub> )                          | 0,043   | 0,006        | 0,029                         | 0,036        | 0,031        | 0,033        | 0,036        | 0,033        | 0,034        | 0,040        |
| Hexacosanol (C <sub>26</sub> )                          | 0,003   | 0,002        | 0,002                         | 0,002        | 0,000        | 0,003        | 0,003        | 0,004        | 0,003        | 0,002        |
| Octacosanol (C <sub>28</sub> )                          | 0,005   | 0,002        | 0,004                         | 0,006        | 0,001        | 0,007        | 0,006        | 0,006        | 0,006        | 0,001        |
| <b><math>\omega</math>-Hydroxysäuren</b>                | <b>0,039</b>  | <b>0,019</b> | <b>0,014</b>                  | <b>0,030</b> | <b>0,008</b> | <b>0,024</b> | <b>0,022</b> | <b>0,028</b> | <b>0,022</b> | <b>0,015</b> |
| Hydroxyhexadecansäure (C <sub>16</sub> )                | 0,039   | 0,019        | 0,014                         | 0,030        | 0,008        | 0,024        | 0,022        | 0,028        | 0,022        | 0,015        |
| <b><math>\alpha</math>-<math>\omega</math>-Disäuren</b> | <b>0,577</b>  | <b>0,135</b> | <b>0,468</b>                  | <b>0,569</b> | <b>0,435</b> | <b>0,511</b> | <b>0,605</b> | <b>0,515</b> | <b>0,478</b> | <b>0,432</b> |
| Hexadecan-1,16-disäure (C <sub>16</sub> )               | 0,067   | 0,022        | 0,051                         | 0,058        | 0,043        | 0,058        | 0,057        | 0,059        | 0,057        | 0,048        |
| Octadecan-1,18-disäure (C <sub>18</sub> )               | 0,044   | 0,018        | 0,028                         | 0,043        | 0,017        | 0,036        | 0,070        | 0,032        | 0,037        | 0,026        |
| Octadecen-1,18-disäure (C <sub>18(1)</sub> )            | 0,069   | 0,017        | 0,053                         | 0,061        | 0,051        | 0,058        | 0,058        | 0,071        | 0,062        | 0,046        |
| Octadecadien-1,18-disäure (C <sub>18(2)</sub> )         | 0,398   | 0,093        | 0,337                         | 0,407        | 0,325        | 0,360        | 0,420        | 0,353        | 0,323        | 0,313        |
| <b>2-Hydroxysäuren</b>                                  | <b>0,401</b>  | <b>0,060</b> | <b>0,278</b>                  | <b>0,318</b> | <b>0,281</b> | <b>0,340</b> | <b>0,377</b> | <b>0,369</b> | <b>0,264</b> | <b>0,305</b> |
| 2-Hydroxyhexadecansäure (C <sub>16</sub> )              | 0,038   | 0,023        | 0,018                         | 0,025        | 0,019        | 0,023        | 0,027        | 0,021        | 0,019        | 0,019        |
| 2-Hydroxydocosansäure (C <sub>22</sub> )                | 0,035   | 0,007        | 0,027                         | 0,032        | 0,025        | 0,029        | 0,031        | 0,026        | 0,022        | 0,028        |
| 2-Hydroxytricosansäure (C <sub>23</sub> )               | 0,015   | 0,003        | 0,005                         | 0,008        | 0,002        | 0,012        | 0,018        | 0,009        | 0,006        | 0,014        |
| 2-Hydroxytetracosansäure (C <sub>24</sub> )             | 0,083   | 0,012        | 0,125                         | 0,130        | 0,121        | 0,142        | 0,147        | 0,157        | 0,121        | 0,131        |
| 2-Hydroxytetracosensäure (C <sub>24(1)</sub> )          | 0,006   | 0,002        | 0,056                         | 0,070        | 0,062        | 0,080        | 0,089        | 0,083        | 0,045        | 0,060        |
| 2-Hydroxypentacosansäure (C <sub>25</sub> )             | 0,162   | 0,026        | 0,002                         | 0,005        | 0,008        | 0,002        | 0,002        | 0,009        | 0,004        | 0,003        |
| 2-Hydroxypentacosensäure (C <sub>25</sub> )             | 0,011   | 0,003        | 0,007                         | 0,008        | 0,006        | 0,008        | 0,016        | 0,016        | 0,009        | 0,007        |
| 2-Hydroxyhexacosansäure (C <sub>26</sub> )              | 0,046   | 0,007        | 0,034                         | 0,036        | 0,033        | 0,040        | 0,047        | 0,043        | 0,034        | 0,038        |
| 2-Hydroxyheptacosansäure (C <sub>27</sub> )             | 0,005   | 0,001        | 0,003                         | 0,003        | 0,004        | 0,004        | 0,000        | 0,004        | 0,004        | 0,004        |
| <b>"midchain" oxygenierte Hydroxysäure</b>              | <b>0,039</b>  | <b>0,013</b> | <b>0,015</b>                  | <b>0,024</b> | <b>0,007</b> | <b>0,023</b> | <b>0,032</b> | <b>0,033</b> | <b>0,022</b> | <b>0,017</b> |
| 9 (10),16-Dihydroxyhexadecansäure (C <sub>16</sub> )    | 0,039   | 0,013        | 0,015                         | 0,024        | 0,007        | 0,023        | 0,032        | 0,033        | 0,022        | 0,017        |
| <b>Total</b>  | <b>2,788</b>  | <b>0,642</b> | <b>1,620</b>                  | <b>2,233</b> | <b>1,371</b> | <b>2,111</b> | <b>2,272</b> | <b>2,858</b> | <b>2,328</b> | <b>1,709</b> |

## 8.4. Prozentuale Veränderungen der Wachs- und Kutinmenge

**Tab. 8.4. Prozentuale Veränderungen der Wachs- und Kutinmenge.** Die prozentualen Veränderungen der Wachs- bzw. Kutinmenge der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp werden vorzeichenfrei addiert.

| Mutante      | Veränderung       |                   |                                 |
|--------------|-------------------|-------------------|---------------------------------|
|              | Wachsmenge<br>(%) | Kutinmenge<br>(%) | Wachs- und<br>Kutinmenge<br>(%) |
| <i>wax2</i>  | 79                | 0                 | 79                              |
| <i>cer5</i>  | 46                | 0                 | 46                              |
| <i>cut1</i>  | 52                | 0                 | 52                              |
| <i>att1</i>  | 0                 | 29                | 29                              |
| <i>shn1</i>  | 166               | 204               | 370                             |
| <i>shn3</i>  | 26                | 0                 | 26                              |
| <i>cer10</i> | 26                | 0                 | 26                              |

## 8.5. Abbildungsverzeichnis

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Abb. 1.1. | Schematischer Aufbau der Kutikula  | 2  |
| Abb. 1.2. | Verlängerung zu sehr langen Fettsäuren   | 6  |
| Abb. 1.3. | Schematische Darstellung der Wachssynthese im Stängel von <i>A. thaliana</i>     | 8  |
| Abb. 2.1. | Schematische Darstellung von Epoxiconazol  | 17 |
| Abb. 2.2. | Aufbau des Metabolisierungsexperiments   | 20 |
| Abb. 2.3. | Schematische Darstellung der chemischen Struktur von Toluidin Blau               | 22 |
| Abb. 2.4. | Derivatisierungsreagenz BSTFA  | 24 |
| Abb. 2.5. | Darstellung der Derivatisierung  | 25 |
| Abb. 2.6. | Schema für Klonierung  | 40 |
| Abb. 2.7. | Schematische Darstellung des rekombinationsvermittelten Klonierens nach Gateway. | 42 |
| Abb. 3.1. | Permeationsassay für Blätter von <i>A. thaliana</i>                              | 48 |
| Abb. 3.2. | Desorption von <sup>14</sup> C-Epoxiconazol aus dem Blatt von <i>A. thaliana</i> | 49 |
| Abb. 3.3. | Blattabdrücke von <i>A. thaliana</i> und <i>H. helix</i> auf LB-Agar             | 52 |
| Abb. 3.4. | Permeation von <sup>14</sup> C-Epoxiconazol mit Silwet                           | 53 |
| Abb. 3.5. | Austrocknung von <i>A. thaliana</i> Blättern                                     | 54 |

|            |  |     |
|------------|--|-----|
| Abb. 3.6.  | Co-Permeation von $^3\text{H}_2\text{O}$ und $^{14}\text{C}$ -Epoconazol durch die <i>P. laurocerasus</i> Kutikula.                                    | 56  |
| Abb. 3.7.  | Co-Permeation von $^3\text{H}_2\text{O}$ und $^{14}\text{C}$ -Epoconazol durch die <i>C. aurantium</i> Kutikula.                                       | 58  |
| Abb. 3.8.  | Co-Permeation von $^3\text{H}_2\text{O}$ und $^{14}\text{C}$ -Epoconazol durch die <i>H. helix</i> Kutikula.   | 59  |
| Abb. 3.9.  | Co-Permeation von $^3\text{H}_2\text{O}$ und $^{14}\text{C}$ -Epoconazol durch die <i>C. annuum</i> Kutikula.  | 61  |
| Abb. 3.10. | Korrelation der Leitwerte der Kutikula von <i>P. laurocerasus</i> , <i>C. aurantium</i> und <i>H. helix</i> für Epoconazol und Wasser.                 | 62  |
| Abb. 3.11. | Aufnahme von $^{14}\text{C}$ -Epoconazol in das Blatt von <i>P. laurocerasus</i> .   | 63  |
| Abb. 3.12. | Permeation von $^{14}\text{C}$ -Epoconazol und Wachsbelegung für Wildtypen von <i>A. thaliana</i> .  | 65  |
| Abb. 3.13. | Permeation von $^{14}\text{C}$ -Epoconazol und Wachs- und Kutinzusammensetzung für <i>wax2</i> .   | 68  |
| Abb. 3.14. | Permeation von $^{14}\text{C}$ -Epoconazol und Wachsbelegung der Blätter von <i>cer3</i> und <i>yre</i> .  | 70  |
| Abb. 3.15. | RT-PCR <i>cer5</i>   | 72  |
| Abb. 3.16. | Permeation von $^{14}\text{C}$ -Epoconazol und Wachs- und Kutinzusammensetzung für <i>cer5</i> .   | 73  |
| Abb. 3.17. | RT-PCR <i>cut1</i>   | 75  |
| Abb. 3.18. | Permeation von $^{14}\text{C}$ -Epoconazol und Wachs- und Kutinzusammensetzung für <i>cut1</i> .   | 76  |
| Abb. 3.19. | Permeation von $^{14}\text{C}$ -Epoconazol und Wachs- und Kutinzusammensetzung für <i>cer10</i>  | 80  |
| Abb. 3.20. | Permeation von $^{14}\text{C}$ -Epoconazol und Wachs- und Kutinzusammensetzung für <i>shn1</i> .   | 82  |
| Abb. 3.21. | Permeation von $^{14}\text{C}$ -Epoconazol und Wachs- und Kutinzusammensetzung für <i>shn3</i> .   | 85  |
| Abb. 3.22. | Permeation von $^{14}\text{C}$ -Epoconazol und Wachsbelegung für <i>bdg</i> .  | 87  |
| Abb. 3.23. | Permeation von $^{14}\text{C}$ -Epoconazol und Wachs- und Kutinzusammensetzung für <i>att1</i> .   | 89  |
| Abb. 3.24. | <i>Chlorophyll Leaching</i> .  | 91  |
| Abb. 3.25. | Toluidin Blau Färbung von Columbia-8, <i>wax2</i> und <i>cer5</i> -Blättern.   | 92  |
| Abb. 3.26. | RT-PCR   | 93  |
| Abb. 3.27. | Wachs- und Kutinzusammensetzung der transgenen Pflanzen mit einem Promotor <sub>CUT1</sub> : <i>Cyp703A2</i> Konstrukt im Vergleich zum Wildtyp Col-8. | 94  |
| Abb. 3.28. | RT-PCR   | 95  |
| Abb. 3.29. | Wachs- und Kutinbelegung der transgenen Pflanzen mit einem Promotor <sub>35S</sub> : <i>Cyp703A2</i> Konstrukt im Vergleich zum Wildtyp Col-8.         | 96  |
| Abb. 4.1.  | Leitwerte der untersuchten Mutanten.   | 114 |
| Abb. 4.2.  | Wachsmenge (prozentual) der untersuchten Mutanten  | 129 |

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
| Abb. 8.1. | Vektorkarte des Konstruktes Promotor <sub>CUT1</sub> -pDONRzeo.          | 178 |
| Abb. 8.2. | Vektorkarte des Konstruktes CYP703A2-pGEM <sup>®</sup> -T Easy.          | 178 |
| Abb. 8.3. | Vektorkarte des Konstruktes Promotor <sub>CUT1</sub> -CYP703A2-pDONRzeo. | 179 |
| Abb. 8.4. | Vektorkarte des Konstruktes Promotor <sub>CUT1</sub> -CYP703A2-pDMDC99.  | 179 |
| Abb. 8.5. | Vektorkarte des Konstruktes CYP703A2-pDONRzeo.                           | 180 |
| Abb. 8.6. | Vektorkarte des Konstruktes Promotor <sub>35S</sub> -CYP703A2-pMDC32.    | 180 |

## 8.6. Tabellenverzeichnis

|             |  |     |
|-------------|--|-----|
| Tab. 2.1.   | Temperaturprogramme der gaschromatographischen Analysen  | 26  |
| Tab. 2.2.   | Primersequenzen  | 29  |
| Tab. 2.3.   | Antibiotikakonzentrationen   | 30  |
| Tab. 2.4.   | Zusammensetzung einer PCR-Reaktion mit der Tfi-Polymerase  | 33  |
| Tab. 2.5.   | Zusammensetzung einer PCR-Reaktion mit der iproof-Polymerase   | 33  |
| Tab. 2.6.   | Zusammensetzung einer RT-PCR-Reaktion  | 34  |
| Tab. 2.7.   | Restriktionsenzyme und verwendete Puffer   | 35  |
| Tab. 2.8.   | Zusammensetzung der BP-Reaktion  | 43  |
| Tab. 2.9.   | Zusammensetzung der LR-Reaktion  | 44  |
| Tab. 3.1.   | Kompartiment-Analyse der Desorptionskinetiken von <sup>14</sup> C-Epoxiconazol aus Blättern von <i>A. thaliana</i> .   | 50  |
| Tab. 3.2.   | Überprüfung des Metabolismus der Substanz <sup>14</sup> C-Epoxiconazol nach 24 h Inkubation.   | 51  |
| Tab. 3.3.   | Kettenlängenverteilung im Blattwachs der <i>cut1</i> -Mutante im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp Col-8.   | 78  |
| Tab. 4.1.   | Leitwerte, gewichtete mittlere Kettenlänge und der prozentuale Anteil der Substanzklassen an der Wachsbelegung der Mutanten mit ihren korrespondierenden Wildtypen/Ökotypen. | 130 |
| Tab. 4.2.   | Prozentuale Anteil der Substanzklassen an der Kutinzusammensetzung.  | 132 |
| Tab. 8.1.1. | Wachszusammensetzung von den Wildtypen Col-8, Col-0, Ler und Ws (absolut).   | 159 |
| Tab. 8.1.2. | Wachszusammensetzung von den Wildtypen Col-8, Col-0, Ler und Ws (prozentual).  | 160 |
| Tab. 8.2.1. | Wachszusammensetzung von <i>wax2</i> .   | 161 |
| Tab. 8.2.2. | Kutinzusammensetzung von <i>wax2</i>   | 162 |
| Tab. 8.2.3. | Wachszusammensetzung von <i>cer3</i> .   | 163 |
| Tab. 8.2.4. | Wachszusammensetzung von <i>yre</i> .  | 164 |
| Tab. 8.2.5. | Wachszusammensetzung von <i>cer5</i> .   | 165 |

|               |   |     |
|---------------|---|-----|
| Tab. 8.2.6.   | Kutinzusammensetzung von <i>cer5</i> .  | 166 |
| Tab. 8.2.7.   | Wachszusammensetzung von <i>cut1</i> .  | 167 |
| Tab. 8.2.8.   | Kutinmenge und -zusammensetzung von <i>cut1</i> .                                       | 168 |
| Tab. 8.2.9.   | Wachszusammensetzung von <i>cer10</i> .   | 169 |
| Tab. 8.2.10.  | Kutinzusammensetzung von <i>cer10</i> .   | 170 |
| Tab. 8.2.11.  | Wachszusammensetzung von <i>shn1</i> .  | 171 |
| Tab. 8.2.12.  | Kutinzusammensetzung von <i>shn1</i> .  | 172 |
| Tab. 8.2.13.  | Wachszusammensetzung von <i>shn3</i> .  | 173 |
| Tab. 8.2.14.  | Kutinzusammensetzung von <i>shn3</i> .  | 174 |
| Tab. 8.2.15.  | Wachszusammensetzung von <i>bdg</i> .   | 175 |
| Tab. 8.2.16.  | Wachszusammensetzung von <i>att1</i> .  | 176 |
| Tab. 8.2.17.  | Kutinmenge und -zusammensetzung von <i>att1</i> .                                       | 176 |
| Tab. 8.3.2.1. | Wachsanalyse der transgenen Linien mit dem Konstrukt Prom <sub>CUT1</sub> -CYP703A2.    | 181 |
| Tab. 8.3.2.2. | Kutinanalyse der transgenen Linien mit dem Konstrukt Prom <sub>CUT1</sub> -CYP703A2.    | 182 |
| Tab. 8.3.2.3. | Wachsanalyse der transgenen Linien mit dem Konstrukt Prom <sub>35S</sub> -CYP703A2 (I)  | 183 |
| Tab. 8.3.2.4. | Wachsanalyse der transgenen Linien mit dem Konstrukt Prom <sub>35S</sub> -CYP703A2 (II) | 184 |
| Tab. 8.3.2.5. | Kutinanalyse der transgenen Linien mit dem Konstrukt Prom <sub>35S</sub> -CYP703A2      | 185 |
| Tab. 8.4.     | Prozentuale Veränderungen der Wach- und Kutinmenge                                      | 186 |

## 8.7. Abkürzungsverzeichnis

|                      |  |
|----------------------|--|
| ABC-Transporter      | <i>ATP-binding-casette</i> -Transporter                          |
| ACCase               | <b>Acetyl-CoA-Carboxylase</b>                                    |
| Bp                   | <b>Basenpaare</b>  |
| BS                   | Blattscheiben  |
| BSTFA                | N,O-Bistrimethylsilyltrifluoracetamid                            |
| cDNA                 | komplementäre DNS (engl. <i>complementary DNA</i> )              |
| <i>cer</i> -Mutanten | <i>eceriferum</i> -Mutanten                                      |
| CoA                  | <b>Coenzym A</b>   |
| d                    | Tag (engl. <i>day</i> )  |
| DNA                  | Desoxyribonukleinsäure   |
| dNTP                 | engl. <i>deoxyribonucleoside triphosphates</i>                   |
| <i>dpm</i>           | Zerfall in der Minute (engl. <i>disintegrations per minute</i> ) |
| ECR                  | <b>Enoyl-CoA-Reduktase</b>                                       |
| ER                   | <b>Endoplasmatische Retikulum</b>                                |
| FAE                  | Fettsäureelongase (engl. <i>fatty acid elongase</i> )            |
| FAS                  | Fettsäuresynthase (engl. <i>fatty acid synthase</i> )            |
| FID                  | <b>Flammenionisationsdetektor</b>                                |
| GC                   | <b>Gaschromatograph</b>  |
| h                    | Stunde (engl. <i>hour</i> )                                      |

---

|                  |  |
|------------------|--|
| HCD              | $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Hydratase                                       |
| KAS              | Ketoacyl-ACP-Synthase  |
| KCR              | $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Reduktase  |
| KCS              | $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase   |
| Kb               | Kilobasenpaare   |
| LACS             | <i>long-chain</i> -Acyl-CoA-Synthase                                     |
| LTP              | Lipid Transfer Protein   |
| MeOH/HCl         | methanolische Salzsäure  |
| mg <sub>tg</sub> | Milligramm Trockengewicht  |
| min              | Minute   |
| MS               | Massenspektrometer   |
| MW               | Mittelwert   |
| NMR              | Kernspinresonanzspektroskopie (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i> ) |
| OD               | optische Dichte  |
| P <sub>450</sub> | Cytochrom P <sub>450</sub> Monooxygenase                                 |
| P                | Leitwert (engl. <i>Permeance</i> )                                       |
| PCR              | Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )       |
| RNA              | Ribonukleinsäure   |
| RT               |  |
| RT-PCR           | Reverse Transkriptions-PCR   |
| TEM              | Transmissionselektronenmikroskop   |
| Temp.            | Temperatur   |
| s                | Sekunde  |
| Sa               | Standardabweichung   |
| UV               | Ultraviolett   |
| VLCFA            | sehr langkettige Fettsäuren (engl. <i>very long chain fatty acids</i> )  |
| Vol              | Volumen  |
| v/v              | Volumen zu Volumen   |

---

## **9. Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht worden ist.

Bonn, 15.09.2010