

Studien zur Aufklärung der Biosynthese apoplastischer Polyester in höheren Pflanzen

Dissertation

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

vorgelegt von
Patrik Diehl
aus Köln

Bonn 2011

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

1. Gutachter: PD Dr. Rochus Benni Franke

2. Gutachter: Prof. Dr. Lukas Schreiber

Tag der Promotion: 14.10.2011

Erscheinungsjahr: 2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Barrieren als fundamentales Prinzip biologischer Systeme	2
1.2	Grenzflächen höherer Pflanzen.....	2
1.3	Grenzflächen primärer oberirdischer Organe höherer Pflanzen	3
1.4	Suberin-basierte Grenzflächen höherer Pflanzen.....	4
1.4.1	Chemische Zusammensetzung des Suberin-Polyesters.....	8
1.4.2	Biosynthese des Suberin-Polyesters	11
1.4.3	Cytochrom-P450-Monooxygenasen	14
1.5	Zielsetzung der Arbeit	17
2	Material und Methoden.....	19
2.1	Verwendete Chemikalien	20
2.2	Verwendetes Pflanzenmaterial.....	20
2.3	Anzuchtbedingungen.....	21
2.3.1	Anzucht auf Erde.....	21
2.3.2	Anzucht in Hydrokultur	21
2.3.3	Sterile Anzucht auf MS-Agar	22
2.4	Kreuzungsexperimente	22
2.5	Identifikation potenzieller Kandidatengene der Suberinbiosynthese	24
2.6	Molekularbiologische Arbeiten	25
2.6.1	Extraktion genomischer DNA	25
2.6.2	Extraktion von RNA aus Pflanzenmaterial	26
2.6.3	Photometrische Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung.....	27
2.6.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
2.6.5	Gelelektrophorese	29
2.6.6	Genotypisierung mittels kompetitiver PCR	29
2.6.7	Reverse Transkriptase – Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	31
2.7	Generierung transgener <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
2.7.1	Herstellung eines <i>entry clone</i>	33
2.7.2	Herstellung eines <i>expression clone</i>	35
2.7.3	Transformation von <i>Escherichia coli</i> und Selektion positiver Transformanten..	36
2.7.4	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	37
2.7.5	Isolation und Sequenzierung von Plasmiden.....	37
2.7.6	Anlegung von Glycerinstocks zur Lagerung von Klonen.....	37
2.7.7	Transformation von <i>Arabidopsis</i> mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38

2.8	Erfassung der differentiellen Genexpression von Suberinmutanten mittels Microarray.....	39
2.8.1	Isolation von RNA zur Durchführung eines Microarrays	39
2.9	Histologische und Anatomische Studien	40
2.9.1	Anfertigung von Wurzelquerschnitten mit dem Gefriermikrotom	40
2.9.2	Histochemischer Nachweis von Suberinlamellen mit Sudan 7B	40
2.10	Analytische Untersuchungen.....	41
2.10.1	Extraktion kutikulärer Wachse von Antheren	41
2.10.2	Totalextraktion von Antheren.....	41
2.10.3	Korrelation des Oberflächen/Gewichts-Verhältnisses von Antheren	41
2.10.4	Herstellung isolierter Wurzelzellwände	42
2.10.5	Herstellung von isoliertem Samenschalenmaterial	42
2.10.6	Umesterungsreaktionen	43
2.10.7	Derivatisierung	44
2.10.8	Gaschromatografie und Massenspektrometrie	45
2.11	Physiologische Untersuchungen	48
2.11.1	Bestimmung der Samenkeimungs- und Keimlings-Überlebensrate	48
2.11.2	Salzstress und osmotischer Stress bei Keimlingen	48
2.11.3	Austrocknungsexperiment.....	49
2.11.4	Untersuchung der Samenschalenpermeabilität	50
3	Ergebnisse	51
3.1	Untersuchungen zur Zusammensetzung der Antheren Kutikula von <i>cyp704B2</i> in <i>Oryza sativa</i>	52
3.1.1	Analyse der Zusammensetzung der kutikulären Wachse von Antheren der Linie <i>cyp704B2</i>	54
3.1.2	Analyse der Zusammensetzung des Antherenkutins von <i>cyp704B2</i>	56
3.2	Organspezifische Expression von Kandidatengenen der Suberinbiosynthese in <i>Arabidopsis thaliana</i>	58
3.3	Charakterisierung von CYP86B1/RALPH in <i>Arabidopsis</i>	63
3.3.1	Lokalisation von CYP86B1/RALPH in den Geweben der Wurzel.....	63
3.3.2	Analyse des Wurzelsuberins von <i>cyp86B1/ralph</i> Mutanten	66
3.3.3	Analyse der des Samenschalenpolyesters von <i>cyp86B1/ralph</i> Mutanten	70
3.4	Charakterisierung des putativen Peroxidase POX in <i>Arabidopsis</i>	73
3.4.1	Generierung homozygoter <i>pox</i> Mutanten	74
3.4.2	Analyse des Wurzelsuberins der <i>pox</i> Mutante.....	75
3.4.3	Analyse des Samenschalenpolyesters der <i>pox</i> Mutante.....	77
3.5	Charakterisierung der Doppelmutante <i>ralph/pox</i>	80
3.5.1	Generierung homozygoter Doppelmutanten <i>ralph/pox</i>	80

3.5.2	Analyse des Samenschalenpolyesters von <i>ralph/pox</i>	82
3.6	Charakterisierung der Doppelmutante <i>kcs17/ralph</i>	86
3.6.1	Generierung homozygoter <i>kcs17/ralph</i> Doppelmutanten	86
3.6.2	Analyse des Samenschalenpolyesters von <i>kcs17/ralph</i>	87
3.7	Charakterisierung der Doppelmutante <i>ralph/horst</i>	91
3.7.1	Generierung homozygoter <i>ralph/horst</i> Doppelmutanten	91
3.7.2	Analyse des Wurzelsuberins von <i>ralph/horst</i>	93
3.7.3	Anatomie primärer Wurzelbereiche von <i>ralph/horst</i> Mutanten	97
3.8	Charakterisierung der <i>horst/cyp86B2</i> Doppelmutante	99
3.8.1	Generierung homozygoter <i>horst/cyp86B2</i> Doppelmutanten	99
3.8.2	Analyse des Wurzelsuberins von <i>horst/cyp86B2</i>	101
3.9	Physiologische Studien	105
3.9.1	Erfassung der Samenschalen-Permeabilität von <i>Arabidopsis</i> Insertionsmutanten	105
3.9.2	Bestimmung der Keimungsrate und der Überlebensrate von Keimlingen in <i>ralph/horst</i>	109
3.9.3	Sensitivität von Wurzelsuberinmutanten gegenüber Salzstress und osmotischem Stress	111
3.9.4	Phänotypische Auswirkungen von Trockenstress auf <i>Arabidopsis</i> Wurzelsuberinmutanten	112
3.10	Erfassung der differentiellen Genexpression in Wurzelgeweben von Suberinmutanten mittels Microarray	115
3.10.1	Differenzielle Genexpression in der Suberinmutante <i>horst-1</i>	116
3.10.2	Differenzielle Genexpression in der Doppelmutante <i>ralph/horst</i>	119
4	Diskussion	121
4.1	Die Charakterisierung von CYP704B2 in <i>Oryza sativa</i>	122
4.2	Kandidatengene der Suberinbiosynthese in <i>Arabidopsis thaliana</i>	125
4.3	Die Bedeutung von CYP86B1/RALPH für die Suberinbiosynthese	127
4.4	Die Bedeutung von CYP86B1/RALPH für die Biosynthese des Samenschalenpolyesters	131
4.5	Charakterisierung der <i>pox</i> Mutante	133
4.6	Charakterisierung der Doppelmutante <i>ralph/pox</i>	136
4.7	Charakterisierung der Doppelmutante <i>kcs17/ralph</i>	137
4.1	Charakterisierung der <i>ralph/horst</i> Doppelmutante	139
4.1	Charakterisierung der Doppelmutante <i>horst/cyp86B2</i>	142
4.2	Physiologische Konsequenzen veränderter Polyesterkomposition in <i>cyp86B1/ralph</i> und <i>ralph/horst</i>	144

4.2.1	Einfluss veränderter Polyesterkompositionen auf die Samenkeimung	144
4.2.2	Einfluss veränderter Polyesterkompositionen auf die Überlebensrate von Keimlingen	145
4.2.3	Einfluss veränderter Polyesterkompositionen auf die Toleranz gegenüber Osmolytika	146
4.2.4	Einfluss veränderter Polyesterkompositionen auf die Trockenstresstoleranz.	147
4.3	Analyse der differentiellen Genexpression in primären Wurzeln von <i>horst-1</i> und der <i>ralph/horst</i>	149
5	Zusammenfassung.....	153
6	Literaturverzeichnis	156
7	Anhang.....	169
7.1	Verwendete Lösungen und Medien.....	170
7.2	Verwendete Primer	172
7.3	Berechnung der Hybridisierungstemperatur verwendeter Primer	174
7.4	Analytische Daten	175
7.5	Microarray Daten	195
7.5.1	Qualitätsanalyse der Microarray-Datensätze bei Erfassung der differentiellen Genexpression in <i>horst-1</i>	195
7.5.2	Zusammengefasste Ergebnisse der Analyse der differentiellen Genexpression in <i>horst-1</i>	196
7.5.3	Qualitätsanalyse der Microarray-Datensätze bei Erfassung der differentiellen Genexpression in <i>ralph/horst</i>	198
7.5.4	Zusammengefasste Ergebnisse der Analyse der differentiellen Genexpression in <i>ralph/horst</i>	199
7.6	Abbildungsverzeichnis	201
7.7	Tabellenverzeichnis	205
7.8	Formelverzeichnis.....	207

Abkürzungsverzeichnis

μE	Mikroeinstein
μg	Mikrogramm
μM	Mikromolar
bp	Basenpaare
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoacetamid
cDNA	Komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CYP	Cytochrom-P450-Monooxygenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleotid Triphosphat
EDTA	Ethylamintetraessigsäure
FAE	Fettsäureelongation (<i>fatty acid elongation</i>)
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Gramm
GC	Gaschromatograph
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GUS	β-Glucoronidase
h	Stunde
Kbp	Kilobasenpaare
KCS	β-Ketoacyl-CoA-Synthase
l	Liter
M	Mol
m	Meter
m ²	Quadratmeter
mA	Milliampere
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MS	Massenspektrometer
N	Normalität
NADH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomol
OD	optische Dichte
OH	Hydroxy
P450	Cytochrom-P450-Monooxygenase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pg	Picogramm
pM	Picomol

VI

RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymaktivität (<i>Unit</i>)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen zu Volumen
VLCFA	sehr langkettige Fettsäuren (<i>very long chain fatty acids</i>)
w/v	Gewicht zu Volumen (<i>weight per volume</i>)
w/w	Gewicht zu Gewicht (<i>weight per weight</i>)

1 Einleitung

1.1 Barrieren als fundamentales Prinzip biologischer Systeme

Basierend auf den Grundsätzen der Thermodynamik definiert sich ein biologisches System durch die Aufrechterhaltung eines Ungleichgewichtes mit seiner Umgebung. Bei einem Gleichgewicht zwischen einem offenen System, wie es alle Arten von Lebewesen darstellen, und seiner Umwelt kann kein Energieumsatz stattfinden. Erst nach dem Tod eines Lebewesens stellt sich ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen dem System und seiner Umwelt ein.

Dieses fundamentale Prinzip der Thermodynamik verdeutlicht die zentrale Bedeutung der Ausbildung von Barrieren für einen lebenden Organismus und ist auf all seinen Organisationsstufen zu erkennen. In der kleinsten Einheit des Lebens, der Zelle, stellen Plasmamembran und Intermembransysteme Grenzflächen dar, an denen selektiver Energie-, Stoff- und Informationsaustausch stattfindet. In höheren Organisationsstufen werden Gewebe und Organe durch die Ausbildung von Barrieren voneinander abgegrenzt. Bei mehrzelligen Organismen erfolgt die Ausbildung von spezialisierten Geweben, welche als Grenzfläche zur Umwelt fungieren und den Habitus des Lebewesens von seiner Umwelt abgrenzen.

1.2 Grenzflächen höherer Pflanzen

Der Übergang von einer aquatischen zu einer terrestrischen Lebensweise im Laufe der phylogenetischen Entwicklung zu den höheren Pflanzen vor 450-600 Millionen Jahren (Morant et al., 2007) forcierte eine Reihe von Anpassungen an den zu besiedelnden Lebensraum.

Die Aufnahme von Wasser und Nährstoffen über den gesamten Pflanzenkörper, wie bei submers lebenden Pflanzen, ist bei einer terrestrischen Lebensweise nicht möglich. Der Landgang der Pflanzen erforderte somit die Ausbildung von spezialisierten Organen, welche der Aufnahme von Wasser und Nährstoffen dienen.

Aufgrund der gashaltigen Atmosphäre an Land war eine weitere entscheidende Anpassung die Entwicklung von Grenzflächen zur Verringerung des Wasserverlustes. Pflanzen sind in der gashaltigen Atmosphäre einem hohen Wasserpotentialgradienten ausgesetzt, welcher der Pflanze ohne geeignete Barrieren in hohem Maße Wasser entziehen würde. Eine Anforderung an oberirdische pflanzliche Grenzflächen ist somit die Imprägnierung des Pflanzenkörpers, um dem unkontrollierten Wasserverlust aus an die Atmosphäre entgegenzuwirken. Weiterhin können höhere Pflanzen als sessil lebende Organismen negative Umwelteinflüsse in Form biotischer und abiotischer Stressfaktoren nicht durch Standortwechsel vermeiden. Auch hier müssen pflanzliche Grenzflächen diesen umweltbedingten Stressfaktoren entgegenwirken können.

1.3 Grenzflächen primärer oberirdischer Organe höherer Pflanzen

Die genannten Anforderungen an oberirdische und unterirdische pflanzliche Grenzflächen spiegeln sich in den morphologischen Anpassungen dieser Oberflächenstrukturen wieder. Die Abschlussgewebe aller primären oberirdischen Organe höherer Pflanzen, namentlich Blätter, Früchte und Sprossachsen im primären Entwicklungszustand, sind mit einer Kutikula bedeckt. Kutikuläre Strukturen sind auf der Oberfläche aller Blütenorgane, inklusive der äußeren Wand der Antheren und der Fruchtblätter (Sawhney und Polowick, 1986; Jung *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010) und auf Abschlussgeweben der reifen Samen nachweisbar (Shao *et al.*, 2007). Die Kutikula höherer Pflanzen ist der Epidermis als eine 0,1 bis 10 µm dicke, membranartige Schicht aufgelagert. Sie setzt sich zusammen aus einer lipophilen Polymermatrix, dem Kutin, und den darin eingelagerten und aufgelagerten, löslichen, sehr langkettigen Fettsäuren und deren Derivaten, sogenannten kutikulären Wachsen (Nawrath, 2002). Kutin stellt die strukturelle Komponente der Kutikula dar (Kolattukudy, 1980) und ist chemisch charakterisiert als ein unlösliches Biopolymer auf Basis von C₁₆ und C₁₈ Aliphaten, verknüpft über Esterbindungen zwischen Carboxy- und ω-Hydroxygruppen von Monocarbonsäurederivaten (Holloway, 1977; Franke *et al.*, 2005). Neben den aliphatischen Komponenten konnte Glycerin als ein weiterer Bestandteil der kutikulären Matrix identifiziert werden (Graça *et al.*, 2002). Eine weitere Komponente der Kutikula vieler Spezies ist das Kutan, welches in seiner chemischen Zusammensetzung aufgrund seiner Resistenz gegen Depolymerisierung weitestgehend unbekannt ist (Nip *et al.*, 1986; Jeffree, 1996). Es konnten hier jedoch sowohl aliphatische als auch aromatische Substanzen nachgewiesen werden (Li-Beisson *et al.*, 2010).

Die Bestandteile der Kutikula werden in den epidermalen Zellen synthetisiert, in den Apoplasten exportiert und der Epidermis aufgelagert. Die hydrophoben Eigenschaften der Kutikula ermöglichen eine Imprägnierung des Pflanzenkörpers. Die Kutikula wirkt weiterhin der Penetration durch Pathogene entgegen (Kolattukudy, 1985), verhindert die Auswaschung von Stoffen aus dem Pflanzenkörper durch Regen und Nebel (Neinhuis und Barthlott, 1997), und gewährleistet durch Teilreflexion von Strahlung an sonnenexponierten Standorten einen Schutz des Photosyntheseapparates (Pfündel *et al.*, 2007). Durch die Ausbildung von speziellen Oberflächenstrukturen wird die Reinigung der Pflanzenoberfläche von Schmutz und Pathogenen erleichtert (Leveau, 2007). Die imprägnierenden Eigenschaften der Kutikula übersteigen in der Regel die von modernen synthetischen Polymeren (Riederer und Schreiber, 2001). Die strukturelle Komponente der Kutikula, das Kutinpolymer, ist entscheidend zur Aufrechterhaltung der Organidentität. In den Kutindefizienten *Arabidopsis* Mutanten *bodyguard* (*bdg*) (Kurdyukov *et al.*, 2006) und *lacerata* (*lcr*)

(Wellesen *et al.*, 2001) konnte gezeigt werden, dass eine Aberration im Aufbau der Kutinmatrix eine Fusion von Pflanzenorganen bedingen kann.

1.4 Suberin-basierte Grenzflächen höherer Pflanzen

Analog zu den Anforderungen an oberirdische Grenzflächen müssen auch unterirdische Grenzflächen in der Lage sein, negativen biotischen und abiotischen Umwelteinflüssen entgegenzuwirken. Unterirdische Grenzflächen imprägnieren die Gewebe der Wurzel und minimieren den Wasserverlust an das umgebene Substrat. In den Geweben der Wurzel muss eine selektive Aufnahme von Wasser und Nährstoffen aus der Umgebung stattfinden können. Gleichzeitig muss ein Rückfluss von Wasser in das umgebende Substrat und die Aufnahme von toxischen Substanzen in den Pflanzenkörper unterbunden werden (Schreiber, 2010).

Die primären Abschlussgewebe der Wurzel sind, analog zu den primären oberirdischen Grenzflächen, durch Depositionen von hydrophoben Bestandteilen in apoplastischen Bereichen charakterisiert, welche in diesem Fall aus Ablagerungen des hydrophoben Polymers Suberin bestehen.

Die Wasser- und Nährstoffaufnahme höherer Pflanzen aus dem Boden findet in den primär entwickelten Bereichen des Wurzelgewebes nahe der Wurzelspitze, der so genannten Wurzelhaarzone statt. Im primären Zustand wird die Wurzel nach außen hin von der Rhizodermis begrenzt. Die Rhizodermis steht in direktem Kontakt zum umgebenen Substrat und umschließt das Cortextgewebe der primären Wurzel. Die Rhizodermis ist ein relativ kurzlebiges Gewebe, welches im Laufe der Wurzelentwicklung durch die Hypodermis ersetzt wird. Der Cortex ist nach innen von der Endodermis begrenzt, einer einlagigen Zellschicht, die die Bereiche der Wurzelrinde von den Bereichen des Zentralzylinders abgrenzt. Im Zentralzylinder sind die Leitgewebe der Pflanze lokalisiert, über die Wasser und aufgenommene Nährstoffe und Metabolite im Pflanzenkorpus verteilt werden.

Das physiologische Abschlussgewebe primär entwickelter Wurzeln ist die Endodermis. Hier können Suberineinlagerungen in unterschiedlichen morphologischen Ausprägungen nachgewiesen werden. In den im primären Entwicklungszustand befindlichen Bereichen der Wurzelhaarzone, in denen die Aufnahme von Wasser und gelösten Nährstoffen stattfindet, sind die Zellen der Endodermis mit Caspary'schen Streifen versehen (Caspary, 1866). Caspary'sche Streifen stellen Ablagerungen in den antiklinen Zellwänden dar, welche durch Einlagerungen von Suberin, Lignin und weiteren Zellwandkomponenten charakterisiert sind. Durch die Ablagerung von Caspary'schen Streifen wird der Apoplast der Endodermis imprägniert und der Durchtritt von Wasser und darin gelösten polaren Substanzen deutlich verringert (Schreiber *et al.*, 1994; Schreiber, 2007).

Bei fortlaufender Entwicklung der Wurzel geht die Endodermis vom primären über den sekundären in einen tertiären Entwicklungszustand über. Dabei erfolgt eine fortlaufende Suberinisierung der Zellwände von Endodermiszellen. Als sekundäre Zellwandmodifikation erfolgt die Ablagerung von Suberin auf der inneren Oberfläche der Zellwand in direkter Nähe zur Plasmamembran. Diese Ablagerungen sind definiert als Suberinlamellen (Ranathunge *et al.*, 2011). Suberineinlagerungen können in späteren Entwicklungsstadien der Wurzel auch in den Geweben der Hypodermis nachgewiesen werden. Auch hier erfolgt die Suberinisierung zunächst in Form von Caspary'schen Streifen und geht über in die Ausbildung von lamellarem Suberin. Eine Hypodermis mit Suberineinlagerungen wird als Exodermis definiert.

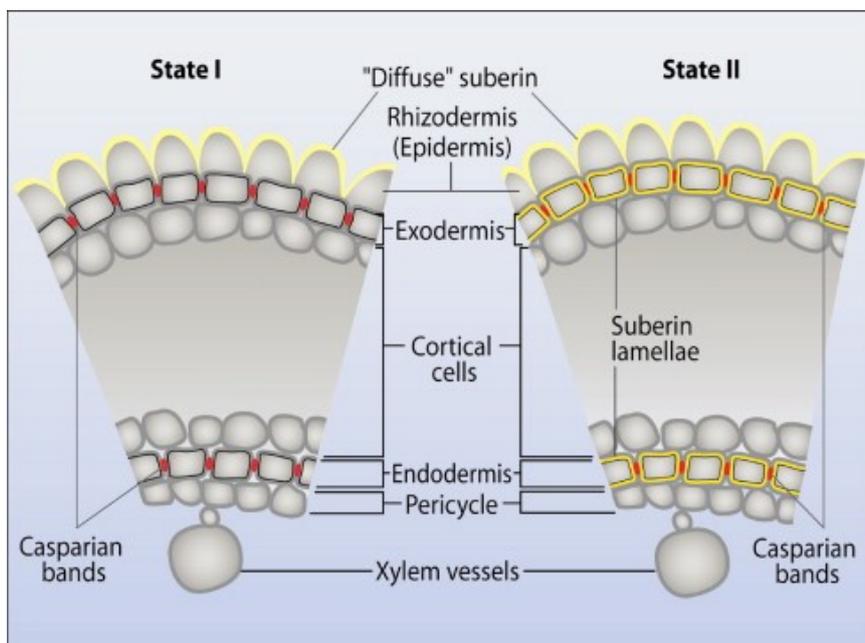


Abbildung 1: Apoplastische Suberinmodifikationen den Geweben der Wurzel

Schematische Darstellung von Wurzelquerschnitten im primären (State I) und sekundären Stadium (State II) der Suberinisierung. Primäre Suberinisierung ist gekennzeichnet durch Caspary'sche Streifen (rot) in radiale und transverse Bereiche der primären Zellwand von Endo- und Exodermiszellen. Sekundäre Suberinisierung ist gekennzeichnet durch Deposition von Suberinlamellen (gelb) auf der inneren Seite der Zellwand angrenzend an die Plasmamembran. Alternativ kann Suberin zwischen den Intermikrofibrillen der Rhizodermis in Form von diffusem Suberin abgelagert werden. (nach Ranathunge *et al.*, 2011)

Im Gegensatz zur Kutikula, deren Deposition auf primäre oberirdische Pflanzengewebe beschränkt ist, sind die Lokalisationsorte von Suberin im Pflanzenkörper höchst divers und nicht ausschließlich auf die Grenzflächen der Wurzelgewebe beschränkt. Einlagerungen von Suberin oder Suberin-assoziierten Polyestern finden im Laufe der natürlichen Pflanzenentwicklung in unterschiedlichsten Geweben statt. Depositionsorte von Suberin sind beispielsweise Bündelscheidenzellen in Blattgeweben von C_4 -Pflanzen, Nadeln der Koniferen, Bündelscheidenzellen von Gräsern, Abszissionszonen an Blatt- und Blütengeweben sowie Periderm des Sprosses und der Wurzel (Graça und Pereira, 2000a, b; Ranathunge *et al.*, 2011). Suberin, beziehungsweise Suberin-assoziierte Polyester konnten weiterhin in den Geweben der Samenschale, namentlich der Chalazaregion und der inneren Schicht des äußeren Integuments nachgewiesen werden (Abbildung 2) (Molina *et al.*, 2006; Beisson *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2007; Molina *et al.*, 2008). Die Samenschale ist ein entscheidender Faktor für die Entwicklung des Embryos, da sie die embryonalen Gewebe vor mechanischen und chemischen Einflüssen schützt. Sie stellt eine Barriere für den Gas- und Wasseraustausch dar und ist essenziell für die Aufrechterhaltung der Samendormanz (Bewley, 1997).

Suberinisierung kann weiterhin als Reaktion auf externe Stimuli induziert werden. Eine Ablagerung von Suberin erfolgt als Reaktion auf abiotische Stresseinflüsse, Pathogenbefall oder Verletzung (North und Nobel, 1994; Reinhardt und Rost, 1995; Lulai und Corsini, 1998). Mechanische Verwundungen von Pflanzengewebe leiten die Ausbildung eines Suberin-haltigen Wundperiderms ein (Agrawal und Kolattukudy, 1978; Bernards und Lewis, 1992). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Ablagerung von Suberin immer dann stattfindet, wenn die Notwendigkeit zur Ausbildung einer Barriere besteht, um entweder unterschiedliche Pflanzengewebe voneinander oder von der Umwelt abzugrenzen (Kolattukudy, 2001). Folglich können sich die meisten Zellen einer Pflanze in suberinierte Zellen reprogrammieren.

Neben den Polyester-basierten Polymeren Suberin und Kutin finden sich in den Geweben der Pflanze weitere Polymerdepositionen, die nicht eindeutig einem der beiden genannten Polymere zugeordnet werden können. Ein Beispiel hierfür ist das Sporopollenin als Hauptkomponente der Exine, der äußeren Pollenhülle. Sporopollenin ist ein äußerst resistenter und chemisch stabiler Polyester, beziehungsweise Polyether mit aliphatischen und phenolischen Hydroxyl- und Carboxylgruppen tragenden Komponenten (Morant *et al.*, 2007; Dobritsa *et al.*, 2009).

Das Sporopollenin schützt den Gametophyten gegenüber Pathogenbefall, UV-Strahlung und Austrocknung und hat eine zentrale Funktion in der Pollenerkennung der Narbe beim Vorgang der Bestäubung (Edlund *et al.*, 2004). Die Konservierung von Pollen über Millionen Jahre zeugt von der Stabilität und den protektiven Eigenschaften des Sporopollenins. Die Eigenschaften des Samenschalenpolyesters und des Sporopollenins tragen entscheidend zum reproduktiven Erfolg der Pflanzen bei, da sie dem Schutz der haploiden und diploiden Folgegeneration dienen (Pinot und Beisson, 2011).

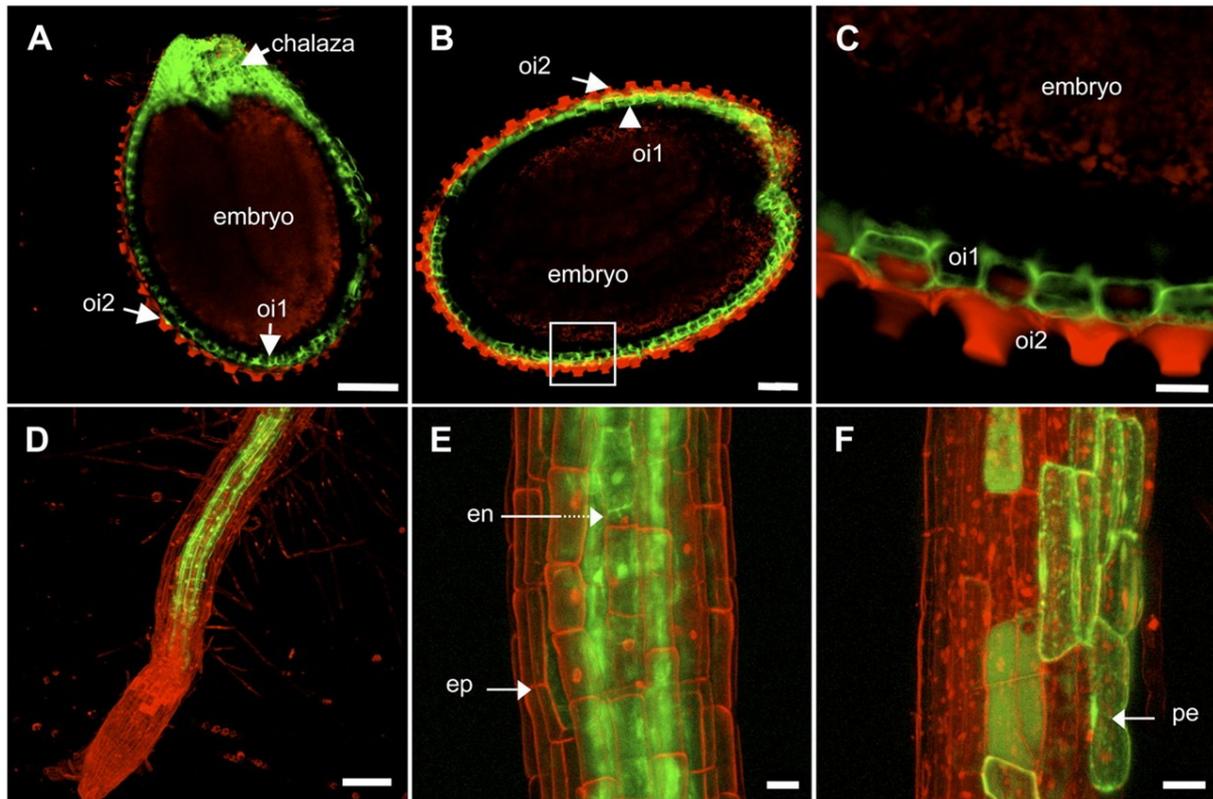


Abbildung 2: Darstellung der Depositionsorte von Suberin in den Geweben von *Arabidopsis thaliana* anhand von $Prom_{ASFT}::eYFP$ Observation

Analyse der $ASFT$ Promotoraktivität in Wurzeln und Samen von *Arabidopsis thaliana*. $ASFT$ wurde charakterisiert als Feruoyl-CoA Transferase in *Arabidopsis* mit Beteiligung an der Suberinbiosynthese. Lebende transgene Samen und Wurzeln von $Prom_{ASFT}::eYFP$ Pflanzen (YFP = Yellow fluorescent protein, Gelb Fluoreszierendes Protein) wurden mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie betrachtet. (A) und (B): Konfokale Querschnitte von transgenen Samen in späten Reifungsstadien zeigen YFP-Aktivität im äußeren Integument 1 (oi1) und in der Chalazaregion der Samenschale; (C): Vergrößerter Ausschnitt aus (B); (D) und (E): Darstellung von Wurzeln zwei Wochen alter transgener Pflanzen. YFP Expression ist in der Endodermis lokalisiert; (F): Darstellung von 5 Wochen alten transgenen Pflanzen. YFP-Fluoreszenz ist hier in peridermalen Zellen lokalisiert. Die rote Fluoreszenz der Samenschale und der Zellwände der Wurzelzellen erfolgte durch Propidiumiodid-Färbung. Größenmarker: 100 μm (A) und (D); 50 μm (B); 20 μm (C),(E) und (F); en = Endodermis; ep = Epidermis; pe = Peridermis; oi = äußeres Integument; Verändert nach Molina *et al.*, (2009)

1.4.1 Chemische Zusammensetzung des Suberin-Polyesters

Suberin ist in seinem Aufbau heterogener als Kutin und kann in eine aliphatische und eine aromatische Domäne aufgegliedert werden. Als Bestandteile der polymeren aromatischen Domäne konnten Monolignole und Hydroxymitsäuren, hauptsächlich Ferulasäure und Ferulasäurederivate identifiziert werden (Bernards, 2002; Ranathunge *et al.*, 2011).

Die aliphatische Domäne des Suberins höherer Pflanzen wird dominiert von langkettigen ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren. Primäre Alkohole und Monocarbonsäuren sind in geringeren Mengen vorhanden. Die oben genannten Monomere können, je nach untersuchter Pflanzenspezies, in einem Kettenlängenbereich von C_{16} bis C_{32} nachgewiesen werden. Dominante Kettenlängen sind jedoch C_{16} , C_{18} und C_{22} . Die häufigsten C_{18} Monomere des Suberins sind ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren, welche in einer mittleren Position des Moleküls durch die Einführung von Doppelbindungen, Epoxygruppen oder Diolgruppen modifiziert sein können (Graça und Santos, 2006). Glycerin ist eine der Hauptkomponenten des Suberinpolymers und kann, je nach untersuchter Spezies bis zu 26 % des Polymers ausmachen (Moire *et al.*, 1999; Graça und Santos, 2007).

Durch partielle Depolymerisierung des Suberins und anschließender massenspektrometrischer Analyse der Oligomere konnten unterschiedliche Veresterungsmuster identifiziert werden. Hier wurden dimere Ester aus linear verknüpften ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren, Glycerinester mit ω -Hydroxysäuren, α,ω -Disäuren oder Monocarbonsäuren, Glycerinester mit zwei α,ω -Disäuren und Esterbindungen zwischen Ferulasäuren und ω -Hydroxysäuren nachgewiesen (Graça und Pereira, 2000a, b; Graça und Santos, 2006).

Die genaue räumliche Organisation des Suberins im Apoplasten der Pflanzenzellen ist nicht im Detail bekannt. Wie in Abbildung 3 zu sehen, gehen vorhandene Modellvorstellungen von einer hochgradig geordneten Domänenstruktur mit alternierenden aliphatischen und aromatischen Domänen aus (Bernards, 2002; Graça und Santos, 2007). Dieser geordnete Aufbau ist wahrscheinlich auch für die in TEM-Aufnahmen erkennbare Lamellierung des Suberins verantwortlich (Abbildung 4). Es wird spekuliert, dass sich durch aufeinanderfolgende aliphatische und aromatische Domänen elektronendichte und elektronentransluzente Bereiche abwechseln.

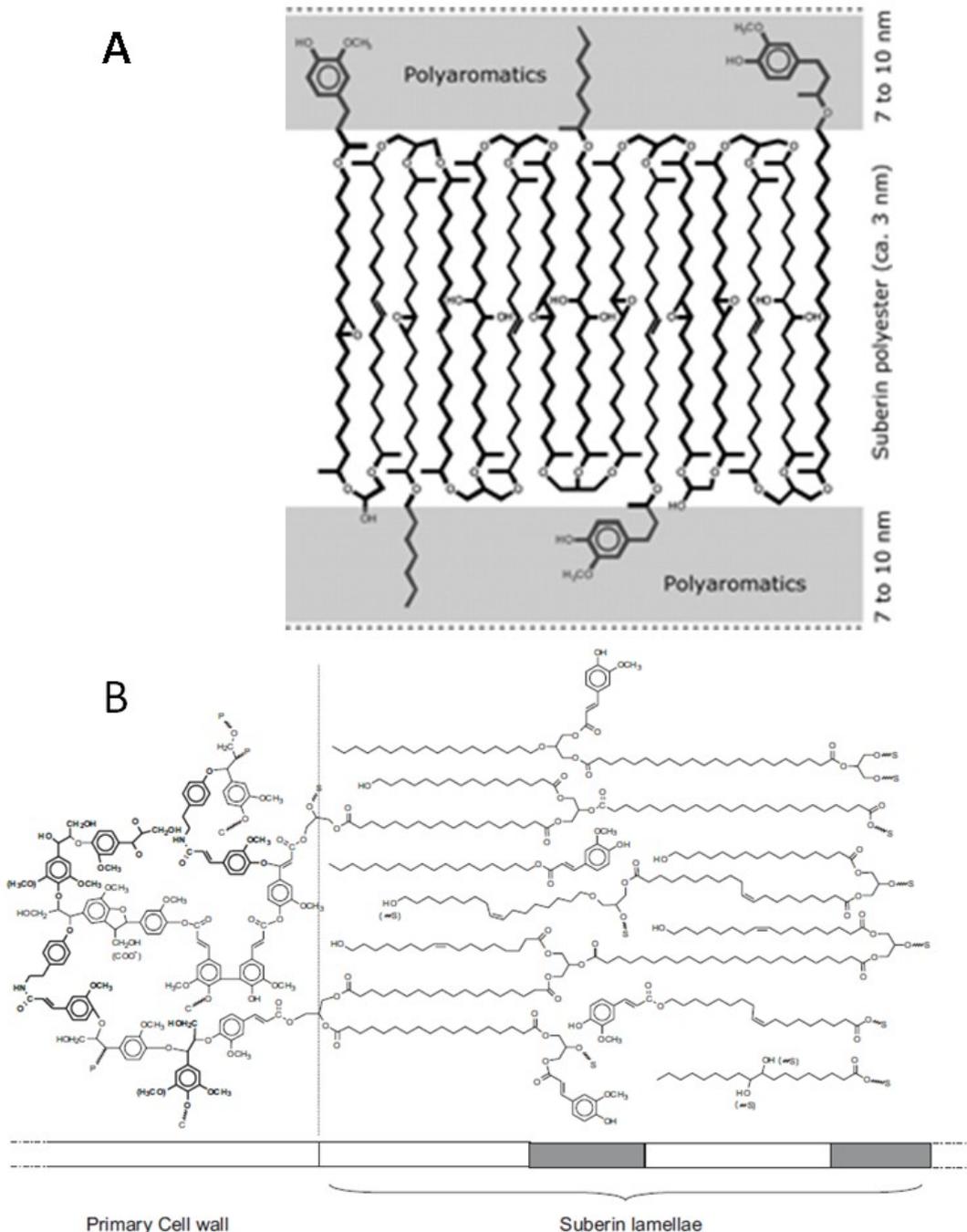


Abbildung 3: Modellvorstellungen des dreidimensionalen Aufbaus des Suberinpolyesters

(A): Modell der Suberinstruktur in sekundären Zellwänden des Korks der Korkenziehe (*Quercus suber*) nach Graca und Santos (2007). Die aliphatische Domäne ist dargestellt als einlagiger Glycerin-basierter Polyester langkettiger Fettsäurederivate, an die zu beiden Seiten aromatische Domänen angrenzen. Die Lamellierung des Suberins basiert hier auf abwechselnden polyaromatischen und polyaliphatischen Domänen; (B): Modell der Struktur des Suberins der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) nach Bernards (2002). Die aromatische (polyphenolische) Domäne ist in diesem Modell beschränkt auf die primäre Zellwand und ist kovalent verknüpft mit deren Kohlenhydraten. Die aliphatische Domäne ist dargestellt als linearer, Glycerin-basierter Polyester mit veresterten "phenolischen Suberinbestandteilen". Elektronendichte und elektronentransuzente Lamellierung des Suberins wird hier verursacht durch das Vorhandensein von phenolischen Substanzen im aliphatischen Suberin. Mit P = Aromaten; S = Suberin; C = Kohlenhydrate; Primary Cell Wall = primäre Zellwand; Suberin lamellae = Suberinlamellen

Lulai und Corsini (1998) konnten für die aromatische Domäne eine Schutzfunktion gegen bakterielle Infektionen und für die aliphatische Domäne eine Funktion in der Resistenz gegen Infektionen durch Pilze zuweisen. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften von polyaliphatischen Verbindungen wurde postuliert, dass die aliphatische Domäne die abdichtenden Eigenschaften des Suberins für die Imprägnierung des Apoplasten von suberinisierten Geweben bedingt (Zimmermann *et al.*, 2000; Hose *et al.*, 2001; Höfer, 2008).

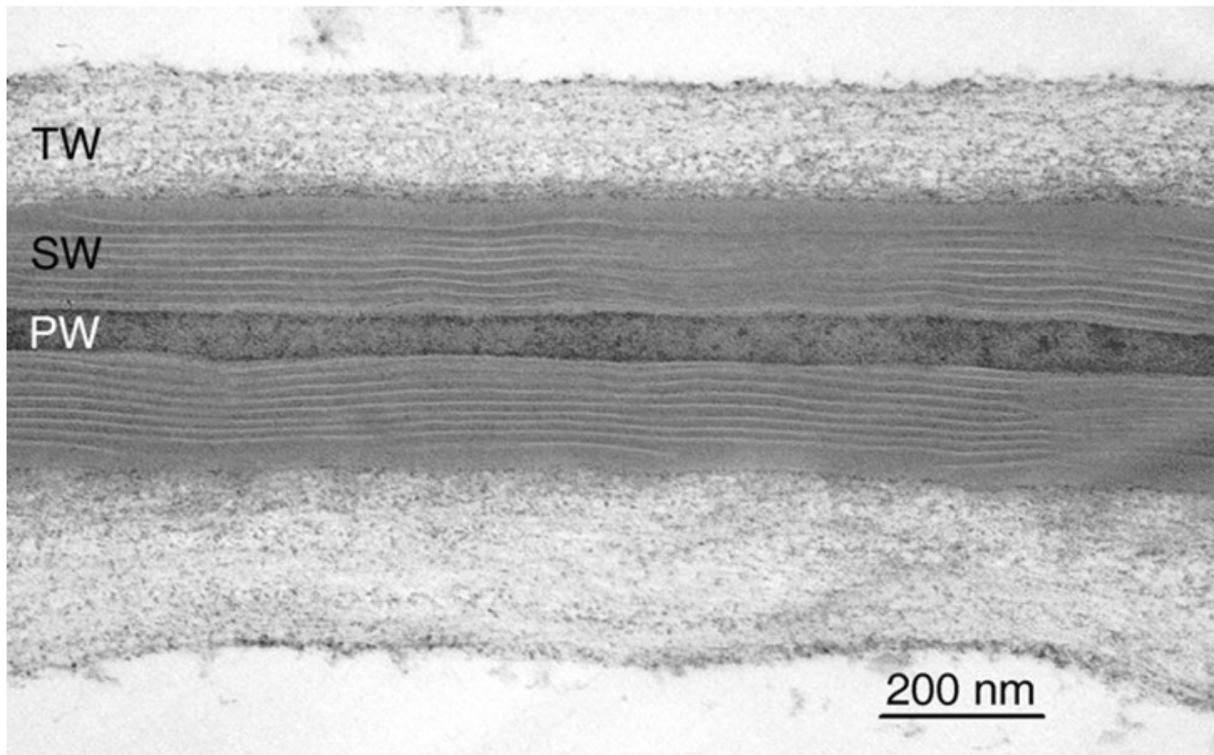


Abbildung 4: Ultrastruktur suberinisierter Peridermzellen der Kartoffelschale

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellwänden des Kartoffelperiderms zeigen die typische lamellare Struktur des Suberins in der Zellwand. Primäre Zellwand (PW), sekundäre Zellwand (SW) mit Suberinlamellen und tertiäre Zellwand (TW) sind eindeutig unterscheidbar. Nach Serra *et al.*, (2009)

1.4.2 Biosynthese des Suberin-Polyesters

Die Zusammensetzung des Wurzelsuberins von *Arabidopsis thaliana*, dem Modellorganismus der dikotylen höheren Pflanzen, kann im Vergleich mit dem Suberin anderer Pflanzenspezies durchaus als repräsentativ angesehen werden. *Arabidopsis thaliana* eignet sich somit als Modellorganismus zur Erforschung der Suberinbiosynthese (Franke *et al.*, 2005). Die Sequenzierung des *Arabidopsis*-Genoms und die damit einhergehende Entwicklung von molekularbiologischen Methoden, sowie die Entwicklung von chemischen Analysemethoden zur Quantifizierung des Suberins in den Geweben von *Arabidopsis* ermöglichten die Etablierung von molekulargenetischen Ansätzen zur Identifikation von Genen der Suberinbiosynthese (Franke *et al.*, 2005; Molina *et al.*, 2006; Li-Beisson *et al.*, 2010).

Wie bereits erwähnt, wird die aliphatische Domäne des Suberins dominiert von sehr langkettigen ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren. Monocarbonsäuren und primäre Alkohole sind weitere Bestandteile des aliphatischen Suberins. Alle hier genannten Molekülspezies können biochemisch von sehr langkettigen Fettsäuren (VLCFAs, Very Long Chain Fatty Acids) abgeleitet werden. Vorläufermoleküle der VLCFAs sind plastidär synthetisierte C₁₆ und C₁₈ Monocarbonsäuren. Ihre Kettenverlängerung wird katalysiert von einem membrangebundenen Multienzymkomplex, dem so genannten Fettsäure-Elongations-Komplex (FAE-Komplex, Fatty Acid Elongation Complex) der an der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist. Die Elongation von Fettsäuren verläuft analog zur plastidären Fettsäurebiosynthese durch sequentielle Kondensation von Malonyl-CoA an eine aktivierte Fettsäure. Das regulierende Enzym dieses Multienzymkomplexes ist ein Enzym der β -Ketoacyl-CoA-Synthase Familie, welches den eigentlichen Kondensationsschritt katalysiert und das geschwindigkeits- und produktbestimmende Enzym des Multienzymkomplexes darstellt (Millar und Kunst, 1997; Millar *et al.*, 1999).

Eine weitere Schlüsselreaktion der Biosynthese aliphatischer Suberinmonomere ist die Hydroxylierung von Fettsäuren in der endständigen ω -Position zur Generierung von ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren. Auf Basis von biochemischen Experimenten und heterologen Expressionsstudien in Mikrosomen konnte gezeigt werden, dass die ω -Hydroxylierung von Fettsäuren typischerweise von CytochromP450-Monooxygenasen, insbesondere Mitgliedern der CYP86 und CYP94 Familie der P450-Monooxygenasen katalysiert wird (Soliday und Kolattukudy, 1977; Pinot *et al.*, 1992; Pinot *et al.*, 1993; Duan und Schuler, 2005; Pinot und Beisson, 2011).

Die Cytochrom-P450-Monooxygenasen werden aufgrund ihrer zentralen Funktion in der Biosynthese von Suberin- und Kutinmonomeren in Kapitel 1.4.3 gesondert betrachtet.

Weitere Schritte der Suberinbiosynthese beinhalten die Verknüpfung, den Transport und den Export der aliphatischen und aromatischen Monomere oder Oligomere und des Glycerins in den Apoplasten. Die genaue zeitliche und räumliche Abfolge der Suberinbiosynthese ist nicht aufgeklärt. In Abbildung 5 ist ein mögliches Szenario dargestellt. In diesem Modell werden plastidäre Fettsäuren der Kettenlänge C_{16} und C_{18} optional mittels Fettsäureelongation am FAE-Komplex zu VLCFAs unterschiedlicher Kettenlängen elongiert. Eine Oxidation der Monocarbonsäuren zu ω -Hydroxysäuren, beziehungsweise α,ω -Disäuren erfolgt hier nach dem Elongationsprozess. Eine anschließende Veresterung der Fettsäurederivate mit Glycerin und Ferulasäure findet innerhalb der Pflanzenzelle statt und führt zur Ausbildung von oligomeren Suberinbausteinen (Franke und Schreiber, 2007; Pollard *et al.*, 2008). Der Export dieser oligomeren Bausteine aus der Zelle in den Apoplasten ist weitestgehend unbekannt. Es wird jedoch vermutet, dass der Export von Suberinoligomeren, analog zum Export von kutikulären Wachs- und Kutinbestandteilen aus Epidermiszellen, durch Plasmamembran-lokalisierte ABC-Transporter (ATP Binding Casette Transporter) (Bird *et al.*, 2007) und membrangebundene Lipid-Transfer-Proteine (LTP) (DeBono *et al.*, 2009) vermittelt wird. Ein Export aus der Pflanzenzelle durch Rezeptor-vermittelte Exocytose, beziehungsweise über die Sekretion von Ölkörperchen, ist ebenfalls möglich.

Auch der Vorgang der extrazellulären Polymerisierung des Suberinpolyesters ist nicht aufgeklärt. In Bezug auf die aliphatische Domäne des Suberins kann hier analog zu der Polymerisierung von Kutinbausteinen eine Beteiligung von α,β -Hydrolasen und GDGL-Lipasen vermutet werden (Kurdyukov *et al.*, 2006).

Studien zu Suberinisierungsvorgängen in Tomate (*Solanum lycopersicum*) und Kartoffelperidermen (*Solanum tuberosum*) lieferten Hinweise auf eine Beteiligung von anionischen und kationischen Peroxidasen an der Polymerisierung der aromatischen Suberindomäne (Bernards *et al.*, 1999; Quiroga *et al.*, 2000; Arrieta-Baez und Stark, 2006). Für die Quervernetzung der aromatischen Domäne wird eine Peroxidase/ H_2O_2 -vermittelte Radikalpolymerisation, analog zur Ligninpolymerisierung angenommen (Kolattukudy, 1980).

1.4.3 Cytochrom-P450-Monooxygenasen

Die Enzymfamilie der Cytochrom-P450-Monooxygenasen stellt eine Superenzymfamilie dar, deren Mitglieder in Organismen aller Taxa von den Prokaryoten bis zum Menschen vertreten sind (Nelson, 1999). Speziell in höheren Pflanzen kann eine große Zahl an P450-Monooxygenasen im Genom nachgewiesen werden. Im Genom von *Arabidopsis thaliana* konnten 272 Cytochrom-P450 Gene, inklusive 26 Pseudogene identifiziert werden (Nelson *et al.*, 2004). Sie decken etwa 1 % des gesamten codierenden Genoms von *Arabidopsis* ab und stellen somit eine der größten Genfamilien in dikotylen Pflanzen dar. Die Familie der P450-Monooxygenasen ist eine hochgradig divergente Supergenfamilie. Während P450-Monooxygenasen untereinander einen geringen Grad an Homologie in ihrer Primärsequenz aufweisen, sind in sekundären und tertiären Strukturen teilweise hochkonservierte Bereiche nachweisbar (Schuler und Werck-Reichhart, 2003). Auch wenn die Sequenzidentität von P450-Monooxygenasen in höheren Pflanzen teilweise unter 20 % liegt, tragen alle Mitglieder dieser Enzymfamilie ein gemeinsames katalytisches Zentrum, Häm-Eisen koordiniert mit der Thiolgruppe eines konservierten Cysteins, und zeigen übereinstimmende räumliche Strukturen und dreidimensionale Faltung. In Enzymbereichen, welche die Substratspezifität bestimmen, ist eine hohe Variabilität nachweisbar.

Die Einteilung von P450-Monooxygenasen in Familien und Subfamilien basiert auf ihrer Sequenzidentität auf Aminosäure-Ebene. Mit wenigen Ausnahmen weisen P450-Monooxygenasen der gleichen Familie eine Sequenzidentität von mindestens 40 %, der gleichen Subfamilie von mindestens 55 % auf (Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000). Ein Vergleich der P450-Monooxygenase-Gene in Reis (*Oryza sativa*) und *Arabidopsis* konnte zeigen, dass die meisten P450-Familien höherer Pflanzen bereits vor der Divergenz der Monokotylen und Dikotylen vor etwa 200 Millionen Jahren existierten (Nelson *et al.*, 2004).

P450-Monooxygenasen sind klassisch definiert als Häm-Protein haltige Oxidationssysteme, die unter Verwendung von NADH oder NADPH als Reduktionsäquivalent molekularen Sauerstoff reaktiv spalten und ein funktionalisiertes organisches Molekül und ein Molekül Wasser produzieren. Oft handelt es sich bei den Produkten um hydroxylierte Derivate des Substrates. In anderen Fällen vermitteln P450-Monooxygenasen ein weites Spektrum an Reaktionen, darunter Epoxylierung, Dealkylierung, Isomerisierung, Dimerisierung, Dehydrierung, Spaltung von C-C-Bindungen, Decarboxylierung, Stickstoff- und Schwefel-Oxidation, Dehalogenierung und Deaminierung (Schuler und Werck-Reichhart, 2003).

Die katalytischen Funktionen von P450-Monooxygenasen in Pflanzen reichen von der Synthese von Signalmolekülen, Hormonen, Pigmenten und Abwehrstoffen über die Entgiftung von Xenobiotika und anderen schädlichen Substanzen bis zur Synthese von strukturellen Makromolekülen wie Lignin, Kutin und Suberin und anderen pflanzlichen Biopolymeren (Werck-Reichhart *et al.*, 2002; Schuler *et al.*, 2006).

Die Benennung der Cytochrom-P450-Monooxygenasen ist zurückzuführen auf die Absorptionsbande bei 450 nm in der Kohlenstoffmonoxid-gebundenen Form des Enzyms (P450 = Pigment absorbing at 450 nm).

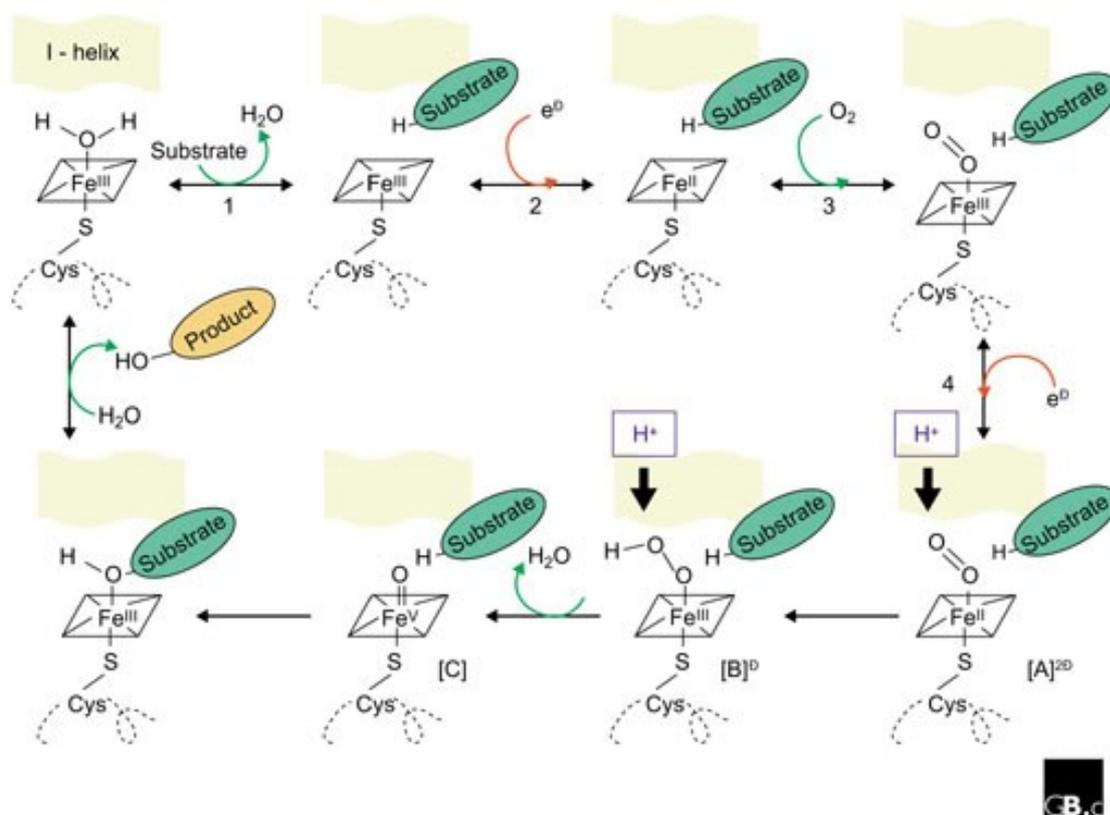


Abbildung 6: Katalytischer Mechanismus der Cytochrom-P450-Monooxygenasen

Häufigster Reaktionsmechanismus ist die Hydroxylierung (O-Insertion), vermittelt durch hochreaktive elektrophile Eisen (IV)-Sauerstoff-Intermediate (Enzymspezies [C]). Hydroxylierung kann auch durch elektrophile Insertion einer OH⁺-Gruppe in der Peroxoform des Enzyms katalysiert werden (Enzymspezies [B]). Nucleophile Attacken können durch die Enzymspezies [A]²⁻ und [B]⁻ katalysiert werden. Sauerstoff-freie Enzymspezies können Reduktionen, Isomerisierungen und Dehydrierungen katalysieren. (Nach Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000).

Aliphatische Monomere des Suberins und des Kutins sowie Bestandteile des Sporopollenins weisen häufig Hydroxylierungen oder Carboxylierungen in ω -Position aus. Die ω -Hydroxylierung von Fettsäuren ist eine der Schlüsselreaktionen in der Biosynthese von aliphatischen Zellwandpolymeren (Soliday und Kolattukudy, 1977). In heterologen Expressionsversuchen mit pflanzlichen P450-Monooxygenasen konnte gezeigt werden, dass Mitglieder der CYP86- und CYP94-Familie der P450-Monooxygenasen in der Lage sind, die Funktionalisierung des endständigen Kohlenstoffatoms von Fettsäuren zu katalysieren (Tijet *et al.*, 1998; Rupasinghe *et al.*, 2007). CYP94A1 aus *Vicia sativa* und CYP86A1 aus *Arabidopsis thaliana* waren die ersten *in vitro* charakterisierten pflanzlichen ω -Hydroxylasen (Benveniste *et al.*, 1998; Tijet *et al.*, 1998). Im Folgenden konnte für CYP86A1 eine *in vivo*-Funktion als ω -Hydroxylase von Suberinmonomeren der Kettenlänge C₁₆ und C₁₈ zugewiesen werden (Höfer *et al.*, 2008). CYP86A8/LACERATA (LCR) wurde als ω -Hydroxylase von Fettsäuren mit Beteiligung an der Kutinbiosynthese beschrieben. Korrespondierende *lcr knockout*-Mutanten zeigen, neben Aberrationen in der Zusammensetzung des Kutinpolymers, Fusionen der Blatt- und Blütenorgane und verdeutlichen die Bedeutung der Kutinmatrix für die Erhaltung der Organidentität (Wellesen *et al.*, 2001). CYP86A2 (ATT1) ist ebenfalls an der Kutinbiosynthese beteiligt und ist involviert in der Pathogenabwehr (Xiao *et al.*, 2004).

Neuere Studien konnten auch für Mitglieder der Familien CYP709, CYP704, CYP77 und CYP74 eine Aktivität in der Prozessierung von Fettsäuren nachweisen (Pinot und Beisson, 2011). Die Enzyme CYP77A6 und CYP86A4 katalysieren die Hydroxylierung von Fettsäuren in mittelständiger und endständiger Position der Kohlenstoffkette und sind beteiligt an der Bildung des Blütenkutins (Li-Beisson *et al.*, 2009). Die P450-Monooxygenasen CYP703A2 und CYP704B1 sind als ω -Hydroxylasen beteiligt an der Biosynthese des Sporopollenins (Morant *et al.*, 2007; Dobritsa *et al.*, 2009). Für weitere Mitglieder der genannten Cytochrom-P450 Familien, beispielsweise CYP94C1 aus *Arabidopsis thaliana* und CYP94A5 aus *Nicotiana tabacum*, konnte in Hefe-Mikrosomen-Assays eine katalytische Funktion als ω -Hydroxylase nachgewiesen werden (Le Bouquin *et al.*, 2001; Kandel *et al.*, 2007). Die *in vivo*-Funktion dieser Enzyme ist jedoch noch nicht aufgeklärt.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Apoplastische lipophile Biopolymere tragen entscheidend zum evolutionären Erfolg der höheren Pflanzen bei. Kutikuläre Ablagerungen schützen und imprägnieren oberirdische Pflanzenorgane, Suberinablagerungen in der Wurzel haben eine zentrale Funktion in der Regulation des Wasser- und Nährstoffhaushaltes der Pflanze und stellen eine Barriere gegen negative abiotische und biotische Stressfaktoren dar. Der Suberin-verwandte Polyester der Samenschale schützt den Embryo vor negativen Umwelteinflüssen und trägt somit entscheidend zum reproduktiven Erfolg von Pflanzen bei.

Im Gegensatz zur chemischen Struktur und biologischen Funktion von Polyester-basierten Zellwandpolymeren liegen bisher nur wenige Erkenntnisse über Biosynthese, Deposition und Quervernetzung dieser Biopolymere vor.

Erste Erkenntnisse der Zusammenhänge in der Biosynthese von Zellwandpolymeren konnten im Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* erlangt werden. Aufgrund des sequenzierten Genoms, der Verfügbarkeit einer großen Anzahl kommerziell erhältlicher Mutanten und der Etablierung von Techniken zur Isolation, Aufbereitung und Analyse von Kutin, Suberin und dem Polyester der Samenschale in *Arabidopsis* konnten hier erstmals molekulargenetische Ansätze mit analytischen Techniken zur Erforschung der Biosynthese dieser Polyester kombiniert werden (Franke *et al.*, 2005; Molina *et al.*, 2006).

In dieser Arbeit sollen in einem *reverse genetics* Ansatz weitere Gene, beziehungsweise Enzyme identifiziert werden, die an der Biosynthese dieser Zellwandpolymere beteiligt sind. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Biosynthese des Suberins der Wurzel und des Polyesters der Samenschale in *Arabidopsis thaliana*.

Aktuelle Untersuchungen zur Suberinbiosynthese weisen den P450-Monooxygenasen eine Schlüsselfunktion in der Formierung von aliphatischen oxygenierten Suberinmonomeren zu. Anhand von *in silico*-Datenbankrecherchen sowie detaillierten organspezifischen Expressionsstudien sollen hier weitere Kandidatengene der P450-Monooxygenasen und anderer an der Biosynthese von Suberin beteiligter Enzymfamilien identifiziert werden.

Durch molekularbiologische und physiologische Charakterisierung von *knockout* Mutanten der Kandidatengene soll die enzymatische Funktion der Genprodukte untersucht werden. Zeigt eine *knockout* Linie einen biochemischen Phänotyp in der Zusammensetzung des Polyesters, so können hier Rückschlüsse über die *in vivo*-Funktion des entsprechenden Genproduktes getroffen werden.

Durch Generierung und Charakterisierung von Doppelmutanten der Kandidatengene soll die Erkenntnis der biochemischen und enzymatischen Zusammenhänge in der Biosynthese von Zellwandpolymeren erweitert werden.

Durch die Erfassung der differentiellen Genexpression von Suberin-defizienten Pflanzenlinien sollen die Erkenntnisse der Suberinbiosynthese auf transkriptioneller Ebene erweitert werden.

Weiterhin soll mit Hilfe von physiologischen Stressexperimenten der Einfluss von veränderten Polyesterkompositionen auf den Wasser- und Nährstoffhaushalt der Pflanze und auf die Barriere- und Schutzeigenschaften des Suberinpolyesters hin untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) und Supelco (Bellefonte, USA) bezogen. Molekularbiologische Kits wurden, soweit nicht anders angegeben von den Firmen Macherey-Nagel (Düren, Deutschland), PEQLAB (Erlangen, Deutschland) und Invitrogen (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

2.2 Verwendetes Pflanzenmaterial

Der Großteil der Untersuchungen dieser Arbeit wurde an Pflanzen der Art *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, Ökotypus Columbia aus der Familie der Brassicaceae durchgeführt. Die Samen der hier untersuchten T-DNA-Insertionslinien (Alonso *et al.*, 2003) und deren korrespondierende Wildtypen wurden kommerziell aus dem *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC, Nottingham, England) bezogen oder aus diesen Samen propagiert. Die Samen der untersuchten Transposon-Insertionslinie (Tissier *et al.*, 1999) wurden aus der *John Innes Centre Sylvestre Marillonnet Line Collection* (John Innes Centre, Department of Molecular Genetics, Norwich, England) bezogen. Die T-DNA-Insertionsmutante *kcs17* wurde aus den Nachkommen der heterozygoten T-DNA-Insertionsmutantenlinie GK-128C11 propagiert (Nosbüsch, 2009). Die Samen der Linie GK-128C11 wurden ebenfalls über das NASC bezogen.

Die Anzucht der in dieser Arbeit untersuchten Reis-Linien (*Oryza sativa* ssp. *japonica*) erfolgte auf den Reisfeldern der Shanghai Jiaotong Universität (China).

2.3 Anzuchtsbedingungen

2.3.1 Anzucht auf Erde

Die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* erfolgte hier auf Anzuchterde (Floradur, Typ 1, Floragard, Oldenburg) in 10 x 10 cm Töpfen. Die Töpfe wurden auf einer Anzuchtschale platziert und in einer Klimakammer bei einer Lichtintensität von $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf Höhe der Rosettenblätter und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h bei einer mittleren Temperatur von 22 °C/20 °C kultiviert. Die Anzuchterde wurde vor Aussaat der Pflanzen ausreichend gewässert und mit Mineraldünger (Flory 3 Verde; Planta, Regenstauf) und einem systemischen Insektizid (Confidor WG70; Imidacloprid; Bayer CorpScience, Langenfeld) angereichert. Zur Synchronisation der Keimung wurden die Samen für 2 Tage bei 4 °C im Dunkeln in Leitungswasser stratifiziert und anschließend auf der Anzuchterde ausgesät. Zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit während des Keimungsprozesses wurden die Töpfe für 5 d mit einer durchsichtigen Plastikhaube abgedeckt. Eine Wässerung der Pflanzen erfolgte ein bis zwei Mal pro Woche durch Auffüllen der Anzuchtschale.

2.3.2 Anzucht in Hydrokultur

Die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* unter hydroponischen Bedingungen erfolgte nach dem Protokoll von Tocquin et al. (2003) in 6 l Containern mit Abdeckung unter den in 2.3.1 erwähnten Anzuchtbedingungen. Die Abdeckungen wiesen jeweils 14 Positionen für Samenhalterungen auf. Die Samenhalterungen wurden mit 0,65 % Agar befüllt und so in die Abdeckungen eingesetzt, dass in Kontakt mit der Nährlösung standen. Die Nährlösung (7.1) wurde als Konzentrat angesetzt und bei Gebrauch 50-fach verdünnt. Zur Synchronisation der Keimung wurden die Samen für 2 Tage bei 4 °C im Dunkeln in Leitungswasser stratifiziert. Pro Samenhalterung wurden 2 - 3 Samen eingesetzt. Das hydroponische System wurde zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit beim Keimungsprozess für 5 Tage mit einer Plastikhaube abgedeckt. Nach erfolgreicher Keimung wurde die Anzahl pro Samenhalterung auf einen Keimling reduziert. Ein Austausch der Nährlösung wurde wöchentlich durchgeführt.

2.3.3 Sterile Anzucht auf MS-Agar

Für die Durchführung einer sterilen Anzucht wurden die Samen zunächst oberflächensterilisiert. Bis zu 100 mg Samen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, mit 1 ml frischer Sterilisationslösung (7.1) versetzt und unter leichtem Schütteln für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Samen drei Mal in 100-prozentigem Ethanol gewaschen und verbliebenes Ethanol mit einer Pipette entfernt. Die Samen wurden im sterilen Luftstrom getrocknet und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei 4 °C steril aufbewahrt. Die oberflächensterilisierten Samen wurden auf MS Agar (Murashige und Skoog, 1962) (7.1) in Petrischalen ausgesät und unter den in 2.3.1 genannten Standardbedingungen angezogen. Zur Simulation unterschiedlicher abiotischer Stresssituationen wurde der verwendete MS-Agar bei Bedarf vor dem Autoklavieren mit weiteren Substanzen angereichert. Die Petrischalen wurden nach der Aussaat mit Parafilm® oder durchsichtigem Klebeband fixiert. Die Anzucht des Pflanzenmaterials erfolgte in der Klimakammer unter den bereits erwähnten Standard-Anzuchtbedingungen.

2.4 Kreuzungsexperimente

Der Modellorganismus der höheren dikotylen Pflanzen *Arabidopsis thaliana*, hat in molekulargenetischer Hinsicht neben den Vorteilen eines relativ kleinen, diploiden Genoms und einer kurzen Generationszeit eine hohe Tendenz zur Autogamie. Die Fortpflanzung in *Arabidopsis* erfolgt in der Regel durch Selbstbestäubung. Dies gewährleistet mit geringem Aufwand eine stabile Konservierung des Genotyps über Generationen.

Die Selbstbefruchtung basiert auf der zeitlichen Abfolge der Reifung der weiblichen und männlichen Geschlechtsorgane in der Blüte. Das weibliche Blütenorgan gelangt im geschlossenen Zustand der Blüte zur Reifung, wenn Frucht- und Staubblätter noch von den Petalen und Sepalen verhüllt werden. Im Laufe der Blütenreifung wachsen die pollentragenden Antheren durch Elongation der Filamente am Pistill vorbei. Die in den Antheren gebildeten Pollen reifen, werden freigegeben, geraten in Kontakt mit dem Stigma und bestäuben dieses. Die Selbstbestäubung ist abgeschlossen, bevor sich die Blüte geöffnet hat.

Um zwei oder mehrere unterschiedliche genetische Merkmalsausprägungen, beispielsweise Mutationen in zwei Genen, in einem Genom zu vereinigen, mussten Kreuzungsexperimente durchgeführt werden.

Hierfür wurden zwei genetisch unterschiedliche Pflanzenlinien zur gleichen Zeit auf Erde ausgesät und bis zur Blütenbildung unter Standardbedingungen angezogen.

Zur Durchführung einer Kreuzung mussten zunächst die Fortpflanzungsorgane der beiden unterschiedlichen Genotypen freigelegt werden. Zur Freilegung des Stempels des

Pollenempfängers wurden pro Pflanze 10 - 20 junge Blüten im geschlossenen Zustand ausgewählt. Alle umliegenden geschlossenen und offenen Blüten wurden mit einer Schere entfernt. Die ausgewählten, geschlossenen Blüten wurden unter einem Binokular platziert und unter Zuhilfenahme von zwei Präzisionspinzetten von den Sepalen, Petalen und unreifen Antheren befreit, der Stempel mit oben liegender Narbe freigelegt wurden.

Zur Bestäubung des freigelegten Stempels wurden offene, reife Blüten des zweiten Genotyps mit einer Schere von der Pflanze separiert. Auch hier wurden die Fortpflanzungsorgane der Blüte durch Abtrennen der Hüllblätter vorsichtig freigelegt. Beim Pollendonator musste eine Antherenreife stattgefunden haben. Reife Pollen sollten hier die Antheren als eine gelbliche Schicht bedecken. Die reifen Staubblätter wurden vorsichtig der Blüte entnommen und die darauf lokalisierten Pollen in Kontakt mit der Narbe des Pollenempfängers gebracht. Eine erfolgreiche Bestäubung war unter dem Binokular erkennbar, da die gelblichen Pollen auf der Narbe haften.

Die künstlich bestäubten Blüten wurden mit Klarsichtfolie umhüllt und fixiert um weitere, unerwünschte Bestäubung zu vermeiden. Bei erfolgreicher Durchführung wuchs der Stempel zu einer samentragenden Schote aus. Diese konnte nach der Samenreife geerntet und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen getrocknet werden. Bei einer erfolgreichen Befruchtung sollte die Tochtergeneration (F_1 Generation), aufgrund der Mendel'schen Gesetze, uniform heterozygot für beide Merkmale sein. Die Selektion homozygoter Doppelmutanten ist somit frühestens in der zweiten Filialgeneration (F_2) möglich (Mendel, 1866).

2.5 Identifikation potenzieller Kandidatengene der Suberinbiosynthese

Die Identifizierung von putativen Kandidatengenen der Suberinbiosynthese erfolgte durch die Auswertung unterschiedlicher Datenquellen.

Expressionsstudien an Suberin-synthetisierenden Geweben der Korkeiche (*Quercus suber*), namentlich dem Phellem (Soler *et al.*, 2007), dienten der Identifikation von an der Biosynthese von Suberin beteiligten Enzymfamilien.

Die Identifizierung potenzieller Kandidatengene der Biosynthese des Wurzelsuberins in *Arabidopsis thaliana* beteiligten Genprodukten erfolgte anhand von veröffentlichten Transkriptomanalysen von separierten Geweben der Wurzel (Birnbaum *et al.*, 2003; Brady *et al.*, 2007). Zellen der unterschiedlichen Gewebe der Wurzel wurden in diesem Versuchsansatz protoplastiert, isoliert und ihr Expressionsspektrum getrennt erfasst. Durch eine Auswertung der Expressionsdaten der endodermalen Zellfraktion unter Kenntnis der an der Suberinbiosynthese beteiligten Genfamilien aus Soler *et al.*, (2007) konnten hier potenzielle Kandidatengene ausgewählt und auf eine Endodermis-spezifische Expression hin überprüft werden.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde unter Verwendung der Koexpressions-Datenbank ATTED-II (*Arabidopsis thaliana trans-factor and cis-element prediction database*) (<http://atted.jp/>) (Obayashi *et al.*, 2007) das Genom nach Genen durchsucht, die mit bekannten, in der Suberinbiosynthese von *Arabidopsis* aktiven Genprodukten koreguliert, beziehungsweise koexprimiert waren. Die so identifizierten Gene wurden in Bezug auf ihre organ- und gewebespezifische Expression in *A. thaliana* mittels Datenbankanalyse untersucht. Die hierfür verwendeten Datenbanken *Arabidopsis eFP-Browser* (<http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) (Winter *et al.*, 2007) und das *GeneAtlas Tool* von *Genevestigator* (<https://www.genevestigator.ethz.ch/>) (Zimmermann *et al.*, 2004) sind ebenfalls Microarray-basiert und geben Auskunft über die organ-, gewebe- und entwicklungspezifische Expression des zu untersuchenden Gens in *Arabidopsis*.

2.6 Molekularbiologische Arbeiten

2.6.1 Extraktion genomischer DNA

Die Extraktion von DNA aus Pflanzenmaterial erfolgte, je nach Ausgangsmaterial, erwünschter Ausbeute und Qualität, mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen DNA-Extraktionskits (peqGold Plant DNA Mini Kit, PEQLAB, Erlangen) nach den Anweisungen des Herstellers oder mit Hilfe der CTAB DNA-Extraktionsmethode (2.6.1.1).

2.6.1.1 DNA-Präparation mit CTAB Extraktionsmethode

Etwa 50 mg Blattmaterial einer Pflanze wurden in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß in flüssigem N₂ schockgefroren und anschließend mit Hilfe eines vorgekühlten Mikropistills zerkleinert. Es wurden 100 µl 60 °C warmer CTAB-Isolationspuffer (7.1) zugegeben, erneut gemörsert und das Pflanzenmaterial für 30 min bei 60 °C unter gelegentlichem Rühren im Isolationspuffer inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben mit 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v) versetzt, gemischt und für 5 min bei 13500 rpm zentrifugiert. Die entstandene obere Phase wurde in ein neues, steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, zur Ausfällung der DNA mit 100 µl eiskaltem Isopropanol vermischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die ausgefällte DNA wurde durch eine Zentrifugation bei 13500 rpm für 5 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das DNA-haltige Pellet wurde mit 100 µl CTAB-Waschpuffer (7.1) versetzt, gevortext, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 5 min bei 13500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Waschvorgang wurde zwei Mal wiederholt. Das gereinigte Pellet wurde im Vakuumexsikkator getrocknet und in 50 µl TE-Puffer (7.1) bei 37 °C unter leichtem Schütteln resuspendiert.

2.6.2 Extraktion von RNA aus Pflanzenmaterial

Die Extraktion von RNA aus Pflanzenmaterial erfolgte, abhängig vom verwendeten Pflanzenmaterial, erwünschter RNA-Qualität und -Ausbeute mit Hilfe kommerziell erhältlicher RNA-Extraktionskits (NucleoSpin[®] RNA Plant, Macherey-Nagel, Düren; RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen, Hilden) nach den Anweisungen des Herstellers oder mittels der RNA-Extraktionmethode nach DeVries *et al.*, (1988).

Zur Darstellung der organspezifischen Expression der untersuchten Gene wurde RNA aus den Organen 4 Wochen alter Pflanzen des *Arabidopsis* Wildtyps aus Hydrokultur-Anzucht wie in 2.3.2 beschrieben, extrahiert. Die Pflanzen wurden dazu in ihre Organe Wurzel, Rosettenblatt, Stängel, Blüte und Schote aufgeteilt. Die Wurzel wurde weiterhin in einen apikalen Teil, einen mittleren Teil und einen basalen Teil untergliedert. Der apikale Abschnitt repräsentiert die ersten 15 mm ausgehend von der Wurzelspitze, der basale Abschnitt repräsentiert die im sekundären Stadium befindlichen 15 mm ausgehend von der Wurzelbasis. Der mittlere Teil repräsentiert eine Sektion von 15 mm Länge in der Mitte der Wurzel zwischen der apikalen und der basalen Region.

Die RNA-Konzentration der jeweiligen Lösung wurde wie in 2.6.3 beschrieben bestimmt und auf eine Konzentration von 100 ng/µl eingestellt.

2.6.2.1 Extraktion von RNA mit LiCl (DeVries *et al.*, 1988)

Für RNA-Extraktion wurden hier 500 mg Pflanzenmaterial unter Zugabe von flüssigem N₂ mit sterilem Mörser und Pistill zu einem Pulver zerkleinert und mit Hilfe eines Spatels in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 500 µl 80 °C warmem RNA-Extraktionspuffer (7.1) zum zerstoßenen Pflanzenmaterial wurde für 30 s gevortext, dann 250 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v) zugegeben und erneut für 30 s gemischt. Die Probe wurde bei Raumtemperatur für 5 min und 13000 rpm zentrifugiert und die obere, wässrige Phase in ein neues steriles, RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1 Volumen 4 M LiCl versetzt und für 30 s gemischt. Die Ausfällung der RNA erfolgte bei 4 °C über Nacht. Die ausgefällte RNA wurde durch Zentrifugation bei 4 °C und 13000 rpm für 20 min pelletiert und der Überstand abpipettiert. Das erhaltene Pellet wurde in 250 µl RNase freiem Reinstwasser resuspendiert und mit 25 µl 3 M Natriumacetat und 500 µl 100 % Ethanol versetzt und für 2 Stunden auf Eis gefällt. Die RNA wurde durch Zentrifugation bei 4 °C und 13000 rpm für 10 min pelletiert und das Pellet zunächst mit 70 % Ethanol, dann mit 100 % Ethanol gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet. Das gereinigte Pellet wurde in RNase freiem Reinstwasser resuspendiert und die RNA Lösung bei -80 °C bis zum Gebrauch gelagert.

Wurde eine DNA-Kontamination der RNA-Lösung festgestellt, so wurde die RNA-Lösung einem DNase-Verdau unterzogen. Der DNase-Verdau erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen DNase-Kit (DNase I; Fermentas, St. Leon-Rot) nach den Angaben des Herstellers.

2.6.3 Photometrische Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung

Um Aussagen über eine relative Expression in unterschiedlichen Pflanzenorganen bei der Durchführung organspezifischer Expressionsstudien treffen zu können, mussten die RNA-Konzentrationen der einzelnen Proben auf einen einheitlichen Wert normalisiert werden. Zu diesem Zweck wurde in einer Quarzglas-Küvette mit Hilfe eines Photometers die optische Dichte (OD) der jeweiligen RNA-Lösung bei 260 nm bestimmt. Durch Einbeziehung des jeweiligen Verdünnungsfaktors und einer von der Nukleinsäurespezies abhängigen Konstante konnte der Gehalt an Nukleinsäuren in der jeweiligen Lösung anhand von Formel 1 bestimmt werden. Der Reinheitsgrad der Nukleinsäurelösung konnte durch das Verhältnis OD_{260} zu OD_{280} bestimmt werden. Bei einem Quotienten von 1,5 - 2,0 liegt keine Verunreinigung durch Proteinkontaminationen vor.

Im Verlauf der Arbeit wurde die Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung mittels Photometer durch die Verwendung eines Nanodrop 2000c Spektrophotometers (Thermo Scientific®, Wilmington, USA) ersetzt. Nach erfolgter Konzentrationsbestimmung über die optische Dichte der Nukleinsäurelösung wurden die Lösungen durch Verdünnung mit RNase-freiem Reinstwasser auf eine einheitliche Konzentration von 100 ng/µl eingestellt. Die eingestellten RNA-Lösungen wurden durch Auftragung auf ein Agarosegel mit anschließender Elektrophorese (2.6.5) anhand ihrer Bandenintensität überprüft.

Formel 1: Berechnung der Nukleinsäure-Konzentration einer Lösung

c = Konzentration der Nukleinsäurelösung, OD_{260} = optische Dichte bei 260 nm,
V = Verdünnungsfaktor, F = Multiplikationsfaktor (50 für dsDNA, 40 für RNA)

$$c \left[\frac{\mu g}{ml} \right] = OD_{260} \times V \times F$$

2.6.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die in dieser Arbeit gezeigten Genotypisierungen mittels PCR (PCR = Polymerase Chain Reaction) (2.6.6) wurde eine kommerziell erhältliche *Tfi*-DNA-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet und die PCR nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und die Temperatureinstellungen des Thermocyclers bei *Tfi*-Polymerase-katalysierter PCR sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 aufgeführt.

Bei der Amplifikation der in der Klonierung eingesetzten DNA-Sequenz (2.7.1) wurde aufgrund der enthaltenen Korrekturlesefunktion die Platinum® *Pfx*-DNA-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die Zusammensetzung dieses Reaktionsansatzes und die Temperatureinstellungen des Thermocyclers sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 zusammengefasst. Alle PCRs wurden in einem Primus 96 advanced Thermocycler (PEQLAB, Erlangen) durchgeführt.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes bei PCR mit Platinum®-*Pfx*-DNA-Polymerase

Volumen [μ l]	Reagenz	Ausgangskonzentration
2,50	PCR-Reaktionspuffer	10 x konzentriert
1,50	MgSO ₄	25 mM
0,50	dNTP's	10 mM
0,25	<i>forward</i> Primer	50 pmol/ μ l
0,25	<i>reverse</i> Primer	50 pmol/ μ l
0,25	Platinum® <i>Pfx</i> DNA Polymerase	2,5 U/ μ l
18,75	Reinstwasser	
1,00	Template RNA	

Tabelle 2: Temperaturprogramm des Thermocyclers bei Durchführung einer PCR mit Platinum®-*Pfx*-DNA-Polymerase

Reaktionsschritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer
Initiale Denaturierung	94	5 min
PCR-Amplifikation (25-35 Zyklen)	Denaturierung	15 s
	Hybridisierung	primerabhängig
	Elongation	68
Finale Elongation	68	1 min/Kbp
		5 min

2.6.5 Gelelektrophorese

Die hier verwendeten Agarosegele wurden in einer Konzentration von 1 % Agarose (Carl Roth, Karlsruhe) in TAE-Puffer angesetzt und zur Visualisierung von Nukleinsäurefragmenten unter UV-Licht mit 0,05 % Ethidiumbromid versetzt. Für die Gelelektrophorese wurden die jeweiligen PCR- und RT-PCR-Reaktionsansätze mit einer entsprechenden Menge 6 x Gelladepuffer (7.1) versehen und aufgetragen. Zur Kontrolle der Fragmentgrößen wurde bei erwarteten Fragmentgrößen < 5 Kbp eine 100 bp DNA-Leiter (Extended; Carl Roth, Karlsruhe), bei Fragmentgrößen > 5 Kbp eine 1 Kbp Leiter (Carl Roth, Karlsruhe) parallel aufgetragen. Die Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten erfolgte bei einer elektrischen Spannung von 80 V und einer Stromstärke von 150 mA. Nach erfolgter Auftrennung wurden die Agarosegele unter UV-Licht fotografiert.

2.6.6 Genotypisierung mittels kompetitiver PCR

Eine Genotypisierung potenzieller Insertionsmutanten erfolgte mittels kompetitiver Polymerase-Kettenreaktion. In einem kompetitiven PCR-Ansatz werden dem PCR-Reaktionsgemisch drei Primer zugegeben. Zwei Primer sind genspezifisch und flankieren den postulierten Insertionsort auf der genomischen DNA, ein dritter Primer bindet spezifisch an eine auf der Insertion befindliche DNA-Sequenz. Wie in Abbildung 7 dargestellt, wurden die Primer-Bindestellen so gewählt, dass im Falle einer vorhandenen Insertion im entsprechenden Gen ein kleineres PCR-Produkt gebildet wird als im Falle einer nicht erfolgten Insertion. Durch die angelegten Versuchsbedingungen können alle möglichen Allelkombinationen (*WILDTYP/WILDTYP*, *WILDTYP/mutante* und *mutante/mutante*) in einem PCR-Ansatz dargestellt werden. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und die Temperatureinstellungen des Thermocyclers bei Durchführung einer kompetitiven PCR sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 vermerkt.

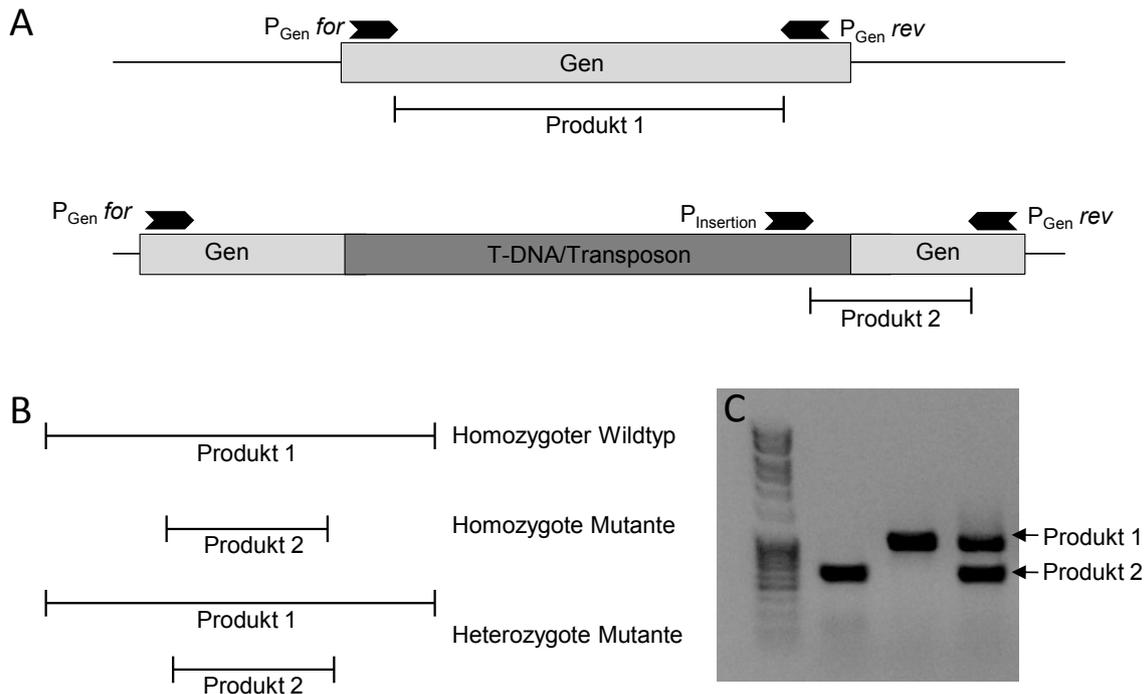


Abbildung 7: Funktionsprinzip einer kompetitiven PCR

(A) Schematische Darstellung des Genloci des Wildtyps und einer Insertionsmutante mit den genspezifischen Genotypisierungsprimern P_{Gen}^{for} und P_{Gen}^{rev} , dem insertionsspezifischen Primer $P_{Insertion}$ und den dazugehörigen PCR-Produkten. (B) Schematische Darstellung der PCR-Produkte unterschiedlicher Allelkombinationen eines homozygoten Wildtyps, einer homozygoten Insertionsmutante und einer heterozygoten Pflanzenlinie. (C) Darstellung der drei möglichen Allelkombinationen auf einem Elektrophoresegel bei Genotypisierung mittels kompetitiver PCR

Tabelle 3: Reaktionsansatz einer kompetitiven PCR mit *Tfi*-DNA-Polymerase

Volumen [μ l]	Reagenz	Ausgangskonzentration
5,00	PCR-Reaktionspuffer	5 x konzentriert
0,75	MgCl ₂	50 mM
0,50	dNTP's	10 mM
0,25	Genspezifischer <i>forward</i> Primer	50 pmol/ μ l
0,25	Genspezifischer <i>reverse</i> Primer	50 pmol/ μ l
0,25	Insertionsspezifischer Primer	50 pmol/ μ l
0,25	<i>Tfi</i> -Polymerase	5 U/ μ l
16,75	Reinstwasser	
1,00	template DNA	

Tabelle 4: Temperaturprogramm des Thermocyclers für eine kompetitive PCR

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Dauer
Initiale Denaturierung	94	3 min
PCR-Amplifikation (25-35 Zyklen)	Denaturierung	94
	Hybridisierung	primerabhängig
	Elongation	72
Finale Elongation	72	1 min/Kbp
		10 min

2.6.7 Reverse Transkriptase – Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RNA für organspezifische Expressionsstudien sowie RNA von Keimlingen zum Nachweis eines *knockouts* auf transkriptioneller Ebene wurden wie in (2.6.2) beschrieben isoliert. Die RT-PCR-Reaktionen wurden mit Hilfe des kommerziell erhältlichen SuperScript™ III One-Step RT-PCR Systems mit Platinum® Taq-Polymerase (Invitrogen) in einem Primus 96 advanced Thermocycler (PEQLAB, Erlangen) durchgeführt. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches und das Temperaturprogramm des Thermocyclers sind Tabelle 5 und Tabelle 6 zu entnehmen. Nach der Durchführung der RT-PCR wurden die Proben wie in 2.6.5 beschrieben mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und ausgewertet.

Tabelle 5: Zusammensetzung eines RT-PCR-Reaktionsansatzes

Volumen [µl]	Reagenz	Ausgangskonzentration
12,50	RT-PCR Reaktionspuffer	2 x konzentriert
0,50	forward Primer	50 pmol/µl
0,50	reverse Primer	50 pmol/µl
1,00	SuperScript™ III RT/Platinum® Taq Mix	5 U/µl
10,00	Reinstwasser	
1,50	Template RNA	100ng/µl

Tabelle 6: Temperaturprogramm bei Durchführung einer RT-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Dauer
cDNA-Synthese	55	30 min
Initiale Denaturierung	94	3 min
PCR-Amplifikation (25-35 Zyklen)	Denaturierung	94
	Hybridisierung	primerabhängig
	Elongation	68
Finale Elongation	68	1 min/Kbp
		5 min

2.7 Generierung transgener *Arabidopsis thaliana*

Ziel des Versuchs war die Herstellung eines Fusionskonstruktes aus dem nativen Protein CYP86B1 und dem Reporter-gen GFP (Green Fluorescent Protein = Grün fluoreszierendes Protein) unter dem nativen Promotor $PROM_{CYP86B1}$ und die Einbringung dieses Konstruktes in *Arabidopsis thaliana*. Die Markierung des nativen Proteins mit GFP diente der Aufklärung der gewebespezifischen Lokalisation des funktionellen Proteins CYP86B1.

Die Klonierungen wurden mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Gateway[®]-Systems (Invitrogen, Darmstadt) durchgeführt. Das Gateway[®]-System stellt eine Rekombinationsbasierte Klonierungs-Technologie dar, welche auf dem sequenzspezifischen Rekombinationssystem des Bakteriophagen Lambda (λ -Phage) in *Escherichia coli* beruht. Bei lysogenem Verhalten integriert der λ -Phage seine DNA in das Genom des Wirtsorganismus *E. coli*. Diese Reaktion wird von Rekombinasen katalysiert, welche spezifische Sequenzen, sogenannte *att*-Sequenzen (*attachment sites*), erkennen und dort eine richtungsspezifische Rekombination katalysieren. Durch gentechnische Modifikation des Rekombinationssystems des λ -Phagen wird eine sehr hohe Rekombinationseffizienz erreicht. Die Gateway Technologie ermöglicht ein effizientes Einbringen von Gensequenzen in Vektoren und einen effizienten Austausch von Gensequenzen zwischen verschiedenen Vektoren, die spezifische *att*-Sequenzen aufweisen. Das Gateway-System ist mehrstufig und erfordert zunächst die Einbringung des gewünschten DNA-Abschnittes in einen Donorvektor unter Ausbildung eines sogenannten *entry clone*. Das *entry clone*-lokalisierte DNA-Fragment kann durch einen weiteren Rekombinationsschritt in einen Zielvektor eingebracht werden und einen *expression clone* bilden, welcher als Transformationsvektor genutzt wird. Die einzelnen Rekombinationsreaktionen bis zur Erstellung eines *expression clone* sind in Abbildung 8 und Abbildung 10 schematisch dargestellt.

Die Selektion positiver Transformanten ist zweistufig. Die erste Selektion erfolgt durch das auf dem nativen, nicht transformierten Vektor lokalisierte *ccdB*-Gen, welches ein "Selbstmordgen" darstellt und bei Vorhandensein zum Absterben der Bakterienzelle führt. Bei erfolgreicher Rekombination wird dieses Selbstmordgen durch die eingebrachte Sequenz ersetzt. Eine weitere Selektion wird gewährleistet durch eine Plasmid-vermittelte Antibiotikaresistenz. Der Donorvektor sowie der Zielvektor sind mit Resistenzgenen ausgestattet.

2.7.1 Herstellung eines *entry clone*

Zur Einbringung eines Gens in einen *entry clone* musste das Gen zunächst in einer PCR-Reaktion amplifiziert und mit flankierenden *attB*-Sequenzen an den Enden versehen werden. Die Verknüpfung der *attB*-Sequenzen mit dem DNA-Produkt erfolgte durch die Verwendung spezieller Primer. Ausschließlich die 3'-Region des jeweiligen Primers ist genspezifisch und bindet an die gewünschte DNA-Sequenz, während die 5'-Region des Primers über Gateway-Adapter verfügt. Die Gateway-Adapter stellen *attB* Schnittstellen dar und flankieren das PCR Produkt nach der PCR-Amplifikation. Für die hier durchgeführte PCR wurde eine DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion (Platinum® *Pfx*-DNA-Polymerase; Invitrogen, Darmstadt) wie in 2.6.4 beschrieben verwendet. Das PCR-Produkt wurde einer Gelelektrophorese (2.6.5) unterzogen. Die Produktbande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und das PCR-Produkt mittels Gelelution aus dem Agarosegel isoliert. Die Gelelution erfolgte mit Hilfe des Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systems (Promega; Mannheim) nach den Angaben des Herstellers. Das *attB*-flankierte PCR-Produkt wurde nun mittels einer so genannten BP-Rekombinationsreaktion in einen mit *attP*-Schnittstellen versehenen Donorvektor (pDONR™/Zeo) eingebracht. Die Rekombination zwischen *attB*- und *attP*-Schnittstellen wurde mit dem Gateway® BP clonase™ Enzymmix (Invitrogen; Darmstadt) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt. Der *entry clone* wurde wie in 2.7.3 beschrieben, mittels Hitzeschock in *E. coli* eingebracht und vervielfältigt. Glycerinstocks einer Auswahl von positiv selektionierten Transformanten wurden wie in 2.7.6 beschrieben angelegt. Das Produkt der BP-katalysierten Rekombination, der *entry clone* ist in Abbildung 9 gezeigt.



Abbildung 8: Schematische Darstellung der BP-Rekombinationsreaktion des Gateway-Systems
 Ein *attB* flankiertes DNA-Fragment wird BP-Clonase-katalysiert in den Donorvektor unter Ausbildung eines *entry clones* und eines Nebenproduktes inseriert. donor vector = pDONR/zeo; *attB*, *attP*, *attL*, *attR* = Rekombinationsschnittstellen; *ccdB* = DNA-Gyrasegen zur Selektionierung positiver Transformanten

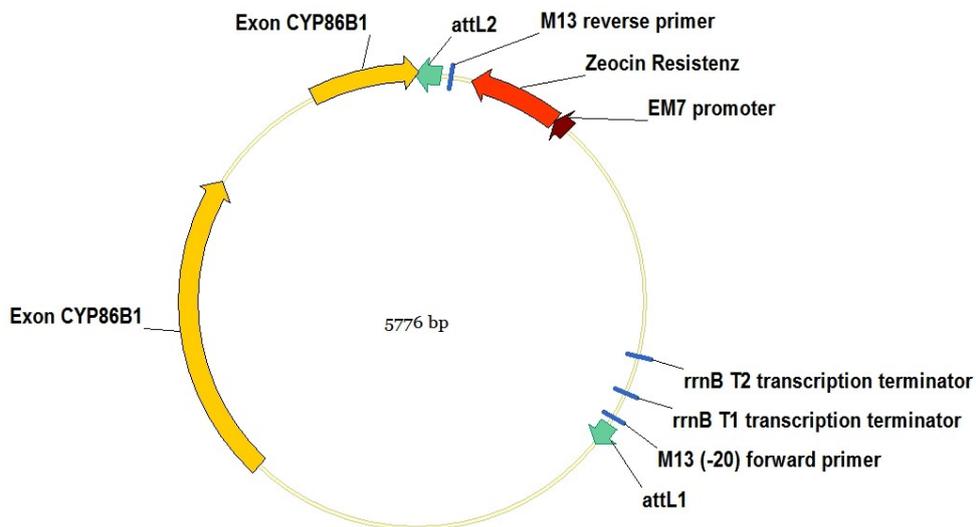


Abbildung 9: Vektorkarte des *entry clones* aus dem *entry vector* pDONR/Zeo und dem Konstrukt *Prom_{CYP86B1}-CYP86B1*

Legende der Vektorbeschriftung:

attL1 und *attL2* = *attachment sites* Erkennungsmotive der Rekombinase

M13 Forward Primer und M13 (-20) Reverse Primer = Primerbindestellen für Sequenzierungsprimer

Zeocin Resistenz = Resistenzgen gegen das Antibiotikum Zeocin

EM7 promoter = Bakterieller Promotor

rrnB T1 und *rrnB T2* = Transkriptionsterminatoren

2.7.2 Herstellung eines *expression clone*

Der in 2.7.1 hergestellte *entry clone* wurde in eine weitere Rekombinationsreaktion eingesetzt mit dem Ziel, die in der BP-Reaktion eingebrachte DNA-Sequenz auf den finalen Transformationsvektor unter Ausbildung eines *expression clones* zu übertragen. Die Einbringung dieser DNA Sequenz mittels LR-Rekombinationsreaktion wird durch ein zweites Set an Enzymen katalysiert, die im Gateway® LR clonase™ Enzymmix (Invitrogen; Darmstadt) zusammengefasst. Die LR-Rekombinationsreaktion ist in Abbildung 10 schematisch dargestellt. Die Übertragung der DNA-Sequenz in den Transformationsvektor verläuft nach dem gleichen Prinzip wie die in 2.7.1 beschriebene BP-Reaktion und vermittelt eine Rekombination zwischen den *attL* Schnittstellen des *entry clones* und den *attR*-Schnittstellen des Zielvektors. Als Zielvektor für das *Prom_{CYP86B1}-CYP86B1-GFP* Fusionskonstrukt diente pMDC111 (Curtis und Grossniklaus, 2003). Eine Darstellung des *expression clones* ist in Abbildung 11 dargestellt. Auch hier erfolgte eine Amplifikation des *expression clones* durch Transformation und Kultivierung von *E. coli*, wie in 2.7.3 beschrieben. Die Selektion erfolgte über das bei nicht erfolgter Rekombination in *E. coli* eingebrachte *ccdB* Gen sowie durch die plasmidvermittelte Kanamycinresistenz. Bei nicht transformierten *E. coli* fand somit kein Wachstum auf LB Agar mit 50 µg/ml Kanamycin statt. Die Isolation der Plasmide aus *E. coli* und die Kontrolle der Plasmide mittels Restriktionsverdau erfolgte wie in 2.7.5 beschrieben. Glycerinstocks einer Auswahl von positiv selektionierten Transformanten wurden wie in 2.7.6 beschrieben angelegt.

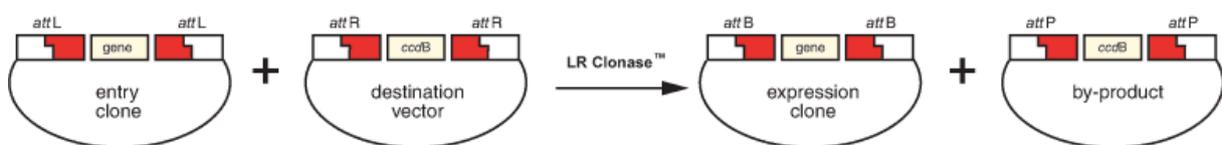


Abbildung 10: Schematische Darstellung der LR-Reaktion des Gateway-Rekombinationssystems

Das *attL* flankierte DNA-Fragment des *entry clones* wird LR-Clonase-katalysiert in den Destinationsvektor unter Ausbildung eines *expression clones* und eines Nebenproduktes inseriert. *destination vector* = pMDC111; *attL*, *attR*, *attB*, *attP* = Rekombinationsschnittstellen; *ccdB* = DNA-Gyrasegen zur Selektionierung positiver Transformanten

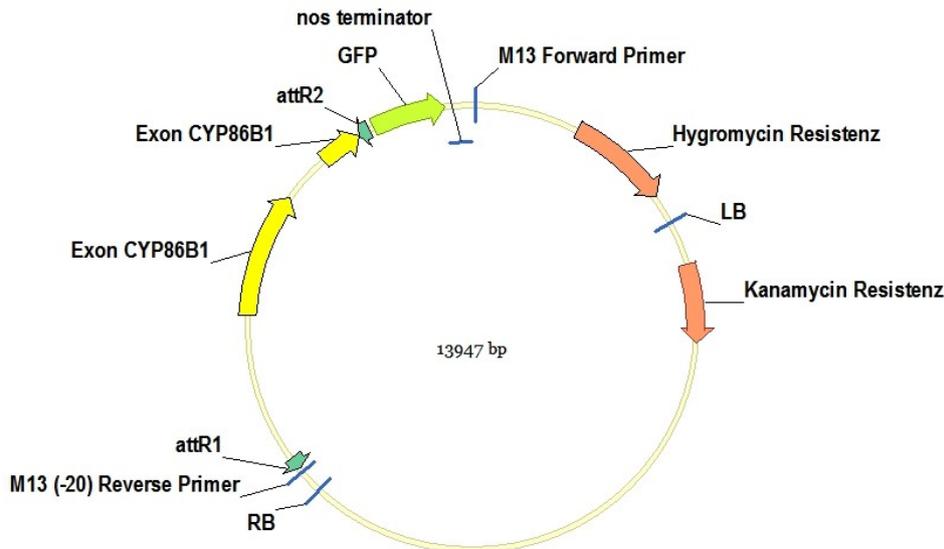


Abbildung 11: Vektorkarte des *expression clones* aus dem Destinationsvektor pMDC111 und dem Konstrukt *Prom_{CYP86B1}-CYP86B1*

Legende der Vektorbeschriftung:

attR1 und attR2 = *attachment sites* Erkennungsmotive der Rekombinase

M13 Forward Primer und M13 (-20) Reverse Primer = Primerbindestellen für Sequenzierungsprimer

Hygromycin Resistenz = Resistenzgen gegen das Antibiotikum Hygromycin

Kanamycin Resistenz = Resistenzgen gegen das Antibiotikum Kanamycin

RB, LB = Sequenzmotive für *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte *Arabidopsis* Transformation

GFP = Grün Fluoreszierendes Protein

Nos terminator = Transkriptionsterminator

2.7.3 Transformation von *Escherichia coli* und Selektion positiver Transformanten

200 µl chemisch kompetenter *E. coli* des Stammes *DH5α* wurden auf Eis mit 10 ng Plasmid in ein 15 ml Reaktionsgefäß gegeben und vorsichtig gemischt. Die Bakteriensuspension wurde für 30 min in Eiswasser inkubiert und dann für 30 s einem Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad ausgesetzt. Die Bakteriensuspension wurde erneut in Eiswasser überführt und dort für weitere 5 min inkubiert. Anschließend wurden der Suspension 800 µl SOC-Medium (7.1) zugegeben und die Lösung wurde für 1 h bei 37 °C und 220 rpm im Schüttler inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde in 10 µl, 100 µl und ~890 µl aliquotiert und auf LB-Agar ausgestrichen. Zur Selektion positiver Transformanten wurde dem LB-Agar 50 µg/ml Zeocin (Invitrogen, USA) bei Transformation mit dem *entry clone*, beziehungsweise 50 µg/ml Kanamycin bei Transformation mit dem *expression clone* zugegeben. Die angeimpften LB-Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Positiv transformierte *E. coli* konnten über die Plasmid lokalisierte Antibiotikaresistenz selektioniert werden. Positiv selektionierte *E. coli* wurden in 5 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Zeocin (*entry clone*), beziehungsweise Kanamycin (*expression clone*) angeimpft und über Nacht kultiviert. Ein Teil der Flüssigkultur wurde zur Langzeitlagerung als Glycerin-Stock eingefroren (2.7.6). Die restliche Bakterienkultur wurde für die Plasmidisolierung verwendet.

2.7.4 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

200 µl einer Bakteriensuspension chemisch kompetenter *A. tumefaciens* Zellen des Stammes GV3101pMP90 wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und vorsichtig mit 1 µg des verifizierten *expression clones* aus 2.7.2 vermengt. Die Suspension wurde für 5 min in Eiswasser und anschließend für 5 min in flüssigem N₂ inkubiert und dann für 5 min einem Hitzeschock bei 37 °C ausgesetzt. Die Bakteriensuspension wurde anschließend mit 1 ml LB Medium versehen und für 3 h bei 28 °C und 300 rpm im Schüttler inkubiert. Zur Selektion positiver *A. tumefaciens* Transformanten wurden 20 µl und 200 µl Aliquots dieser Lösung auf LB-Agar mit Rifampicin (10 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) ausgestrichen. Die Agarplatten wurden für 48 h bei 28 °C inkubiert.

2.7.5 Isolation und Sequenzierung von Plasmiden

Die Isolation von Plasmiden aus *E. coli* und *A. tumefaciens* erfolgte mit Hilfe des Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification Systems (Promega, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers. Zur Kontrolle der hergestellten Plasmide wurden diese einem Restriktionsverdau unterzogen. Jedes Plasmid wurde mit mehreren Restriktionsendonukleasen verdaut. Der Reaktionsansatz eines Restriktionsverdau ist Tabelle 7 zu entnehmen und erfolgte bei der für das gegebene Restriktionsenzym optimalen Temperatur für 1 h. Die Proben wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die Bandengrößen registriert und analysiert.

Durch Restriktionsverdau positiv identifizierte *entry clones* wurden extern durch die Firma *4base lab* (Reutlingen, Deutschland) sequenziert. Die Sequenzierung wurde durch die Primerkombination M13 *Forward* und M13 *Reverse* (7.2) vermittelt.

Tabelle 7 Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes

Volumen [µl]	Reagenz
4	Plasmid
1	10 x Reaktionspuffer
0,5	Restriktionsenzym
4,5	Reinstwasser

2.7.6 Anlegung von Glycerinstocks zur Lagerung von Klonen

Von allen angefertigten bakteriellen Klonen wurden zur Langzeitlagerung Glycerinstocks angelegt. Von einer Flüssigkultur wurden nach Inkubation 700 µl der Bakteriensuspension mit 300 µl wässrigem, sterilem Glycerin (50 % v/v) versetzt und in flüssigem N₂ schockgefroren. Die Glycerinstocks wurden bei -80 °C gelagert.

2.7.7 Transformation von *Arabidopsis* mit *Agrobacterium tumefaciens*

Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* mit dem Bakterium *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte mittels "Floral Dip", einer für *Arabidopsis* entwickelte Transformationsmethode, bei der die Blütenorgane der Pflanze zur Transformation der Samenanlagen in eine aufbereitete Suspension von *A. tumefaciens*-Zellen getaucht werden (Clough und Bent, 1998).

2.7.7.1 Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* für "Floral Dip"

10 ml LB-Medium, versehen mit Rifampicin (10 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml), wurden in einen 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane mit einer isolierten Kolonie transformierter *A. tumefaciens* inokuliert. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 28 °C und 170 rpm im Schüttler inkubiert und zum animpfen der Hauptkultur verwendet. Hier wurden 300 ml LB-Medium mit Rifampicin (10 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) mit der Vorkultur angeimpft und auf zwei 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane verteilt. Die Hauptkultur wurde über Nacht bei 28 °C und 170 rpm im Schüttler inkubiert.

2.7.7.2 Transformation von *Arabidopsis* mittels "Floral Dip"

Die in 2.7.7.1 hergestellte *A. tumefaciens* Hauptkultur wurde auf sechs 50 ml Zentrifugationsgefäße verteilt und für 15 min bei 5000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in je 35 ml Inokulationsmedium (7.1) resuspendiert und in einem ausreichend großen Becherglas vereinigt. Zur Transformation wurden 4 Wochen alte, gesunde Pflanzen des *Arabidopsis* Wildtyps verwendet. Im Alter von drei Wochen waren diesen Pflanzen die primären Infloreszenzen entfernt worden. Hierdurch wurde die Ausbildung einer erhöhten Anzahl von Sprossachsen induziert und die Anzahl der Blüten pro Pflanze erhöht. Zur Transformation wurden 6 Töpfe mit je 5 Pflanzen verwendet. Die Infloreszenzen wurden kopfüber zwei Mal für jeweils 10 s in Inokulationssuspension getaucht und in eine mit Plastikfolie bedeckte Anzuchtschale gelegt. Die Anzuchtschale wurde mit einem transparenten Autoklavierbeutel umhüllt. Zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit wurde Leitungswasser versprüht und die Beutel verschlossen. Nach 3 Tagen wurden die Pflanzen aus dem Beutel entnommen und in der Klimakammer aufgestellt und unter Standardbedingungen bis zur vollständigen Schotenentwicklung und Samenreifung angezogen. Die geernteten Samen wurden nach Reifung und Trocknung auf MS-Platten (7.1) mit 30 µg/ml Hygromycin ausgesät und positive Transformanten selektioniert.

2.8 Erfassung der differentiellen Genexpression von Suberinmutanten mittels Microarray

Der hier durchgeführte cDNA-Microarray diente der Erfassung der differentiellen Genexpression von Pflanzenlinien, in denen die Biosynthese des Wurzelsuberins durch Insertionsmutation beeinträchtigt ist. Es sollte auf transkriptioneller Ebene untersucht werden, welche Maßnahmen von der Pflanze als Reaktion auf eine eingeschränkte Suberinbiosynthese eingeleitet werden um eventuell veränderte Barriereigenschaften des Suberins zu kompensieren.

Da die Biosynthese und Ablagerung von Suberin in der Wurzel auf bestimmte Gewebe beschränkt sind, sollte ein möglichst begrenzter Teil der Wurzel, in dem hohe Suberin-Biosyntheseraten zu erwarten sind für die Erfassung der differentiellen Genexpression verwendet werden. Hierfür wurde an Querschnitten primärer *Arabidopsis* Wurzeln histochemisch bestimmt, in welchen Entwicklungsstadien die Ablagerung von lamellarem Suberin in den apoplastischen Regionen der Endodermis stattfindet. Es wurden Querschnitte von primären Wurzelbereichen von 3 – 4 Wochen alten, in Hydrokultur angezogenen Pflanzen wie in 2.9 beschrieben angefertigt und mit Sudan 7B angefärbt.

2.8.1 Isolation von RNA zur Durchführung eines Microarrays

Die Probennahme erfolgte an Pflanzen im Alter zwischen 21 und 28 Tagen aus Hydrokulturanzucht. Jeweils eine Pflanze wurde aus der Hydrokultur entnommen und ihr Wurzelsystem während der Probennahme in einer Petrischale mit *Arabidopsis* Hydrokultur Nährlösung (7.1) aufbewahrt.

Mit einer Mikroschere wurden nacheinander je 20 Wurzeln vom Wurzelsystem der Pflanze abgetrennt und mit Hilfe eines weichen Pinsels auf einem markierten Objektträger nebeneinander an der Wurzelspitze ausgerichtet. Anschließend wurde der Bereich zwischen 10 mm und 25 mm Entfernung zur Wurzelspitze mit einer gereinigten Rasierklinge vom Rest der Wurzel isoliert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, direkt in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Um ausreichende Probenmengen zu erhalten, wurde dieser Ablauf 15 Mal wiederholt und die einzelnen Teilproben während der RNA-Extraktion vereinigt. Die RNA-Extraktion erfolgte wie in 2.6.2 beschrieben mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen RNA-Extraktionsansatzes (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen; Hilden) nach den Angaben des Herstellers.

Die Qualitätskontrolle der RNA-Extrakte, die Durchführung des Microarrays und die Qualitätskontrolle der erhaltenen Datensätze erfolgte durch die Firma imaGenes (imaGenes GmbH; Berlin).

2.9 Histologische und Anatomische Studien

Alle hier durchgeführten mikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Axioplan Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) durchgeführt und mit einer Nikon DXM-1200 Digitalkamera (Nikon, Düsseldorf) fotografisch festgehalten.

2.9.1 Anfertigung von Wurzelquerschnitten mit dem Gefriermikrotom

Ganze Wurzeln von Pflanzen aus Hydrokulturanzucht oder aus steriler Anzucht auf MS-Agar wurden vorsichtig mit Leitungswasser gewaschen und in Fixierlösung (7.1) überführt. Die Inkubationszeit in Fixiermedium betrug mindestens 48 h. Nach der Fixierung wurden Teile der Wurzel vom Wurzelsystem abgetrennt und in Neg-50-Einbettmedium (Richard-Allen Scientific; Kalamazoo, USA) ausgerichtet. Das Einbettmedium wurde bei -25 °C ausgehärtet und auf dem Präparathalter fixiert. mit Hilfe eines Mikrotom-Kryostats (Microm HM 500 M; Microm International, Walldorf) wurden 15 µm Dünnschnitte angefertigt, auf einen Objektträger überführt und gegebenenfalls histochemisch aufgearbeitet. Anschließend wurden die Querschnitte in 75 % Glycerin (v/v) mikroskopisch untersucht.

2.9.2 Histochemischer Nachweis von Suberinlamellen mit Sudan 7B

Zur Herstellung der Sudan 7B-Färbelösung (7.1) wurde zunächst eine 0,1 % (w/v) Lösung Sudan 7B (Sigma-Aldrich; Steinheim) in Polyethylenglykol-400 (PEG-400; Carl Roth; Karlsruhe) angesetzt und für 1 h auf 90 °C erhitzt. Anschließend wurde die PEG-Färbelösung im Verhältnis 1:1 (v/v) mit 90 % Glycerin gemischt (Brundrett *et al.*, 1991).

Zur histochemischen Anfärbung von Dünnschnitten wurden diese auf einen Objektträger überführt und für 1,5 bis 3 h bei Raumtemperatur in wenigen Tropfen der Färbelösung inkubiert. Die Färbelösung wurde vorsichtig mit Hilfe von Zellstoff abgesaugt oder mit einer Pipette abgenommen. Die Dünnschnitte wurden auf dem Objektträger zwei Mal mit Wasser gewaschen, dann in 75 % Glycerin aufgenommen, mit einem Deckgläschen versehen und unter dem Mikroskop observiert.

2.10 Analytische Untersuchungen

2.10.1 Extraktion kutikulärer Wachse von Antheren

3 – 5 mg gefriergetrocknete Antheren von *Oryza sativa* wurde in vorgereinigten Glasgefäßen für 1 min mit 700 µl Chloroform versetzt und der Extrakt anschließend in ein neues Glasgefäß überführt. Der Chloroformextrakt wurde mit 10 µg Tetracosan (C₂₄ Alkan) als internem Standard versehen, im N₂-Strom auf etwa 200 µl eingengt, wie in 2.10.7 beschrieben derivatisiert und anschließend gaschromatografisch untersucht (2.10.8).

2.10.2 Totalextraktion von Antheren

Die in 2.10.1 verwendeten Reis Antheren wurden hier weiter verwendet zur Bestimmung der Zusammensetzung des Kutinpolyesters der Reis Antheren. Zur vollständigen Extraktion von löslichen Lipiden wurde jede Parallele mit 1 ml Chloroform/Methanol (50:50 v/v) versetzt und über mehrere Tage auf einer Rollbank inkubiert. Dieser Arbeitsschritt wurde weitere 4 Mal wiederholt. Anschließend wurde das Antherenmaterial aus dem Lösungsmittel entnommen und zunächst unter dem Abzug, anschließend im Exsikkator für mehrere Tage getrocknet und das Trockengewicht mit einer Feinwaage bestimmt. Die Monomere des Kutinpolymers wurden in einer Umesterungsreaktion freigesetzt (2.10.6), mit 10 µg Dotriacontan (C₃₂ Alkan) als internem Standard versehen, derivatisiert (2.10.7) und gaschromatografisch analysiert (2.10.8).

2.10.3 Korrelation des Oberflächen/Gewichts-Verhältnisses von Antheren

Die Bestimmung des Oberflächen/Gewichtsverhältnisses von Reis Antheren erfolgte über die Bestimmung der Pixelanzahl in mikroskopischen Bildern ganzer Antheren. Eine bestimmte Anzahl von Antheren wurde mittels Feinwaage eingewogen und die Umrisse der Antheren mit geeigneten Größenmarkern unter einem Axioplan Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) mit einer Nikon DXM-1200 Digitalkamera (Nikon, Düsseldorf) fotografisch festgehalten. Mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms Photoshop® (Adobe®; San Jose, USA) wurde die Anzahl der Pixel des zweidimensionalen Abbildes der Antheren bestimmt. Unter Annahme einer annähernd zylindrischen dreidimensionalen Form der Antheren wurde die Anzahl der Pixel des zweidimensionalen Bildes mit π multipliziert. Unter Kenntnis der Vergrößerung des mikroskopischen Bildes konnte die errechnete Pixelzahl nun in eine Flächeneinheit (mm²) umgerechnet werden. Zur Erstellung einer Korrelation wurden die hier beschriebenen Schritte mit einer ansteigenden Anzahl von Antheren mehrmals wiederholt. Die errechneten

Oberflächen wurden in Bezug zur Einwaage gesetzt und in einem Punktdiagramm grafisch aufgetragen. Anhand der Steigung der Regressionsgrade konnte so das Oberflächen/Gewichts-Verhältnis bestimmt werden.

2.10.4 Herstellung isolierter Wurzelzellwände

Wurzeln von 35 Tage alten *Arabidopsis* Pflanzen aus Hydrokulturanzucht wurden aus der Nährlösung entnommen und vorsichtig mit demineralisiertem Wasser gewaschen. Die Wurzeln wurden am Übergangsbereich von Wurzelbasis zu Hypokotyl von den oberirdischen Pflanzenteilen abgetrennt und in eine Lösung mit Polysaccharid-abbauenden Enzymen überführt (7.1). Das Wurzelmaterial wurde für 2 Wochen unter leichtem Schütteln in der Enzymlösung im Erlenmeyerkolben inkubiert und die Enzymlösung dabei mehrmals ausgetauscht.

Nach dem enzymatischen Verdau wurde das Wurzelmaterial erneut mit demineralisiertem Wasser gewaschen, zum Auswaschen vorhandener löslicher Lipide in Chloroform/Methanol (50:50 v/v) überführt und im Erlenmeyerkolben unter leichtem Schütteln für 2 Wochen extrahiert. Das organische Lösungsmittelgemisch wurde in diesem Zeitraum mehrmals ausgetauscht. Das verbleibende Wurzelmaterial wurde zunächst unter dem Abzug und dann im Exsikkator für mehrere Tage getrocknet und das Trockengewicht der Proben mittels einer Feinwaage bestimmt. Die Freisetzung der Monomere des Wurzelsuberins erfolgte in einer Umesterungsreaktion (2.10.6). Nach der Zugabe von 10 µg Dotriacontan (C₃₂ Alkan) als internem Standard wurde der Extrakt derivatisiert (2.10.7) und gaschromatografisch analysiert (2.10.8).

2.10.5 Herstellung von isoliertem Samenschalenmaterial

Etwa 50 mg reifer und getrockneter Samen von *Arabidopsis* wurden pro Parallele abgewogen, unter Verwendung von flüssigem N₂ schockgefroren und im Achat-Mörser aufgeschlossen. Das zerkleinerte Samenmaterial wurde mit einem Spatel in ein 10 ml Glasgefäß mit teflonbeschichtetem Schraubdeckel überführt und in Chloroform/Methanol (50:50 v/v) zwecks Extraktion löslicher Lipidbestandteile für 2 Wochen auf der Rollbank inkubiert. Da *Arabidopsis* Samen einen hohen Anteil an Speicherlipiden aufweisen und das Lösungsmittelvolumen mit 10 ml relativ klein ist, wurde das organische Lösungsmittelgemisch in der ersten Woche täglich, in der darauf folgenden Woche alle 2 Tage ausgetauscht. Der Lipidextrakt wurde verworfen und das verbliebene Samenmaterial zunächst unter dem Abzug und anschließend im Exsikkator für mehrere Tage getrocknet. Die Bestimmung des Trockengewichtes erfolgte ebenfalls mittels einer Feinwaage. Die Freisetzung der Monomere des Samenschalenpolyesters erfolgte in einer

Umesterungsreaktion (2.10.6). Nach der Zugabe von 10 µg Dotriacontan (C₃₂ Alkan) als internem Standard wurde der Extrakt derivatisiert (2.10.7) und gaschromatografisch analysiert (2.10.8).

2.10.6 Umesterungsreaktionen

Zur Analyse von polyesterbasierten Polymeren mittels Gaschromatografie müssen diese zunächst in ihre Monomere aufgespalten werden. Die Hydrolysierung der Esterbindungen erfolgte, je nach Analysat, durch eine Umesterung mit methanolischer Salzsäure oder durch eine Umesterung mit methanolischem Borontrifluorid.

2.10.6.1 Umesterung mit methanolischer Salzsäure

Die jeweilige Probe wurde in einem 10 ml Glasgefäß mit teflonbeschichtetem Schraubdeckel-Verschluß mit 1 ml einer 1 N methanolischen Salzsäure (1 N MeOH/HCl) (Supelco; Bellefonte, USA) versetzt und bei 80 °C für 2 h inkubiert. Nach der Umesterungsreaktion erfolgte die Zugabe eines geeigneten internen Standards und das Methanolsat wurde mit 2 ml gesättigter NaCl-Lösung aufgefüllt. Dies diente dem Abstoppen der Umesterungsreaktion und der anschließenden Phasentrennung. Die Extraktion der Umesterungsprodukte aus dem Methanolsat erfolgte mittels Hexan. 1 ml Hexan wurde der Probe zugegeben, gevortext und die oben befindliche Lösungsmittelphase in ein neues, sauberes Reaktionsgefäß überführt. Dieser Extraktionsschritt wurde zwei weitere Male wiederholt und die Extrakte vereinigt. Der erhaltene Extrakt wurde bei 60 °C im Stickstoffstrom auf etwa 200 µl eingeeengt und anschließend derivatisiert (2.10.7).

2.10.6.2 Umesterung mit methanolischem Borontrifluorid

Die jeweilige Probe wurde in einem 10 ml Glasgefäße mit teflonbeschichtetem Schraubdeckel mit 1 ml 10 % (w/v) Borontrifluorid (BF₃), gelöst in Methanol (Sigma-Aldrich; Steinheim) versetzt und für 16 h bei 70 °C inkubiert. Das erhaltene Methanolsat wurde nach der erfolgten Umesterung mit einem geeigneten internen Standard versetzt und vorsichtig auf 2 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung in einem sauberen Reaktionsgefäß gegeben. Die Extraktion der umgeesterten Monomere erfolgte mit Chloroform. 1 ml Chloroform wurde hierzu dem Methanolsat zugegeben, gevortext und die untere, organische Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Extraktionsschritt wurde zwei weitere Male wiederholt und die Chloroformextrakte vereinigt. Der organische Extrakt wurde durch Zugabe von 2 ml Aqua demin. und anschließendem vortexen gewaschen, die wässrige Phase danach verworfen. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt.

Zum Entfernen des restlichen Wassers aus der organischen Phase wurde der Extrakt durch Zugabe von wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Die erhaltenen Extrakte wurden im Stickstoffstrom bei 50 °C auf etwa 200 µl eingengt und anschließend derivatisiert (2.10.7).

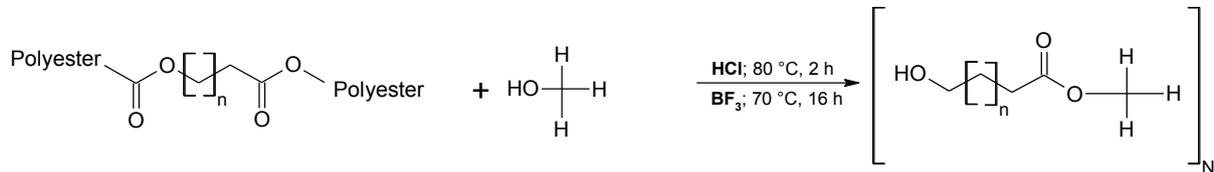


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Umesterungsreaktion

Ein Erhitzen der Proben in methanolischer HCl-, beziehungsweise BF_3 -Lösung induziert die Esterspaltung, wodurch Monomere aus dem Polyesterverbund herausgelöst werden. Da die Reaktion in einem Überschuss an Methanol stattfindet, werden neue Esterbindungen bevorzugt mit der Hydroxylgruppe des Methanols eingegangen, wodurch freie Methylester gebildet werden.

2.10.7 Derivatisierung

Das Prinzip der Auftrennung von Stoffgemischen mittels Gaschromatografie beruht auf Wechselwirkungen zwischen dem jeweiligen Analyt und der stationären Phase auf der inneren Oberfläche der Kapillarsäule. Um eine erfolgreiche gaschromatografische Auftrennung gewährleisten zu können, müssen die polaren funktionellen Gruppen der Analyte maskiert werden. Durch diese Maskierung wird zum einen die Flüchtigkeit und Trennbarkeit der im Analysat enthaltenen Stoffe erhöht und zum anderen die Möglichkeit der irreversiblen Anlagerung von Probensubstanzen an die Beschichtung der Kapillarsäule verringert.

Die Maskierung der polaren Gruppen des Substanzgemisches erfolgt über eine Derivatisierungsreaktion. Jede Probe wurde hierzu mit 20 µl Pyridin (Sigma-Aldrich; Steinheim) und 20 µl BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid) (Macherey-Nagel; Düren) versetzt. Bei einer Inkubation bei 70 °C für 40 min wurden frei vorliegende Hydroxyl- und Carboxylgruppen im Analysat in ihre korrespondierenden Trimethylsilylether oder -ester überführt.

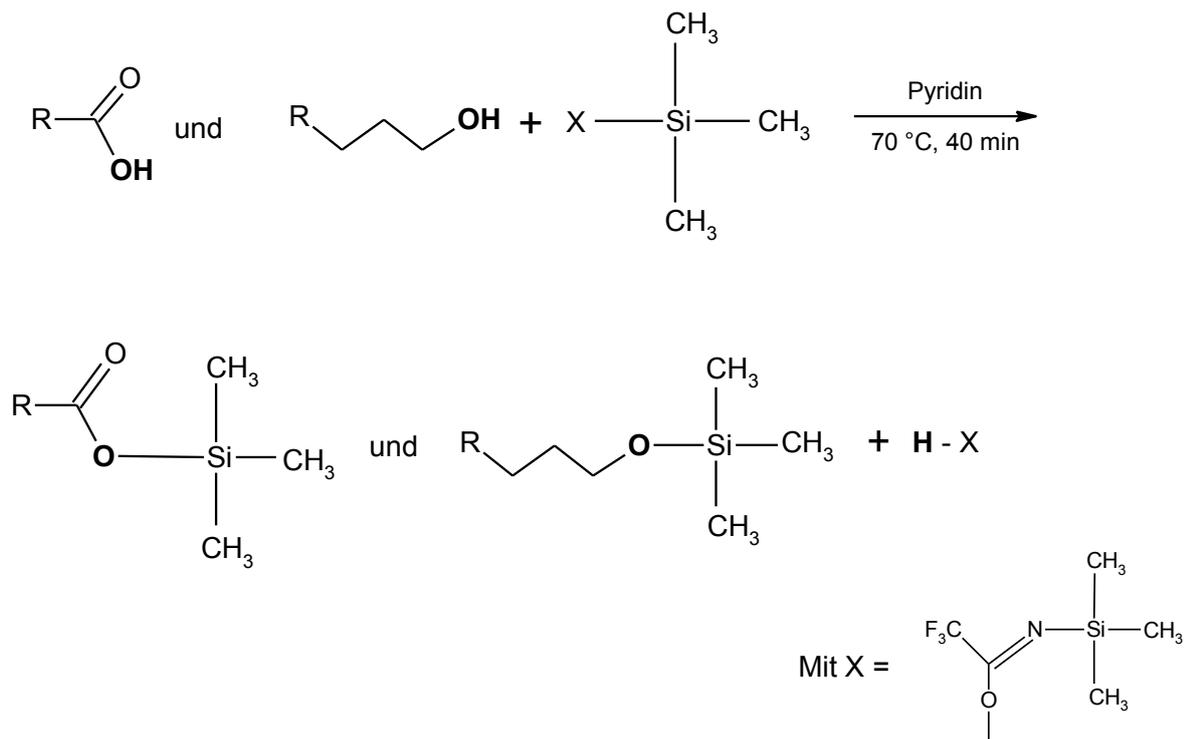


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Derivatisierungsreaktion mit BSTFA

Reaktive, polare Gruppen (hier am Beispiel von Carboxyl- und Hydroxylgruppen) werden durch BSTFA zu Trimethylsilylethern und –estern umgesetzt. In der Derivatisierungsreaktion dient Pyridin als Katalysator

2.10.8 Gaschromatografie und Massenspektrometrie

Die in 2.10.6 und 2.10.7 aufbereiteten Extrakte wurden im Folgenden gaschromatografisch aufgetrennt und mittels nachgeschalteter Detektoren identifiziert und quantifiziert.

Chromatografische Auftrennungsverfahren basieren auf dem Prinzip der Verteilung von Stoffgemischen zwischen einer stationären und einer mobilen Phase in Abhängigkeit der individuellen physikalischen und chemischen Eigenschaften der einzelnen Bestandteile des Stoffgemisches. Die Auftrennung in der Gaschromatografie beruht auf molekulspezifischen Siedepunkten und molekulspezifischen Interaktionen der Bestandteile eines Stoffgemisches in der Gasphase mit der stationären Phase, der Beschichtung der Kapillarsäule. Die unterschiedlichen Moleküleigenschaften bedingen eine räumliche Auftrennung einzelner Bestandteile des Stoffgemisches.

Die gaschromatografische Auftrennung der Extrakte erfolgte in einem Agilent 6890N Gaschromatograph (Agilent Technologies; Santa Clara, USA). Als stationäre Phase wurde eine Kapillarsäule verwendet (DB-1, 30 m x 0,32 mm; 0,1 µm; J&W Scientific, USA). Wasserstoff (H₂) diente hier mit einer Flussrate von 2 ml/min als Trägergas und repräsentiert die mobile Phase.

Die Identifizierung der Komponenten eines Stoffgemisches erfolgt durch ein in Serie geschaltetes Massenspektrometer als Detektionseinheit (Agilent Technologies; Santa Clara, USA). Im Massenspektrometer wird durch eine Ionisierung des jeweiligen Analyts eine Fragmentierung induziert. Die Ionisierung erfolgte mittels Elektronenbeschuss (Electron Impact, EI) und führt zur Ausbildung primärer positiver Ionen, die aufgrund ihrer thermodynamischen Instabilität weiter fragmentieren. Die detektierbaren Fragmentierungsmuster sind charakteristisch für ein bestimmtes Molekül. Die geladenen Fragmente werden in einem angelegten elektrischen Feld in Richtung eines elektromagnetischen Feldes beschleunigt, welches durch einen Hexapol induziert wird. Durch die angelegte Wechselspannung am Hexapol können in einem Zeitintervall nur Fragmente einer bestimmten Masse das Magnetfeld in Richtung des Detektors passieren und aufgenommen werden. Eine kontinuierliche Änderung der Spannungsverhältnisse am Hexapol erlaubt einen selektiven Durchtritt von Fragmenten in Richtung Detektor und die Aufnahme eines Massenspektrums. Die erzeugten Massenspektren können zur Identifikation von Substanzen mit bereits bekannten Fragmentmustern verglichen werden.

Die Quantifizierung erfolgte unter Verwendung eines Flammen-Ionisations-Detektors (Flame Ionization Detector, FID). Ein FID ermöglicht eine quantitative Analyse von Kohlenwasserstoffverbindungen durch thermische Ionisation der Moleküle in einer Knallgasflamme. Am Detektor ist ein elektrisches Feld angelegt, welches eine Spannung aufbaut. Durch thermische Ionisation freigesetzte Ionen werden am Detektor abgefangen und induzieren durch ihre Eigenladung einen Stromfluss, welcher als digitalisiertes Signal aufgenommen wird. Das Detektorsignal ist über einen weiten Bereich linear proportional zum Kohlenstoffgehalt des Analyts. Die hier vorgestellten Analyseverfahren können zur Spurenanalyse genutzt werden, da bereits sehr geringe Mengen eines Analyts detektierbar sind. Die beschriebenen Geräte sind in der Lage, Kohlenstoffverbindungen im Picogramm-Bereich (pg) zu detektieren und quantifizieren.

Zur Vermeidung von Qualitätsverlusten bei der Stoffauftrennung mittels Gaschromatographie muss vor jeder Analysereihe eine Qualitätskontrolle der Kapillarsäule durchgeführt werden. Ein Qualitätsverlust der Kapillarsäule würde zu einer Diskriminierung von Stoffen mit polaren funktionellen Gruppen führen, da diese sich auf der Kapillarsäulenbeschichtung niederschlagen und somit nicht zum Detektor gelangen würden. Um dies zu überprüfen, wurde vor jeder experimentellen Analyse ein derivatisiertes Gemisch aus den langkettigen Carbonsäuren Nonacosansäure (C_{29} Monocarbonsäure), Triacontansäure (C_{30} Monocarbonsäure) und Hentriacontansäure (C_{31} Monocarbonsäure) und dem Alkan Tetracosan (C_{24} Monocarbonsäure) in definierten Mengenverhältnissen injiziert und gaschromatografisch aufgetrennt. Die Qualität der Säule wird quantifiziert durch das Verhältnis der Signalstärken zwischen Tetracosan und Hentriacontansäure. Für eine Analyse

sollte das Verhältnis von Tetracosan zu Hentriacontansäure unter 1,3 liegen. Ist das Verhältnis Alkan zu Säure $> 1,3$ muss die Säulenqualität durch Ausheizen und Spülen beziehungsweise Kürzen der Säule verbessert werden, oder die Kapillarsäule muss ersetzt werden.

Tabelle 8: Temperaturprogramme zur Auftrennung von Stoffgemischen in der Gaschromatographie

Suberin/Kutin	Wachs	Säurestandard
On Column-Injektion bei 50 °C	On Column-Injektion bei 50 °C	On Column-Injektion bei 50 °C
2 min 50 °C	2 min 50 °C	1 min 50 °C
10 °C/min auf 150 °C	40 °C/min auf 200 °C	40 °C/min auf 200 °C
1 min bei 150 °C	2 min bei 200 °C	1 min bei 200 °C
3 °C/min auf 310 °C	3 °C/min auf 310 °C	3 °C/min auf 310 °C
15 min bei 310 °C	15 min bei 310 °C	15 min bei 310 °C

2.11 Physiologische Untersuchungen

2.11.1 Bestimmung der Samenkeimungs- und Keimlings-Überlebensrate

Zur Untersuchung der Keimungsrate und der Überlebensrate der Keimlinge mussten zunächst Samen unterschiedlicher Pflanzenlinien von *Arabidopsis*, wie in 2.3.3 beschrieben, oberflächensterilisiert und auf MS-Agar ausgesät werden. Beide Experimente wurde wie in Gou et al. (2009) beschrieben durchgeführt. MS-Agar wurde vor dem Autoklavieren mit 50, 100, 150, 200, 250 und 300 mM NaCl, beziehungsweise KCl angereichert und nach dem Autoklavieren auf Petrischalen verteilt. Als Kontrolle diente MS-Agar ohne Zugabe von Salzen. Für jede Salzkonzentration wurden drei Petrischalen mit dem entsprechenden MS-Agar befüllt und mit etwa 150 Samen bestückt. Die Auskeimung und Anzucht der Pflanzen erfolgte für 14 Tage unter den in 2.3.1 beschriebenen Anzuchtbedingungen. Die Anzahl der gekeimten Samen, beziehungsweise der lebensfähigen Keimlinge wurde ausgezählt und auf die Gesamtzahl ausgesäter Samen pro Parallele bezogen.

Keimung wurde definiert als Penetration der Samenschale durch die Keimlingswurzel, Ein lebensfähiger Keimling wurde definiert durch Ausbildung von 2 grünen Kotyledonen nach 14 Tagen Anzucht (Gou et al., 2009). Die Auswertung erfolgte als prozentuale Auswertung bezogen auf die Gesamtzahl der ausgesäten Samen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus 3 Parallelen, Fehlerbalken zeigen 95 %-Konfidenzintervalle.

2.11.2 Salzstress und osmotischer Stress bei Keimlingen

Samen von *Arabidopsis* Wildtyp- und Mutantenlinien wurden wie in 2.3.2 beschrieben oberflächensterilisiert und auf Standard-MS-Agar ausgesät. Die Keimlinge wurden nach Auskeimung unter Standardbedingungen für 9 Tage angezogen und dann auf MS-Agar transferiert, der wie in 2.11.1 beschrieben, mit NaCl (50 mM, 100 mM und 200 mM), beziehungsweise Mannitol (75 mM, 150 mM und 300 mM) angereichert wurde. Die Keimlinge wurden nebeneinander auf die Agarplatten aufgetragen, so dass die Wurzeln parallel verliefen und ihre Wurzelbasis auf einer horizontalen Ebene nebeneinander lagen.

Als Kontrolle wurden Pflanzen aller untersuchten Linien auf MS-Agar ohne Zugabe von Stressoren transferiert. Alle Platten wurden vertikal in der Klimakammer aufgestellt und die Pflanzen für weitere 11 Tage unter Standardbedingungen angezogen. 11 Tage nach der Überführung der Pflanzen wurden die Platten fotografiert.

2.11.3 Austrocknungsexperiment

Arabidopsis Wildtyp-Pflanzen und Insertionsmutanten wurden wie in 2.3.1. beschrieben stratifiziert und ausgesät. Neben der Aussaat auf Standard-Anzuchterde wurden zusätzlich Quarzsand und Anzuchterde gemischt um unterschiedliche Substrateigenschaften zu erzielen. Der Quarzsand wurde im Vorfeld zur Entfernung eventuell vorhandener Schwebstoffe mehrmals mit Leitungswasser gewaschen und anschließend im Wärmeschrank getrocknet. Es wurden Mischungen aus 25 % Erde/ 75 % Quarzsand (w/w) und 75 % Erde/ 25 % Quarzsand (w/w) hergestellt. Des Weiteren wurden Töpfe ausschließlich mit Quarzsand befüllt. Auf allen vier vorhandenen Substraten wurden je 5 stratifizierte Samen auf einen Topf verteilt und die Töpfe für 21 Tage wie gewohnt gewässert. Dann wurde die Wässerung eingestellt und die Töpfe wurden über Nacht auf Quarzsand platziert um in der Anzuchterde verbliebenes Wasser aufzusaugen. Kontrollpflanzen wurden weiterhin wie gewohnt gewässert.

Zu Beginn der Trockenstressperiode wurden die Transpirationsraten an Rosettenblättern mit Hilfe eines stomatalen Diffusionsporometers (Porometer AP-4; Delta-T Devices, Cambridge, UK), sowie die photosynthetische Aktivität mit Hilfe einer PAM (Junior-PAM, Walz, Effeltrich) erfasst. Die letzten Messungen dieser Art erfolgten 4 Tage, nachdem die Wässerung eingestellt wurde. Ab diesem Zeitpunkt begann die Turgeszenz der Rosettenblätter abzunehmen und die Messung mittels Diffusionsporometer konnte nicht mehr durchgeführt werden ohne das Blattgewebe zu verletzen. Die Pflanzen wurden täglich auf eindeutige Anzeichen von Trockenstress, beispielsweise sichtbare Abnahme des Turgors, nekrotische Blätter und Stängel und vermehrte Einlagerung von Anthocyanen (Leprince und Buitink, 2010) hin observiert, und im Falle von auftretenden Trockenstressindikatoren fotografiert.

2.11.4 Untersuchung der Samenschalenpermeabilität

Die Samenschalenpermeabilität wurde mittels eines Tetrazolium-Tests qualitativ ermittelt (Debeaujon *et al.*, 2000). 2,3,5-Triphenyltetrazolium erzeugt in Wasser eine farblose Lösung. Bei einem Durchtritt durch die Samenschale kommt gelöstes Triphenyltetrazolium in Kontakt mit den lebenden Geweben des Samens, namentlich dem Endosperm und dem Embryo, und wirkt hier als Redox-Indikator. Durch die Aktivität von Dehydrogenasen wird 2,3,5-Triphenyltetrazolium zu 1,3,5-Triphenylformazan oxidiert und es erfolgt ein Farbumschlag zu rot. Die Intensität der Rotfärbung der Samen ist ein semiquantitatives Indiz für die Permeabilität der Samenschale.

Für die Durchführung des Tetrazolium-Tests wurden reife, getrocknete *Arabidopsis* Samen in einer 1 %-igen (w/v) wässrigen 2,3,5 Triphenyltetrazolium Lösung für 4 h und 24 h bei 30 °C auf einer langsamen Rollbank im Dunkeln inkubiert. Die Samen wurden nach erfolgter Inkubation mehrmals mit Wasser gewaschen und dann unter dem Binokular fotografiert.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Zusammensetzung der Antheren Kutikula von *cyp704B2* in *Oryza sativa*

In der hier durchgeführten Versuchsreihe sollte die Zusammensetzung des Kutins und der kutikulären Wachse der Mutante *cyp704B2* mit denen des Wildtyps verglichen werden. Die Linie *cyp704B2* wurde bei einem Screening nach männlich sterilen Linien von ^{60}Co - γ -Strahl mutagenisierten Pflanzen des Ökotyps *Oryza sativa* ssp. *Japonoica* isoliert. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte auf dem Reisfeld der Shanghai Jiaotong Universität. Für die Analyse wurde gefriergetrocknetes Antherenmaterial des Wildtyps und der *cyp704B2* Mutante in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt. In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Antheren und Pollen der Mutante *cyp704B2* einen morphologischen und entwicklungsbiologischen Phänotyp aufweisen. Antheren der Linie *cyp704B2* zeigten eine verringerte Gesamtgröße (Abbildung 14 B) im Vergleich zu den Antheren des Wildtyps (Abbildung 14 A). Die äußere Oberfläche der Epidermis der Antheren der Linie *cyp704B2* wies eine veränderte Ultrastruktur im Vergleich zum Wildtyp auf (Abbildung 14 C und E) und die Entwicklung von Pollenkörnern war stark beeinträchtigt (Abbildung 14 D und F). Aufgrund der deformierten Pollen sind Pflanzen der Linie *cyp704B2* männlich steril (Li *et al.*, 2010).

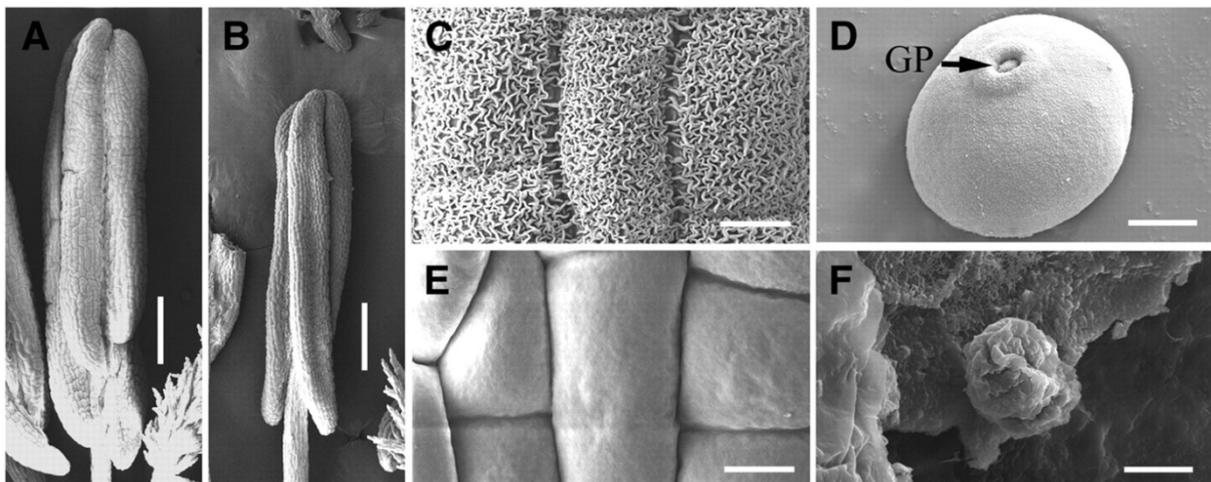


Abbildung 14: Mikroskopische Untersuchung der Antheren und des Pollenkorns des Wildtyps und der Linie *cyp704B2* mittels Rasterelektronenmikroskopie

Antheren des Wildtyps (A) und der Linie von *cyp704B2* (B) im selben Entwicklungsstadium. Detailaufnahme der äußeren Oberfläche von Antheren des Wildtyps (C) und der Linie *cyp704B2* (E). Pollenkorn des Wildtyps (D) und der *cyp704B2* Mutante (F). Größenmarker: 20 μm (A und B), 50 μm (B), 10 μm (C), 5 μm (D bis F). GP = Keimungspore (Germination Pore); Nach Li *et al.*, (2010).

Da die Kutikula der Epidermis flächig aufgelagert ist, sollte in der hier durchgeführten Analyse die Zusammensetzung des Kutins und des Wachses der Antheren in Bezug zu der Oberfläche des Antherenmaterials gesetzt werden. Zu diesem Zweck wurde ein Oberflächen/Gewichts-Verhältnis der Antheren des Wildtyps und der Linie *cyp704B2*, wie in Kapitel 2.10.3 beschrieben, bestimmt. Die Ergebnisse dieser Korrelation sind in Abbildung 15 grafisch dargestellt. Die Regressionsgrade der Antheren des Wildtyps weist eine Steigung von $y = 17,33 x + 0,07$ bei einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,95$ auf. Die Regressionsgrade der Antheren der *cyp704B2* Mutante zeigt eine Steigung von $y = 46,45 x + 0,3$ bei einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,99$ auf. Aufgrund der geringeren Größe der Antheren der Mutante *cyp704B2* haben diese bei gleicher Einwaage eine signifikant erhöhte Oberfläche.

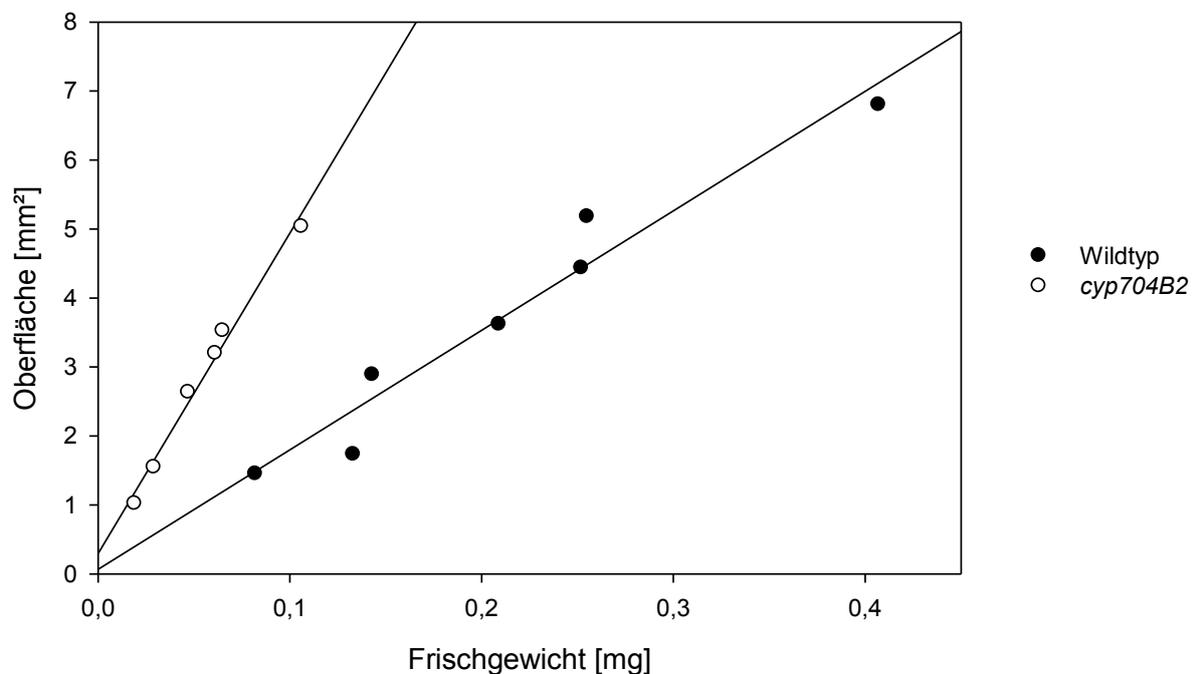


Abbildung 15: Korrelationsanalyse des Oberfläche/Gewicht-Verhältnisses von Antheren des Wildtyps und der Linie *cyp704B2*

Darstellung der Oberflächen/Gewichtskorrelation von Antheren des Wildtyps (weiße Punkte) und der Linie *cyp704B2* (schwarze Punkte) in *Oryza sativa*. Die Antherenoberfläche in mm^2 ist gegen das Frischgewicht der Antheren in mg aufgetragen. Linien stellen die Regressionsgraden dar. Die Steigungen der Regressionsgraden determinieren das Verhältnis von Oberfläche zu Gewicht. Die Regressionsgrade der Antheren des Wildtyps weist eine Steigung von $y = 17,33 x + 0,07$ bei einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,95$ auf, die Regressionsgrade der Antheren der *cyp704B2* Mutante zeigt eine Steigung von $y = 46,45 x + 0,3$ bei einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,99$.

3.1.1 Analyse der Zusammensetzung der kutikulären Wachse von Antheren der Linie *cyp704B2*

Die Extraktion von kutikulären Wachsen der Antheren von *Oryza sativa* und die Aufbereitung des Extraktes erfolgte wie in 2.10.1 beschrieben. In der nachfolgenden Analyse des Wachsextraktes mittels GC-MS und GC-FID (2.10.8) konnten 18 Monomere als Bestandteile des kutikulären Wachses von Antheren in beiden untersuchten Linien identifiziert und, wie in 2.10.3 beschrieben, in Bezug zur Oberfläche der Antheren gesetzt werden. Die identifizierten Monomere konnten den Stoffklassen der Monocarbonsäuren, der primären Alkohole, der Alkane und der einfach ungesättigten Alkene zugeordnet werden.

Die Ergebnisse der Analyse der Wachsbestandteile sind in Abbildung 16 grafisch dargestellt. Eine Auflistung der Ergebnisse ist Tabelle 9 und Tabelle 10 in Kapitel 7.4 zu entnehmen.

Alle identifizierten Monomere lagen in einem Kettenlängenbereich zwischen C₂₀ und C₃₅. Die Gesamtwachsmenge der Antheren des Wildtyps lag bei $0,18 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mm}^2$. Alkene waren mit 58 % ($0,10 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mm}^2$), Alkane mit 38 % ($0,07 \pm 0,001 \mu\text{g}/\text{mm}^2$) am Gesamtwachs beteiligt. Monocarbonsäuren und primäre Alkohole waren mit 2,2 % ($0,004 \pm 0,001 \mu\text{g}/\text{mm}^2$) und 1,1 % ($0,002 \pm 0,0002 \mu\text{g}/\text{mm}^2$) am Gesamtwachs beteiligt. Die Gesamtwachsmenge der Linie *cyp704B2* war um 26 % reduziert im Vergleich zur Wachsmenge des Wildtyps und betrug $0,13 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mm}^2$. Alkene sind hier mit 48,9 % ($0,065 \pm 0,007 \mu\text{g}/\text{mm}^2$) die prominenteste Stoffklasse. Im Vergleich zum Wildtyp ist in *cyp704B2* die absolute Menge an Alkenen um etwa 38 % reduziert. Der relative Anteil der Alkane am Wachs der Mutante ist mit 48,6 % ($0,064 \pm 0,003 \mu\text{g}/\text{mm}^2$) signifikant erhöht gegenüber dem Wildtyp. Säuren sind mit 1,7 % ($0,002 \pm 0,001 \mu\text{g}/\text{mm}^2$) ebenso wie primäre Alkohole mit 0,9 % ($0,001 \pm 0,0002 \mu\text{g}/\text{mm}^2$) in geringer Menge am kutikulären Wachs der Antheren der *cyp704B2* Mutante beteiligt.

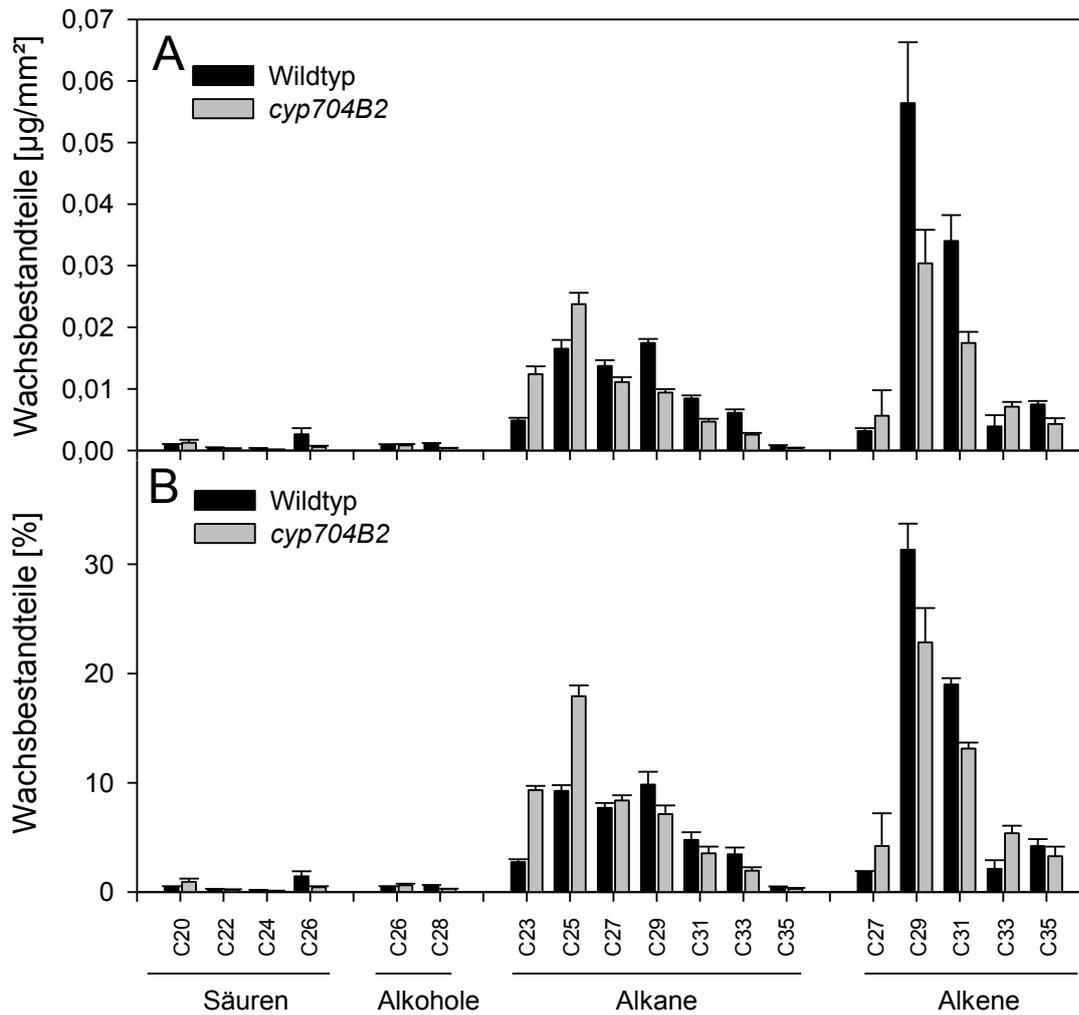


Abbildung 16: Vergleich der absoluten und relativen Verteilung der Monomere des Wachses von Antheren der *cyp704B2* Mutante und des korrespondierenden Wildtyps (*Oryza sativa*)

(A): Monomere Zusammensetzung von kutikulären Wachsbestandteilen bezogen auf die Oberfläche des Antherenmaterials. (B): Relative Verteilung der kutikulären Wachsmonomere. Dargestellt ist das arithmetische Mittel aus 5 parallelen Einzelanalysen \pm Standardabweichung. Mit Säuren = Monocarbonsäuren; Alkohole = primäre Alkohole

3.1.2 Analyse der Zusammensetzung des Antherenkutins von *cyp704B2*

Für die Analyse der Zusammensetzung des Antherenkutins wurden die zur Wachsextraktion verwendeten Antheren weiter behandelt. Nach einer Totalextraktion der Antheren, wie in Kapitel 2.10.2 beschrieben, erfolgte eine Umesterung mit methanolischer Salzsäure (2.10.6.1) zur Freisetzung der Monomere aus dem Kutinpolyester. In der Analyse der Monomere mittels GC-MS und GC-FID (2.10.8) konnten 16 Komponenten dem Antherenkutin zugeordnet und quantifiziert werden. Die Monomere gehörten den Stoffklassen der Monocarbonsäuren, ω -Hydroxysäuren, α,ω -Dicarbonsäuren und den mehrfach hydroxylierten, beziehungsweise epoxylierten ω -Hydroxysäuren an. Weiterhin wurden drei Massenspektren identifiziert, die nicht eindeutig einem Molekül zugeordnet werden konnten. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass diese Substanzen Bestandteile des Kutinpolymers der Antheren von Reis darstellen (Jung *et al.*, 2006). Sie werden in der Literatur als URCM (Unidentified Rice Cutin Monomers = Nicht-identifizierte Monomere des Reiskutins) zusammengefasst und stellen wahrscheinlich mehrfach hydroxylierte ungesättigte Monomere dar (Jung *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010). Die Ergebnisse der Analyse des Antherenkutins von *cyp704B2* Linien und des korrespondierenden Wildtyps sind in Abbildung 17 grafisch dargestellt. Eine Auflistung der Ergebnisse der Kutinanalyse ist Tabelle 11 und Tabelle 12 in Kapitel 7.4 zu entnehmen.

Die Gesamtkutinmenge in Antheren des Wildtyps betrug $0,823 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mm}^2$. Prominenteste Stoffklasse war hier mit 41,7 % ($0,34 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mm}^2$) die Klasse der URCM, gefolgt von ω -Hydroxysäuren mit 26,5 % ($0,22 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mm}^2$). Die einfach ungesättigte C_{18} ω -Hydroxysäure konnte mit einem relativen Anteil von 22,5 % ($0,19 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mm}^2$) als Hauptkomponente des Antherenkutins nachgewiesen werden. Die Stoffklasse der Monocarbonsäuren war mit 18,6 % ($0,15 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mm}^2$) am Polyester beteiligt. Mehrfach hydroxylierte, beziehungsweise epoxylierte Carbonsäuren waren mit 12,1 % ($0,1 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mm}^2$) am Polymer beteiligt. Die Analyse der Kutinzusammensetzung der Linie *cyp704B2* enthüllte hochsignifikante Unterschiede in allen Monomeren aller beteiligten Stoffklassen. Die Gesamtmenge an Kutinmonomeren war mit $0,06 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ im Vergleich zum Wildtyp um über 90 % reduziert. Die Reduktion des Gesamtkutins verteilte sich auf alle am Polyester beteiligten Stoffklassen. Monocarbonsäuren waren mit $0,03 \pm 0,007 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ um 82 % reduziert. ω -Hydroxysäuren ($0,01 \pm 0,002 \mu\text{g}/\text{mm}^2$), mehrfach hydroxylierte, beziehungsweise epoxylierte Carbonsäuren ($0,006 \pm 0,001 \mu\text{g}/\text{mm}^2$) und die Klasse der URCM ($0,015 \pm 0,003 \mu\text{g}/\text{mm}^2$) waren jeweils um etwa 95 % reduziert.

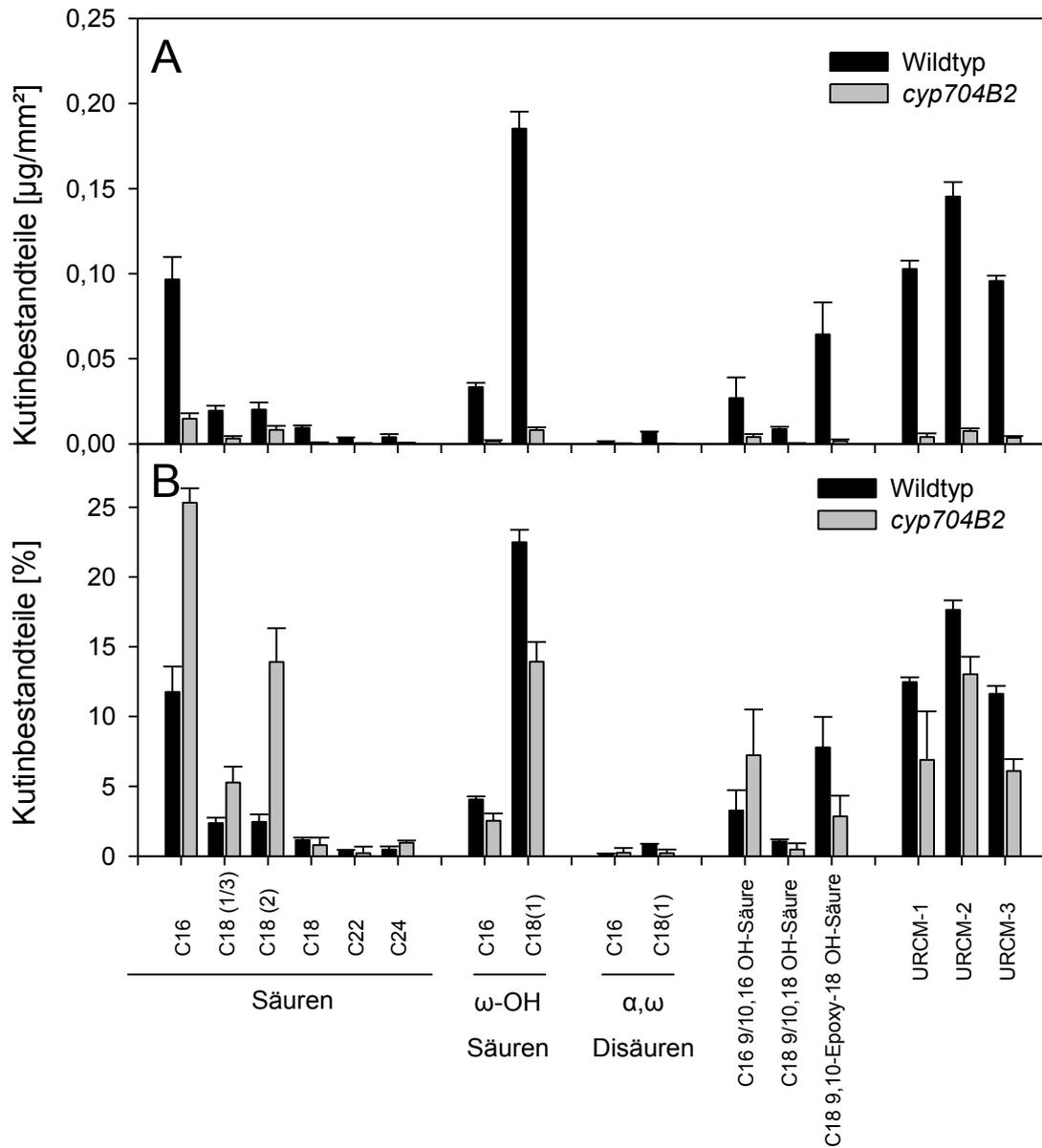


Abbildung 17: Vergleich der absoluten und relativen Verteilung der Monomere des Kutins von Antheren der *cyp704B2* Mutante und des korrespondierenden Wildtyps (*Oryza sativa*)

(A): Monomere Zusammensetzung des Antherenkutins bezogen auf die Oberfläche des Antherenmaterials. (B): Relative Verteilung der Kutinmonomere. Dargestellt ist das arithmetische Mittel aus 5 parallelen Einzelanalysen \pm Standardabweichung. Mit Säuren = Monocarbonsäuren; ω -OH-Säuren = ω -Hydroxysäuren; OH-Säuren = Hydroxysäuren; URCM = nicht-identifizierte Monomere des Reiskutins

3.2 Organspezifische Expression von Kandidatengenegen der Suberinbiosynthese in *Arabidopsis thaliana*

In der Analyse von Microarray-Datensätzen und Datenbank-basierten Expressions- und Koregulationsmustern konnten die putativen Peroxidasen At1g68850, At5g14130 und At5g15180, die GDSL-Lipase At5g37690, das integrale Membranprotein At5g44550 und der ABC-Transporter At5g19410 als Kandidatengene mit einer potenziellen Beteiligung an der Suberinbiosynthese identifiziert werden. Die Expressionsdaten aus der *in silico*-Analyse wurden anhand einer semiquantitativen, organspezifischen RT-PCR (2.6.7) mit der RNA des Wildtyps experimentell überprüft. Eine schematische Darstellung der Gene ist in Abbildung 18 dargestellt. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse sind in der darauf folgenden Abbildung dargestellt. Als Kontrolle diente hier die Expression des konstitutiv exprimierten Gens *AKTIN*. Die Peroxidase At1g68850 zeigte ein Expressionsmaximum im apikalen und im basalen Teil der Wurzel. In anderen Geweben der Pflanze war eine geringe oder keine Expression nachweisbar. Ein vergleichbares Expressionsmuster zeigte die Peroxidase At5g14130. Hier wurde zusätzlich eine schwache Expression in der Schote detektiert. Die Peroxidase At5g15180 zeigte eine maximale Expression im apikalen Bereich der Wurzel. Geringe Expressionsraten konnten im mittleren Wurzelteil und in Schoten nachgewiesen werden. Die GDSL-Lipase At5g37690 wurde schwach in den Geweben der Wurzel und der Schote exprimiert, während für das integrale Membranprotein At5g44550 eine deutliche Expression in allen untersuchten Wurzelbereichen und in den Geweben der Schote nachweisbar war. Der ABC-Transporter At5g19410 war in allen hier untersuchten Geweben zumindest in geringer Menge exprimiert, zeigte jedoch ein Maximum in der apikalen und basalen Region der Wurzel.

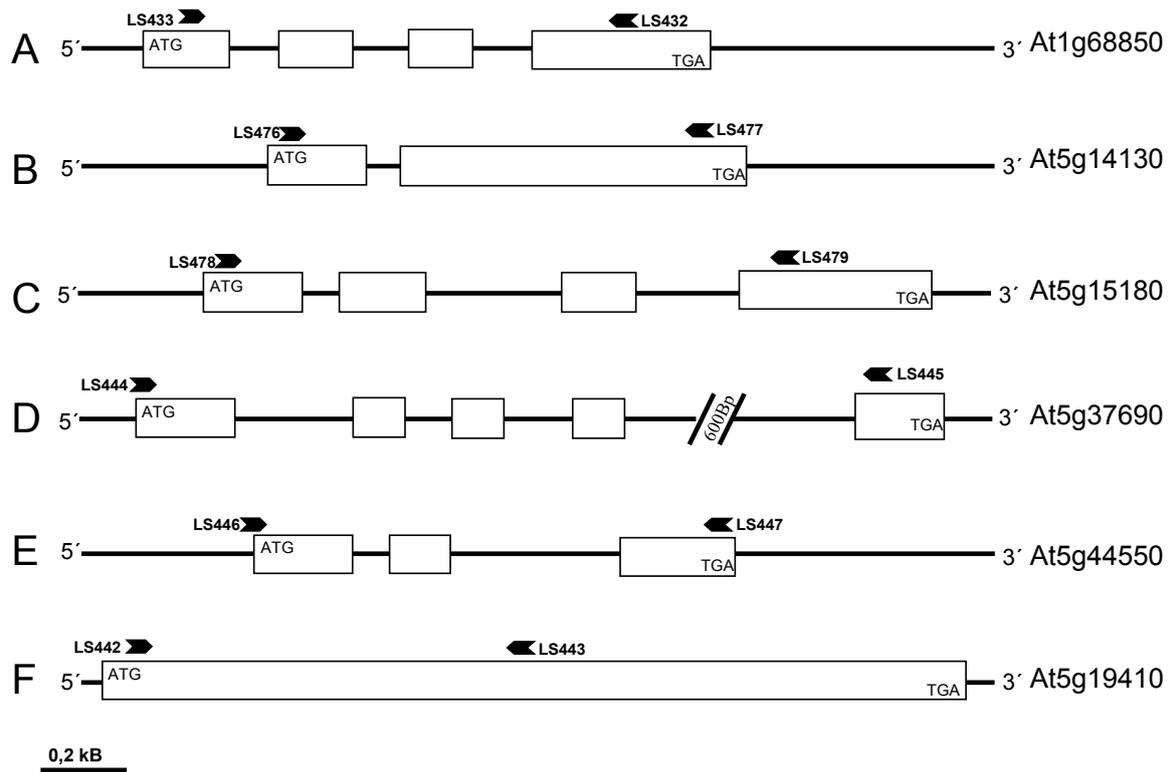


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Kandidatengene mit potenzieller Beteiligung an der Suberinbiosynthese

Schematische Darstellung des Genlocus der putativen Peroxidase-Gene At1g68850 (A), At5g14130 (B) und At5g15180 (C), der GDSL-Lipase At5g37690 (D), des integralen Membranproteins At44550 (E) und des ABC-Transporters At5g19410 (F). Die Darstellung zeigt den Aufbau der Gene von 5' nach 3'. Boxen kennzeichnen Exons, Pfeile kennzeichnen die Primer zur Darstellung der organspezifischen Expression.

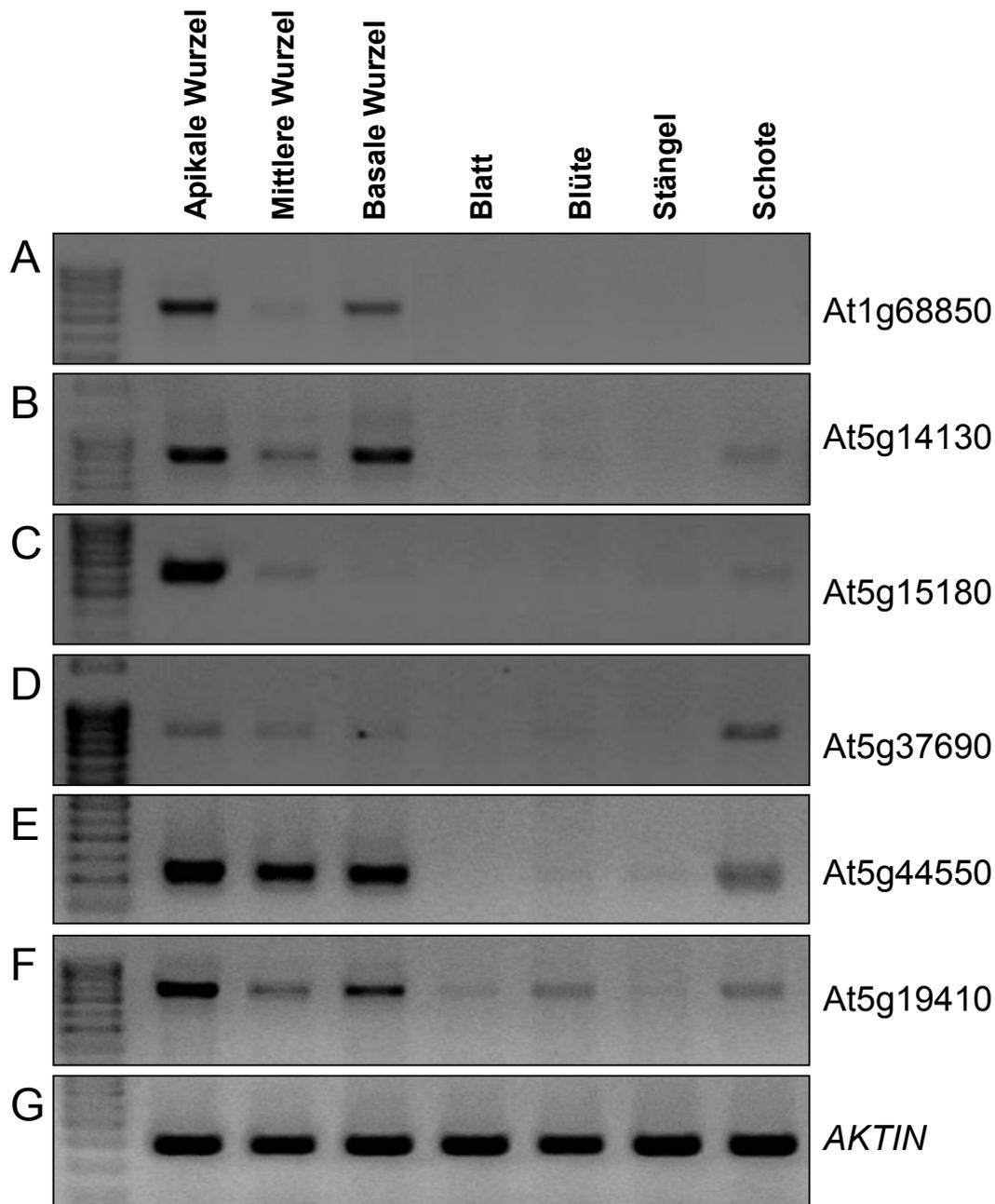


Abbildung 19: Organspezifische Expressionsstudien von Genen mit einer potenziellen Funktion in der Suberin-Biosynthese in *Arabidopsis thaliana*

Expression der Peroxidase-Gene At1g68850 (A), At5g14130 (B) und At5g15180 (C), der GDSL-Lipase At5g37690 (D), des integralen Membranproteins At44550 (E) und des ABC-Transporters At5g19410 (F) in den unterschiedlichen Organen des *Arabidopsis thaliana* Wildtyps. Als Kontrolle diente hier das konstitutiv exprimierte *AKTIN*-Gen (G).

In einem weiteren Ansatz zur Identifikation von Kandidatengenomen mit Beteiligung an der Suberinbiosynthese wurde speziell auf die Cytochrom-P450-Monooxygenasen der CYP86-Familie und der CYP94-Familie eingegangen. Eine schematische Übersicht der Genloci der Kandidatengene ist in Abbildung 20 dargestellt. Als Kontrolle diente hier die Expression des konstitutiv exprimierten Gens *AKTIN* (Abbildung 21 F). Wie in Abbildung 21 (A) zu sehen, zeigte *CYP86C2* in allen Geweben der Pflanze eine Expression außer in Blattgeweben. *CYP86C2* war maximal exprimiert im Stängel. *CYP86A4* (Abbildung 21 B) zeigte ein vergleichbares Expressionsmuster. Auch hier konnte keine Expression in Blattgeweben festgestellt werden. Eine maximale Expression war hier in den Geweben der Schote lokalisiert. Auch in den Geweben des Stängels fand eine Expression von *CYP86A4* statt. *CYP94D2* (Abbildung 21 D) wurde in allen untersuchten oberirdischen Organen sowie im basalen, an das Hypokotyl angrenzenden Teil der Wurzel exprimiert. In den Geweben der mittleren Wurzel und der Wurzelspitze konnte hier eine schwache Expression gezeigt werden. *CYP94B1* zeigte maximale Expression im Stängel. Geringere Expressionslevel konnten in den Blütengeweben und in Geweben der Wurzelbasis nachgewiesen werden. Alle anderen untersuchten Organe zeigten eine schwache Expression von *CYP94B1*. *CYP94B2* (Abbildung 21 E) zeigte ein Expressionsmaximum in den Geweben der Wurzelspitze und war sowohl im Stängel als auch in der Schote nicht nachweisbar. In allen anderen untersuchten Organen konnte eine sehr schwache Expression festgestellt werden.

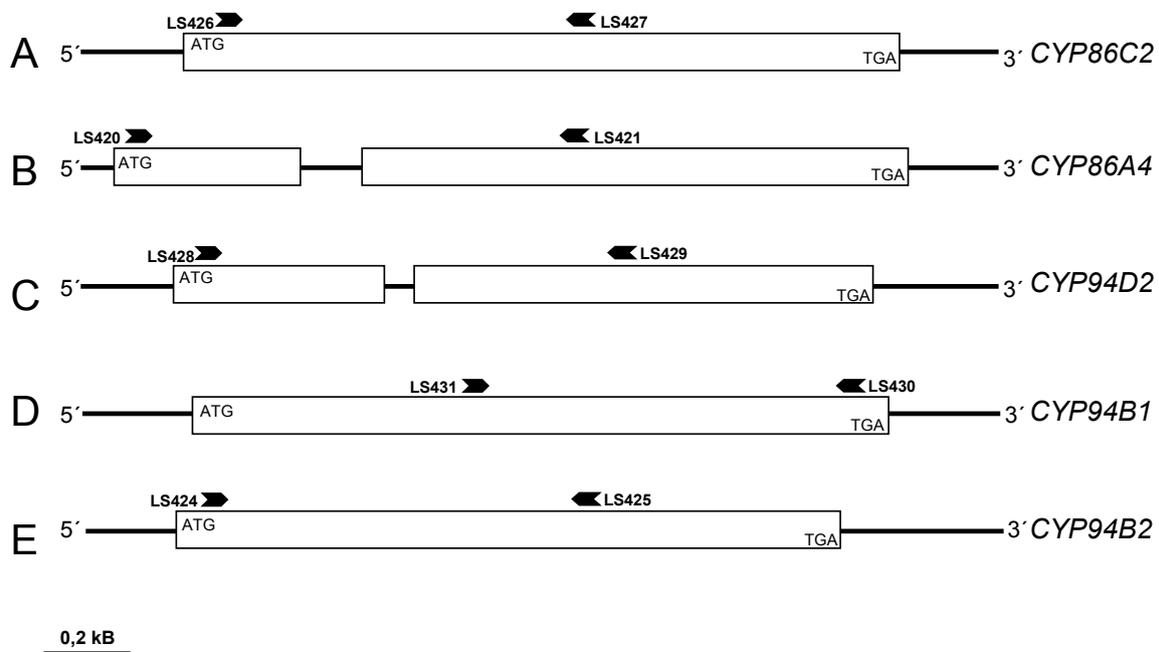


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Cytochrom-P450-Monooxygenasen mit potenzieller Funktion in der Suberinbiosynthese

Schematische Darstellung des Genlocus von *CYP86C2* (A), *CYP86A4* (B), *CYP94D2*, (D): *CYP94B1* (C) und *CYP94B2* (E). Gezeigt ist der Aufbau des jeweiligen Gens von 5' nach 3'. Boxen kennzeichnen Exons, Pfeile kennzeichnen Primer zur Darstellung der organspezifischen Expression in *Arabidopsis thaliana*, wie in Abbildung 21 gezeigt.

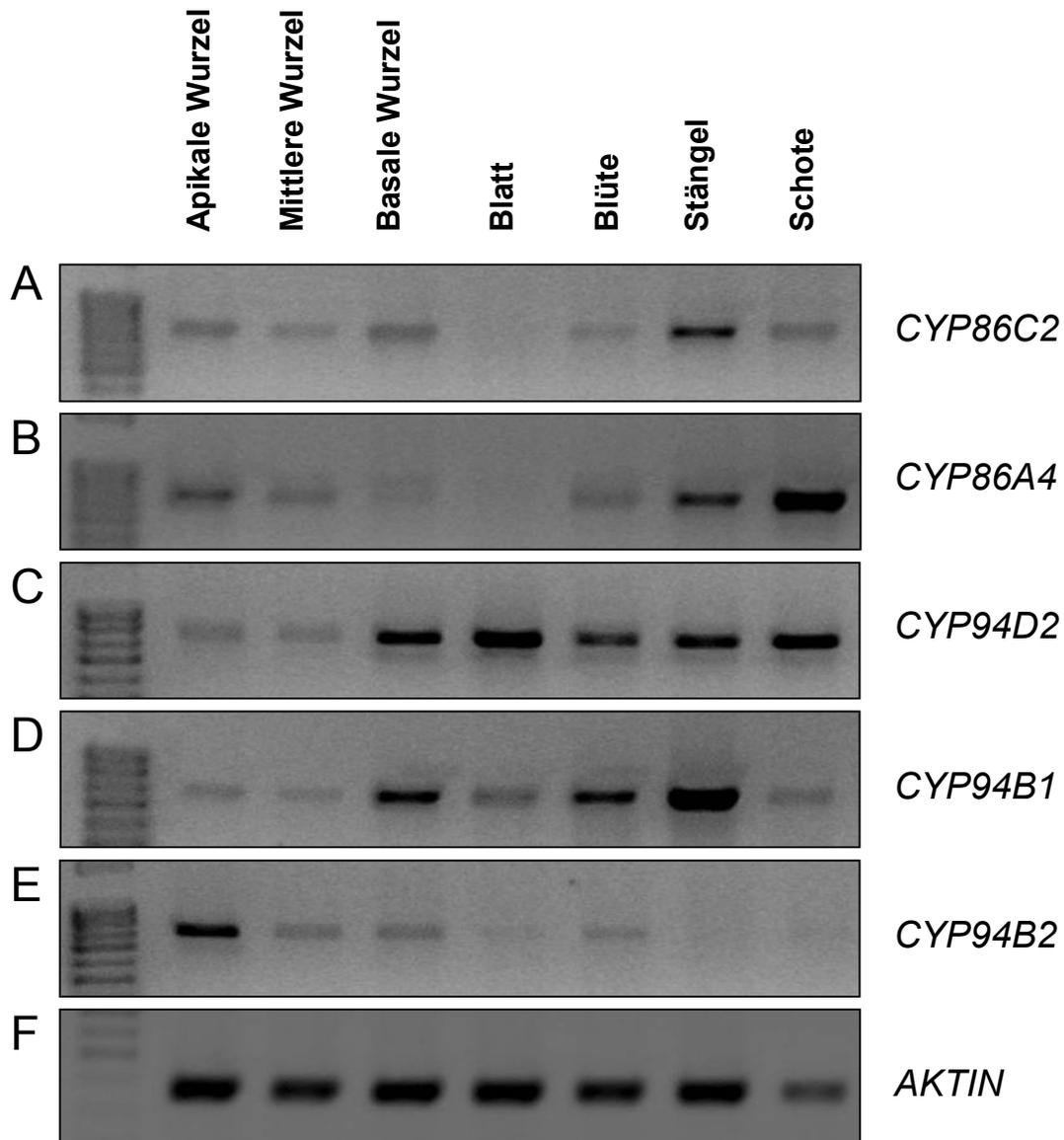


Abbildung 21: organspezifische Expressionsstudien von Cytochrom-P450-Monooxygenasen der CYP86 und CYP94 Familie in *Arabidopsis thaliana*

Expression der Gene *CYP86C2* (A), *CYP86A4* (B), *CYP94D2*, (D): *CYP94B1* (C) und *CYP94B2* (E) in den unterschiedlichen Organen des *Arabidopsis thaliana* Wildtyps. Als Kontrolle diente hier das konstitutiv exprimierte *AKTIN*-Gen (F).

3.3 Charakterisierung von CYP86B1/RALPH in *Arabidopsis*

3.3.1 Lokalisation von CYP86B1/RALPH in den Geweben der Wurzel

Zur Visualisierung der gewebespezifischen Lokalisation von CYP86B1/RALPH wurden *Arabidopsis* Wildtyp Pflanzen mit einem Fusionskonstrukt aus der putativen Promotorregion des Gens *RALPH*, der genomischen Sequenz von *RALPH* und einem 3'-terminalen GFP (Grün-Fluoreszierendes Protein) transformiert. Die Herstellung der Transformationsvektoren wurde in 2.7.1 und 2.7.2 beschrieben. Die Transformation von *E. coli*, *A. tumefaciens* und *A. thaliana* mit dem jeweiligen Konstrukt erfolgte wie in 2.7.3, 2.7.4 und 2.7.7 vermerkt.

Positiv transformierte Pflanzen wurden auf Hygromycin haltigem MS-Agar (7.1) selektiert, im Alter von 15 Tagen aus dem Agar entnommen, mit demineralisiertem Wasser vorsichtig gereinigt, als ganze Wurzel auf einen Objektträger aufgelegt und im Hellfeld und mittels Fluoreszenzmikroskopie betrachtet (Filterset: Anregungsfilter 450-490 nm, Strahlteiler FT 510 nm, Sperrfilter 515-565 nm). Die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung ganzer Wurzeln sind in Abbildung 22 gezeigt. Abbildung 22 (A), (C), (E) und (G) zeigen die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, (B), (D), (F) und (H) die korrespondierenden Hellfeldaufnahmen von unterschiedlichen Bereichen der Wurzel. Abbildung 22 (I) und (J) zeigen parallel angezogene und mikroskopierte mit einem GFP-Konstrukt transformierte *PHOT1::GFP* Linien als Positivkontrolle. *PHOT1* codiert für eine Photorezeptor-Kinase, welche in der Blaulichterkennung involviert ist (Sakamoto und Briggs, 2002; Wan *et al.*, 2008). Abbildung 22 (K) und (L) zeigen die Wurzelspitze einer Wildtyppflanze ohne GFP-Konstrukt.

In Abbildung 22 (A), (C), (E), und (G) konnte ein grünes Fluoreszenzsignal detektiert werden. In Abbildung 22 (A) ist zu erkennen, dass die Detektion des Fluoreszenzsignals auf innere Bereiche der Wurzelspitze begrenzt war. Die Fluoreszenz war nicht einheitlich über die Wurzelspitze verteilt, sondern in bestimmten Regionen konzentriert. In den Bereichen der Wurzelhaarzone in Abbildung 22 (C) und (G) wurde die Lokalisation des GFP-Signals deutlicher. Das Fluoreszenzsignal war in länglich geformten Zellen lokalisiert, welche den Zentralzylinder umgaben. Auch hier war das Fluoreszenzsignal ungleichmäßig verteilt und auf einzelne Zellen eines Gewebes begrenzt, während direkt benachbarte Zellen keine Fluoreszenz aufwiesen. Das Auftreten der Fluoreszenz in der Wurzelspitze der Seitenwurzel war vergleichbar mit der Verteilung der Fluoreszenz in der Spitze der Hauptwurzel in Abbildung (A). Auch hier wurde eine lückenhafte Fluoreszenz in den inneren Geweben der Wurzelspitze nachgewiesen. Die Fluoreszenz in Abbildung 22 (C) und (G) und deren korrespondierende Hellfeldaufnahmen (D) und (H) deuten auf eine Lokalisation nahe, jedoch nicht innerhalb des Zentralzylinders hin. Die längliche und flache Form der Zellen, in denen ein Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte, schloss eine Lokalisation in Zellen des

Cortex aus. Eine Lokalisation in den Leitbündeln konnte anhand der in Abbildung 22 (G) und (H) gezeigten Hellfeldaufnahmen ebenfalls ausgeschlossen werden. Die hier dargestellten Ergebnisse deuten eine Endodermis-spezifische Lokalisation des Genproduktes von *RALPH* an.

Die Tatsache, dass das hier eingebrachte Fusionskonstrukt unter seinem nativen Promotor exprimiert wurde, aber dennoch ein teils intensives Fluoreszenzsignal emittierte, weist auf eine starke Expression des Gens *RALPH* in jungen Geweben der Wurzel von *Arabidopsis thaliana* hin.

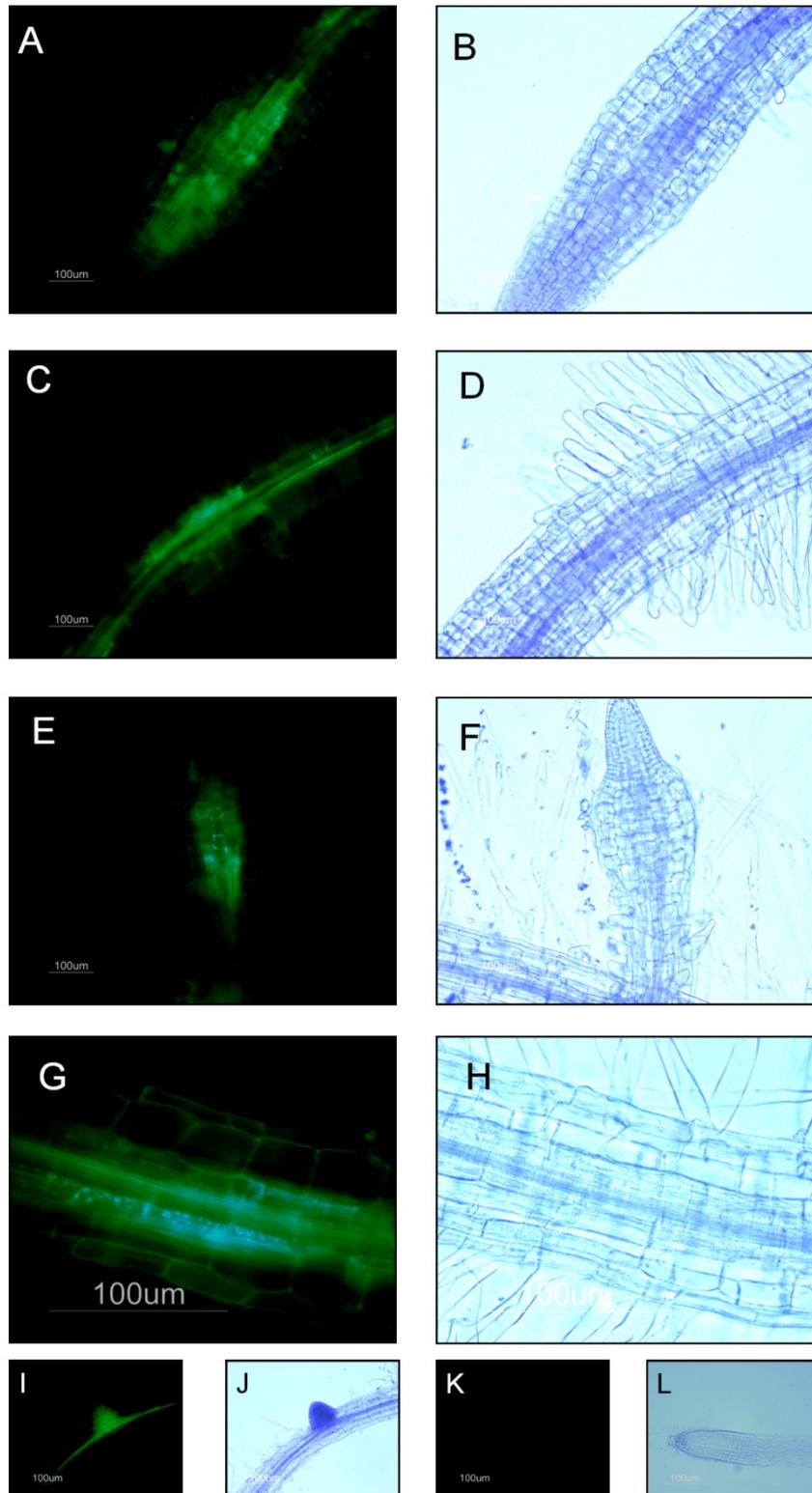


Abbildung 22: Mikroskopische Untersuchung der Wurzel von transformierten *Arabidopsis thaliana*

Das Genkonstrukt von *CYP86B1* wurde mit GFP fusioniert, in die Pflanze eingebracht und unter dem nativen Promotor von *CYP86B1* exprimiert. Aufnahme der Wurzelspitze im Fluoreszenzmikroskop (A) und im Hellfeld (B). Fotografische Aufnahme der Wurzelhaarzone im Fluoreszenzmikroskop (C) und im Hellfeld. (D). Darstellung einer jungen Seitenwurzel im Fluoreszenzmikroskop (E) und im Hellfeld (F). Detailaufnahme eines Abschnittes der Wurzelhaarzone im Fluoreszenzmikroskop (G) und im Hellfeld. (H). (I) zeigt als Positivkontrolle das Emissionssignal von GFP in der transformierten *PHOT1::GFP* Pflanzenlinie. (J) Korrespondierende Aufnahme im Hellfeld. (K) und (L) zeigen als Negativkontrolle die Wurzelspitze eines *Arabidopsis* Wildtyps im Fluoreszenzmikroskop und im Hellfeld.

3.3.2 Analyse des Wurzeluberins von *cyp86B1/ralph* Mutanten

Die hier analysierten Pflanzenlinien weisen Mutationen des Gens *CYP86B1* auf. Das erste Allel stellt eine Transposon-Insertionslinie dar (SM.37066) und wird im Folgenden als *ralph-1* oder *cyp86B1-1* benannt. Die *ralph-2* oder *cyp86B1-2* genannte Linie entspricht einer T-DNA-Insertionslinie im Gen *CYP86B1* (SALK_130265), die Linien *ralph-3*, beziehungsweise *cyp86B1-3* und *ralph-4*, beziehungsweise *cyp86B1-4* tragen ein RNA-Interferenz-Konstrukt (RNAi), welches über gentechnische Methoden in eine Wildtyp-Pflanze eingebracht wurde. Das Einbringen des RNAi-Konstrukts in *Arabidopsis thaliana* und die anschließende Detektion der Genexpression von *CYP86B1/RALPH* in beiden transgenen Linien erfolgte in der Arbeitsgruppe "Cytochromes-P450" am "Institut de Biologie Moleculaire des Plantes, CNRS, Universität Strasbourg, Frankreich" unter der Leitung von Dr. Frank Pinot.

Die Ernte des Wurzelmaterials erfolgte 35 Tage nach Aussaat der Pflanzen in Hydrokultur, die Aufarbeitung des Wurzelmaterials erfolgte wie in 2.10.4 beschrieben. Die Umesterungsreaktion wurde hier wie in 2.10.6.1 beschrieben mit methanolischer Salzsäure durchgeführt. Die Analyse des Wurzeluberins erfolgte wie in 2.10.8 beschrieben. Jedem Datenpunkt liegen 3 parallele Einzelanalysen zugrunde. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Die Analyse der Insertionsmutante *cyp86B1-1/ralph-1* war Gegenstand einer vorangegangenen Arbeit und wird hier nicht gesondert aufgeführt.

Es konnten in allen untersuchten Linien 18 dem Wurzeluberin von *Arabidopsis thaliana* zugehörige Monomere identifiziert und in Bezug zum Trockengewicht des Wurzelmaterials quantifiziert werden. Die identifizierten Monomere konnten den Stoffklassen der Monocarbonsäuren, der primären Alkohole, der ω -Hydroxysäuren und der α,ω -Disäuren zugeordnet werden. Die Ergebnisse der Analyse der Wurzeluberin-Zusammensetzung sind in Abbildung 23 und Abbildung 24 grafisch dargestellt. Eine Auflistung der Ergebnisse ist Tabelle 13 und Tabelle 14 in Kapitel 7.4 zu entnehmen.

Im *Arabidopsis thaliana* Wildtyp konnten $10,99 \pm 1,23 \mu\text{g}$ aliphatische Suberinmonomere pro mg Trockengewicht nachgewiesen werden (Abbildung 23 B). Die prominenteste Stoffklasse ist die Klasse der ω -Hydroxysäuren mit einem relativen Anteil von 55 %, gefolgt von der Stoffklasse der α,ω -Disäuren mit einem relativen Anteil von 25 % am Gesamtuberin. Monocarbonsäuren waren mit 14 %, langkettige Alkohole mit etwa 6 % am Suberin des Wildtyps beteiligt (Abbildung 24 B). Die prominenteste Verbindung im aliphatischen Suberin des Wildtyps war die einfach ungesättigte C_{18} ω -Hydroxysäure. Mit $3,61 \pm 0,42 \mu\text{g}/\text{mg}$ Trockengewicht war sie mit etwa 33 % an der Bildung des aliphatischen Suberins beteiligt. Die einfach ungesättigte C_{18} α,ω -Disäure war die zweithäufigste Verbindung. Mit $1,42 \pm 0,18 \mu\text{g}/\text{mg}$ Trockengewicht bildete sie 13 % des aliphatischen Suberins in Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* (Abbildung 23 A, Abbildung 24 A).

In den hier untersuchten Mutantenallelen des Gens *CYP86B1* konnten in Bezug auf die Gesamtmenge des aliphatischen Suberins für die *knockout* Linie *ralph-2* signifikante Unterschiede festgestellt werden. Mit $14,33 \pm 0,94 \mu\text{g}/\text{mg}$ war deutliche Akkumulation des Suberingehaltes feststellbar. In der Gesamt-Suberinmenge der RNAi-Linien *ralph-3* und *ralph-4* konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 23 B)

Eine Betrachtung der absoluten und relativen Verteilung der einzelnen Stoffklassen zeigte Veränderungen in der Zusammensetzung des Suberins aller Mutantenlinien. Die Stoffklasse der ω -Hydroxysäuren zeigte in allen untersuchten *ralph*-Linien einen verringerten relativen Anteil am Gesamtsuberin (*ralph-2* = 47 %, *ralph-3* = 54 %, *ralph-4* = 50 %). Ursächlich dafür war eine teilweise hochsignifikante Reduktion der C_{22} und C_{24} ω -Hydroxysäuren im Polymer. Ein vergleichbarer Effekt war auch bei den α,ω -Disäuren gleicher Kettenlänge zu beobachten. Im Gegensatz dazu konnte in allen hier untersuchten Genotypen eine, zumindest tendenzielle, Akkumulation der C_{22} Monocarbonsäure nachgewiesen werden (*ralph-2* = 14 %, *ralph-3* = 11 %, *ralph-4* = 12 %).

Die genannten Änderungen in der Monomerverteilung des Wurzelsuberins zeigten die größte Ausprägung in der *knockout* Linie *cyp86B1-2* (*ralph-2*). Die mittels RNA-Interferenz in der Genexpression von *CYP86B1* runterregulierten Linien *cyp86B1-3* (*ralph-3*) und *cyp86B1-4* (*ralph-4*) wiesen eine intermediäre Suberinkomposition zwischen dem Wildtyp und der *knockout* Mutante *ralph-2* auf. Die Ergebnisse der Analyse des Wurzelsuberins der Linie *cyp86B1-2/ralph-2* decken sich mit den Ergebnissen der Wurzelsuberin-Analyse der *knockout* Linie *cyp86B1-1/ralph-1* (Diehl, 2008).

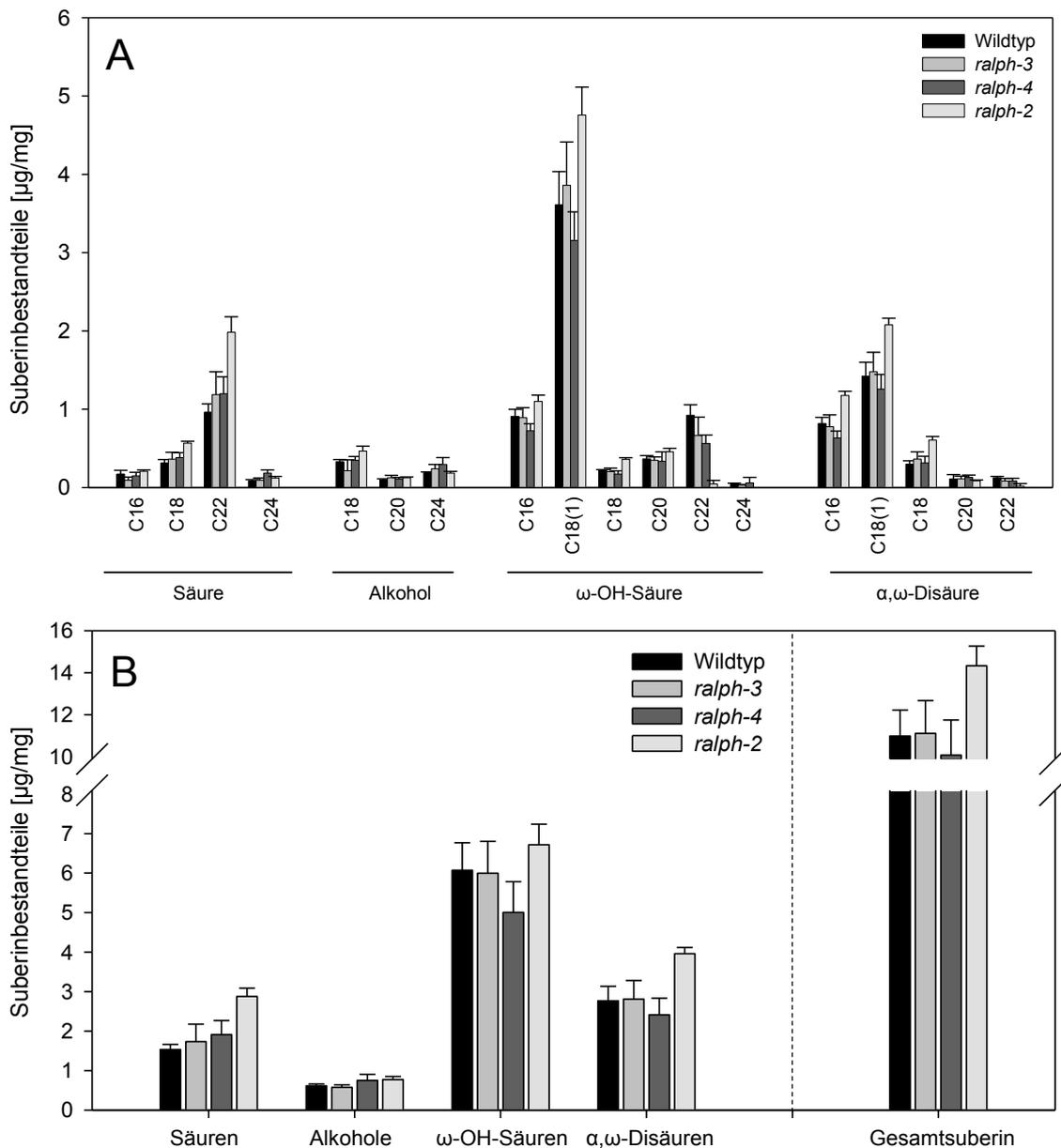


Abbildung 23: Vergleich der Monomerzusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins der *knockout* Mutante *ralph-2* sowie den RNAi-Linien *ralph-3* und *ralph-4* und des Wildtyps

(A): Darstellung der absoluten Verteilung von Monomeren des aliphatischen Wurzelsuberins des *Arabidopsis* Wildtyps und der Mutantenlinien *ralph-2*, *ralph-3* und *ralph-4* bezogen auf das Trockengewicht des Wurzelmaterials. (B): Absolute Verteilung der Stoffklassen und Darstellung des Gesamtsuberins des Wildtyps und der Mutantenlinien *ralph-2*, *ralph-3* und *ralph-4* im Suberinpolymer. Dargestellt ist das arithmetische Mittel aus 3 parallelen Analysen \pm Standardabweichung. Mit Säure = Monocarbonsäure; Alkohol = primärer Alkohol; ω-OH-Säure = ω-Hydroxysäure; α,ω-Disäure = α,ω-Dicarbonsäure

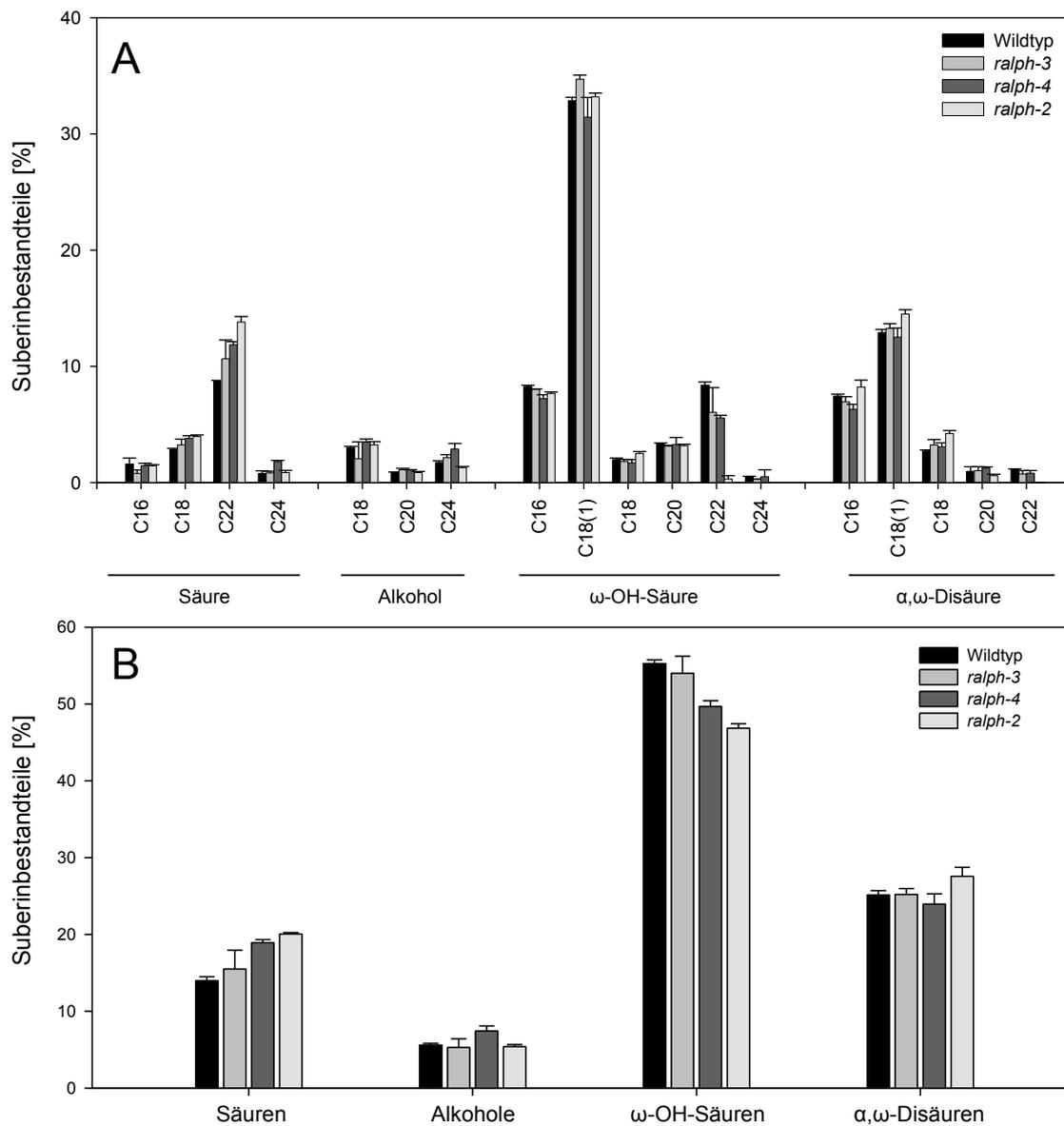


Abbildung 24: Vergleich der relativen Monomierzusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins der *knockout* Mutante *ralph-2* sowie den RNAi-Linien *ralph-3* und *ralph-4* und des Wildtyps

(A): Darstellung der relativen Verteilung von Monomeren des aliphatischen Wurzelsuberins des *Arabidopsis* Wildtyps und der Mutantenlinien *ralph-2*, *ralph-3* und *ralph-4*. (B): Relative Verteilung der Stoffklassen des Wildtyps und der Mutantenlinien *ralph-2*, *ralph-3* und *ralph-4* im Suberinpolymer. Dargestellt ist das arithmetische Mittel aus 3 parallelen Analysen \pm Standardabweichung. Mit Säure = Monocarbonsäure; Alkohol = primärer Alkohol; ω -OH-Säure = ω -Hydroxysäure; α,ω -Disäure = α,ω -Dicarbonsäure

3.3.3 Analyse der des Samenschalenpolyesters von *cyp86B1/ralph* Mutanten

Die Aufbereitung von isoliertem Samenschalenmaterial der *knockout* Mutanten *cyp86B1-1/ralph-1* und *cyp86B1-2/ralph-2* sowie der RNA-Interferenzlinien *cyp86B1-3/ralph-3* und *cyp86B1-4/ralph-4* und des Wildtyps wurde wie in 2.10.5 beschrieben durchgeführt. Die hier durchgeführte Umesterung zur Freisetzung der Monomere aus dem Samenschalenpolyester erfolgte mit methanolischer Salzsäure wie in 2.10.6.1 beschrieben. Die Quantifizierung und Qualifizierung der Monomere des isolierten Samenschalenpolyesters mittels GC-MS und GC-FID erfolgte wie in 2.10.8 beschrieben. Den dargestellten Mittelwerten liegen jeweils 4 parallele Einzelanalysen zugrunde. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Es konnten in allen untersuchten Linien 14 dem Samenschalenpolyester von *Arabidopsis thaliana* zugehörige Monomere identifiziert und bezogen auf das Trockengewicht des Samenschalenmaterials quantifiziert werden. Die einzelnen Monomere wurden den Stoffklassen der Monocarbonsäuren, der primären Alkohole, der ω -Hydroxysäuren und der α,ω -Disäuren zugeordnet. Die Analyseergebnisse sind in Abbildung 25 grafisch dargestellt. Eine Auflistung der Einzelwerte ist Tabelle 15 und Tabelle 16 zu entnehmen.

Aus der Samenschale des Wildtyps konnten insgesamt $2,18 \pm 0,87 \mu\text{g}/\text{mg}$ Monomere des Samenschalenpolyesters extrahiert werden. Im Vergleich der Mutantenlinien mit dem Wildtyp konnten im Bezug auf die Gesamtmenge an Polyesterbestandteilen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Der relative Anteil an ω -Hydroxysäuren betrug im Wildtyp etwa 36,5 % und bildete hier mit $0,81 \pm 0,36 \mu\text{g}/\text{mg}$ die Hauptstoffklasse, gefolgt von den α,ω -Disäuren mit 33,9 %. Primäre Alkohole waren mit 15,7 % und Monocarbonsäuren mit 13,9 % am Aufbau des Polyesters beteiligt (Abbildung 25 C). Im Vergleich der Stoffklassenzusammensetzung der untersuchten Mutantenlinien mit der des Wildtyps konnten in allen Linien signifikante Unterschiede festgestellt werden. Alle Mutanten zeigten eine Akkumulation von Monocarbonsäuren in ihrem Polyester, basierend auf einer Akkumulation der C_{22} und C_{24} Monocarbonsäuren (Abbildung 25 A). Der relative Anteil der Monocarbonsäuren am Gesamtpolymer betrug bei *ralph-3* 25 %, bei *ralph-4* 28 %, bei *ralph-2* 55 % und bei *ralph-1* 62 %. Gleichzeitig wurde in allen Linien eine Reduktion an ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren detektiert. Die Reduktion dieser beiden Stoffklassen war bedingt durch teilweise hochsignifikante Reduktion der C_{22} und C_{24} Monomere dieser Stoffklassen. Der Gehalt an ω -Hydroxysäuren betrug bei *ralph-3* 29 %, bei *ralph-4* 31 %, bei *ralph-2* 15 % und bei *ralph-1* 12 %. Die relative Menge an α,ω -Disäuren wurde bei *ralph-3* auf 21 %, bei *ralph-4* auf 15 %, bei *ralph-2* auf 7 % und bei *ralph-1* auf 6 % beziffert. Im Samenschalenpolyester des Wildtyps stellten die C_{24} α,ω -Disäure mit $0,56 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{mg}$ und die C_{24} ω -Hydroxysäure mit $0,46 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{mg}$ die Hauptkomponenten dar (Abbildung 25 B).

Sie sind hier mit 26.2 %, beziehungsweise 20,8 % am Gesamtpolymer beteiligt. In *ralph-1* und *ralph-2* wurden die C₂₄ α,ω-Disäure und die C₂₄ ω-Hydroxysäure von der C₂₄ Monocarbonsäure als Hauptkomponente ersetzt. Die C₂₄ Monocarbonsäure war hier mit 48 %, beziehungsweise 39 % am Gesamtpolymer beteiligt (Abbildung 25 C).

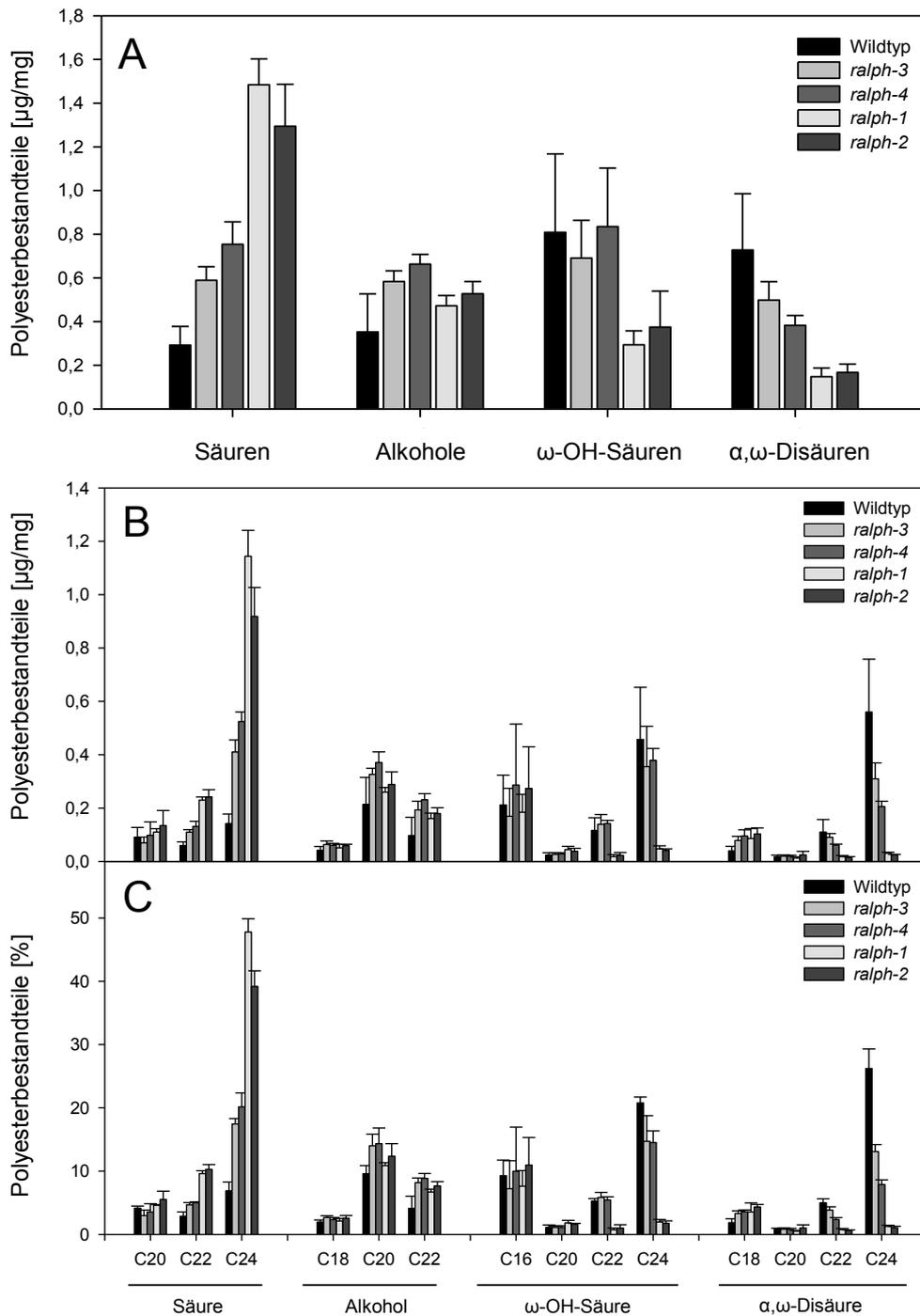


Abbildung 25: Vergleich der Zusammensetzung des Samenschalenpolyesters der *knockout* Mutanten *ralph-1* und *ralph-2*, der RNAi-Linien *ralph-3* und *ralph-4* und des korrespondierenden Wildtyps

(A): Absolute Verteilung der Substanzklassen des Samenschalenpolyesters bezogen auf das Trockengewicht extrahierter Samenschalen. (B): Absolute Verteilung der Monomierzusammensetzung bezogen auf das Trockengewicht extrahierter Samenschalen. (C): Relative Verteilung der Monomierzusammensetzung des Samenschalenpolyesters von *Arabidopsis thaliana*. Gezeigt ist das arithmetische Mittel aus 4 parallelen Einzelanalysen \pm Standardabweichung. Mit Säure = Monocarbonsäure, Alkohol = primärer Alkohol, ω -OH-Säure = ω -Hydroxysäure und α,ω -Disäure = α,ω -Dicarbonsäure

3.4 Charakterisierung des putativen Peroxidase POX in *Arabidopsis*

Bei der *in silico*-Recherche nach Genen mit potenzieller Beteiligung an der Suberinbiosynthese konnte unter anderem At1g68850 als Kandidat identifiziert werden. Aufgrund des hohen Grades an Koregulation und Koexpression zu dem in der Suberinbiosynthese beteiligten Genprodukt von *CYP86B1/RALPH* (Abbildung 26) sollte dieses Gen in Bezug auf eine Beteiligung an der Biosynthese des Wurzelsuberins und des Samenschalenpolyesters charakterisiert werden.

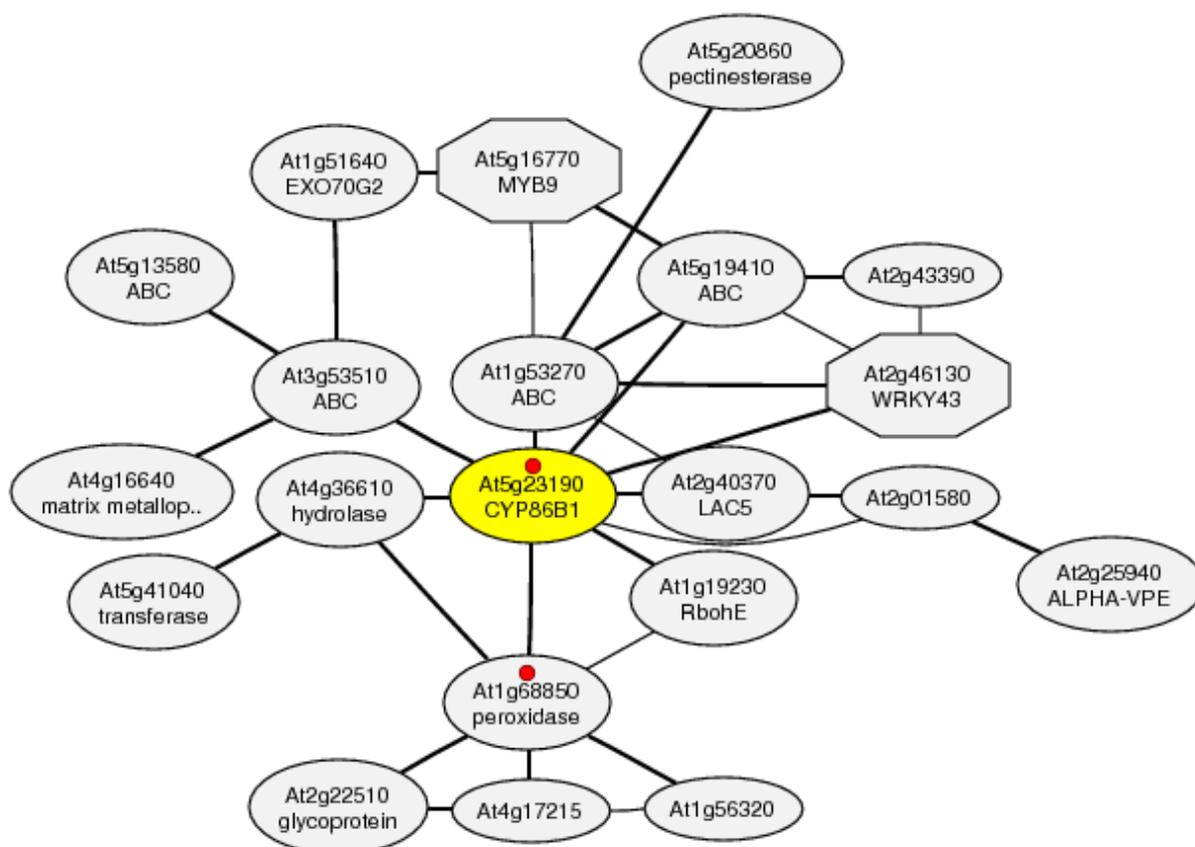


Abbildung 26: Ergebnisse der *in silico* Koexpressions-Analyse mittels ATTED-II

Darstellung der Koexpressions-Analyse für *CYP86B1/RALPH* mittels ATTED-II (<http://atted.jp/>). *CYP86B1/RALPH* und At1g68850 unterliegen hier einer direkten Koregulation. Beiden Genprodukten wird eine Beteiligung an einem gemeinsamen biochemischen Stoffwechselweg zugesprochen (roter Punkt).

3.4.1 Generierung homozygoter *pox* Mutanten

Die Samen der heterozygoten T-DNA-Insertionsmutantenlinie SALK_053160.41.15.x im Gen At1g68850, im Folgenden *POX* genannt, wurden über das *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC) bezogen und auf Erde wie in 2.3.1 beschrieben angezogen. Im Alter von 2 Wochen wurde Blattmaterial geerntet, und die DNA der Pflanzen wie in 2.6.1 beschrieben extrahiert. Die Genotypisierung erfolgte mittels kompetitiver PCR (2.6.6). Als genspezifische Primer wurden LS498 und LS499 verwendet, als insertionspezifischer Primer diente LS347. Der schematische Aufbau des Genlocus At1g68850 ist in Abbildung 27 dargestellt. Das Ergebnis der Genotypisierung ist in Abbildung 28 gezeigt. Für das wildtypspezifische DNA-Fragment war eine Größe von 1055 bp zu erwarten. Das Insertionsmutanten-spezifische Genfragment hatte eine erwartete Produktgröße von ca. 650 bp. *POX-1* und *POX-7* konnten hier als homozygote Insertionsmutanten identifiziert werden. Nachkommen der Pflanze *POX-1* wurden für die folgenden Versuche verwendet. *POX-8* stellt eine heterozygote Insertionsmutante dar. Alle anderen genotypisierten Pflanzen tragen keine Insertion im Gen *POX*.

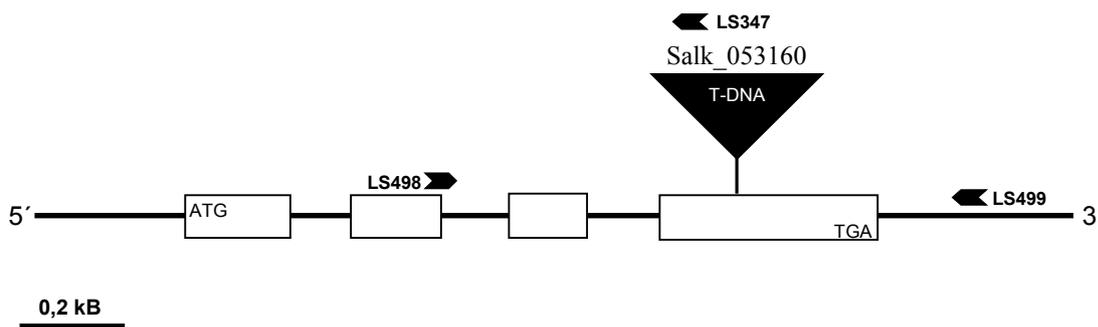


Abbildung 27: Schematische Darstellung des Genlocus der putativen Peroxidase *POX*

Darstellung des Genlocus At1g68850 von 5' nach 3'. Boxen kennzeichnen Exonbereiche des Gens, Pfeile zeigen die Lokalisation der Genotypisierungsprimer. In Schwarz dargestellt ist die Lokalisation der T-DNA-Insertion der Linie SALK_053160.41.45.x

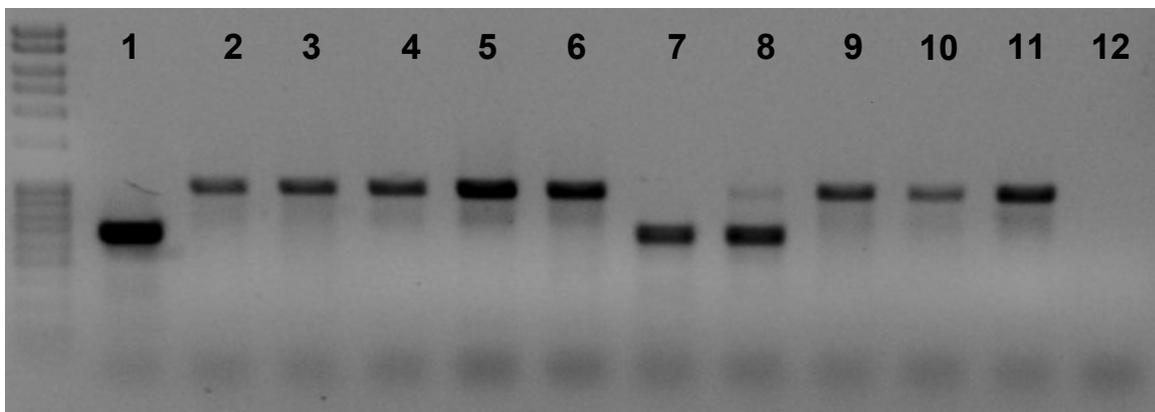


Abbildung 28: Genotypisierung potenzieller Insertionsmutanten der Linie SALK_053130.41.15.x im Gen At1g68850 (*POX*)

1-10: Genotypisierung der Pflanzen *POX-1* bis *POX-10*; 11: Positivkontrolle mit Wildtyp DNA; 12: Negativkontrolle mit Reinstwasser; Größenmarker: 100 bp extended; Erwartete Fragmentgrößen: *POX* = 1055 bp, *pox* = ca. 650 bp.

3.4.2 Analyse des Wurzeluberins der *pox* Mutante

Wurzeln des Wildtyps und der T-DNA-Insertionsmutante *pox* wurden 35 Tage nach Aussaat der Pflanzen in Hydrokultur wie in 2.10.4 beschrieben geerntet und für die nachfolgende Analyse aufbereitet. Die Umesterungsreaktion zur Depolymerisierung des Polyesters erfolgte hier mittels methanolischem Borontrifluorid (2.10.6.2). Die Analyse der Wurzeluberin-Bestandteile erfolgte mittels GC-MS und GC-FID wie in 2.10.8 beschrieben. Die hier gezeigten Ergebnisse stellen Mittelwerte aus je drei parallelen Einzelanalysen dar, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Es konnten 25 dem Wurzeluberin von *Arabidopsis thaliana* zugehörige Monomere identifiziert, in Bezug auf das Trockengewicht des Wurzelmaterials quantifiziert und den Stoffklassen der Monocarbonsäuren, der primären Alkohole, der ω -Hydroxysäuren und der α,ω -Dicarbonsäuren zugeordnet werden. Weiterhin wurden als aromatische Monomere *cis*- und *trans*-Ferulasäure identifiziert und quantifiziert. Die Ergebnisse der Analyse des Wurzeluberins sind in Abbildung 29 grafisch dargestellt. Einzelwerte der Analyseergebnisse sind Tabelle 17 und Tabelle 18 in Kapitel 7.4 zu entnehmen.

Insgesamt konnten aus der Wurzel des Wildtyps $13,32 \pm 0,15$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ Suberinmonomere isoliert werden. Der Gesamtgehalt unterschied sich nicht signifikant vom Gesamtgehalt in der Wurzel der *pox* Mutante mit $13,60 \pm 0,84$ $\mu\text{g}/\text{mg}$. Im *Arabidopsis* Wildtyp waren ω -Hydroxysäuren mit 46,7 % und α,ω -Dicarbonsäuren mit 22,7 % am Suberin beteiligt. Die relativen Anteile dieser Stoffklassen in der Mutante *pox* unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant vom Wildtyp in der untersuchten Mutantenlinie. Bei eingehender Betrachtung der aromatischen Verbindungen, der langkettigen primären Alkohole und der Monocarbonsäuren ließen sich signifikante Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp feststellen. Während in den Stoffklassen der Monocarbonsäuren und der primären Alkohole die signifikanten Unterschiede durch minimal schwankende Monomerverteilungen verursacht wurden, war für beide Ferulasäurespezies eine eindeutige Akkumulation im Suberinpolymer nachweisbar. Während in der Wurzel des Wildtyps $0,14 \pm 0,04$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ *cis*-Ferulasäure detektiert wurden, konnte in der *pox* Mutante mit $0,34 \pm 0,04$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ *cis*-Ferulasäure eine eindeutige Akkumulation nachgewiesen werden. Im Falle der *trans*-Ferulasäure konnte eine Akkumulation von $0,75 \pm 0,04$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ im Wildtyp auf $0,91 \pm 0,02$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ in der Mutante *pox* detektiert werden.

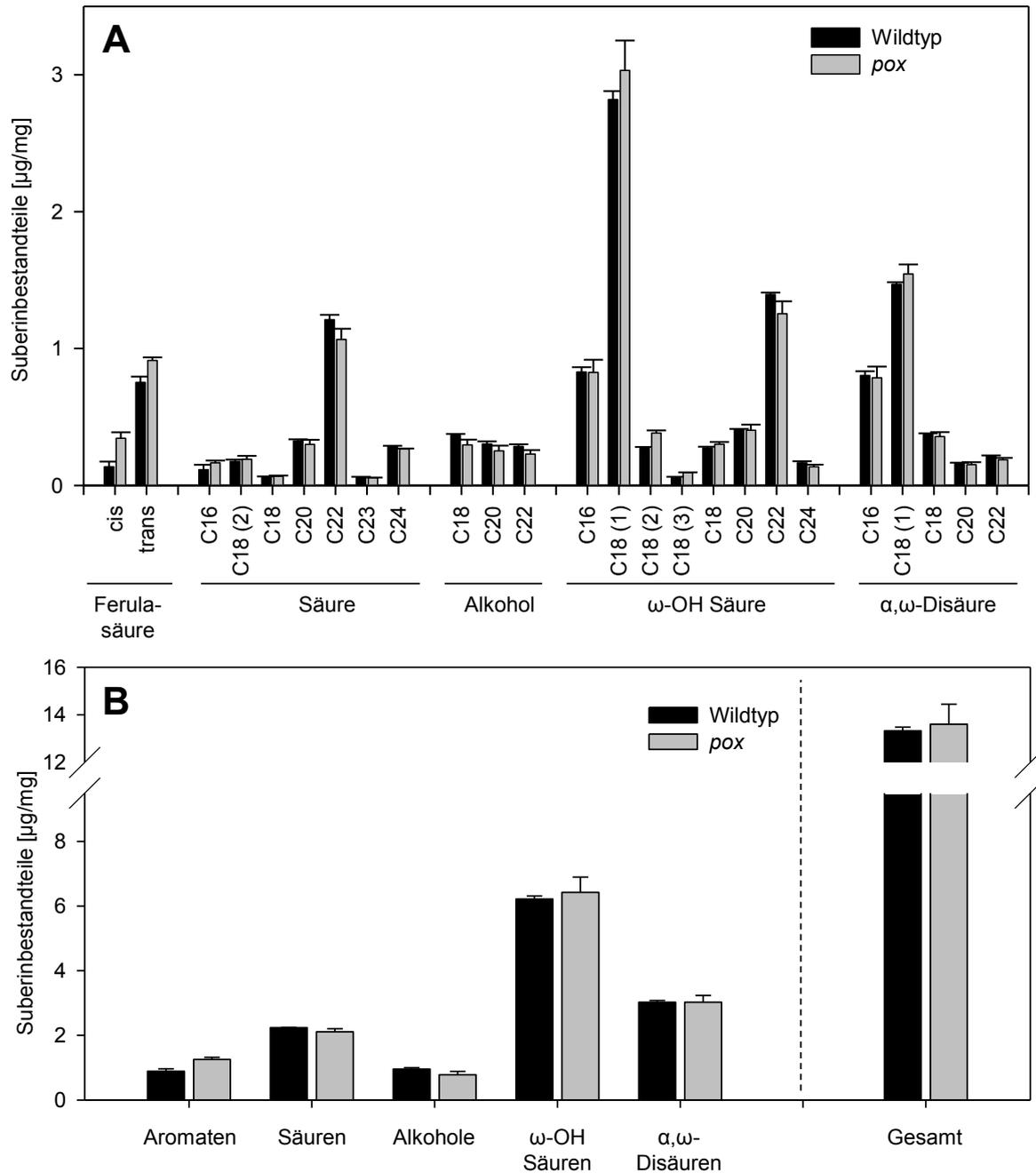


Abbildung 29: Vergleich der Zusammensetzung des Wurzelsuberins der *pox* Mutante und des korrespondierenden Wildtyps

Darstellung der absoluten Verteilung der Monomere (A) und der Stoffklassen sowie des Gesamtsuberingehalts (B) der Peroxidasemutante und des korrespondierenden Wildtyps bezogen auf das Trockengewicht des extrahierten Wurzelmaterials. Die dargestellten Werte sind arithmetische Mittelwerte aus 3 parallelen Einzelanalysen \pm Standardabweichung. Mit Säure = Monocarbonsäure; Alkohol = primärer Alkohol; ω-OH-Säure = ω-Hydroxysäure; α,ω-Disäure = α,ω-Dicarbonsäure

3.4.3 Analyse des Samenschalenpolyesters der *pox* Mutante

Reife, getrocknete Samen des *Arabidopsis thaliana* Wildtyps und der T-DNA-Insertionsmutante *pox* wurden wie in 2.10.5 beschrieben aufgeschlossen und für die Analyse vorbereitet. Die Umesterungsreaktion zur Freisetzung der Monomere des Samenschalenpolyesters erfolgte durch eine Umesterung mit Borontrifluorid (2.10.6.2). Die vorgestellten Ergebnisse basieren auf einer Analyse mit je vier parallel durchgeführten Einzelanalysen. Die dargestellten Ergebnisse zeigen Mittelwerte, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Es konnten 24 dem Samenschalenpolyester von *Arabidopsis thaliana* zugehörige Monomere identifiziert und in Bezug auf das Trockengewicht des extrahierten Samenschalenmaterials quantifiziert werden. Die identifizierten aliphatischen Monomere wiesen eine Kettenlängenverteilung von C₁₆ bis C₂₄ auf und konnten den Stoffklassen der Monocarbonsäuren, der primären Alkohole, der ω -Hydroxysäuren, der α,ω -Dicarbonsäuren und der mehrfach hydroxylierten poly-Hydroxysäuren zugeordnet werden. Als weitere Produkte der Umesterungsreaktion wurden *cis*- und *trans*-Ferulasäuren als aromatische Komponenten detektiert. Die Ergebnisse der Analyse des Samenschalenpolyesters sind in Abbildung 30 und Abbildung 31 grafisch und in Tabelle 19 und Tabelle 20 in 7.4 tabellarisch aufgeführt.

Insgesamt konnten aus den isolierten Samenschalen des Wildtyps $5,36 \pm 0,63 \mu\text{g}/\text{mg}$ Polyesterbestandteile extrahiert werden. Die Gesamtmenge der isolierten Monomere in der T-DNA-Insertionsmutante *pox* war hier mit $7,25 \pm 1,13 \mu\text{g}/\text{mg}$ signifikant erhöht. Die prominenteste Stoffklasse im Polyester der Samenschale des Wildtyps waren ω -Hydroxysäuren. Mit $1,56 \pm 0,19 \mu\text{g}/\text{mg}$ waren ω -Hydroxysäuren zu 29 % am Polyester beteiligt, gefolgt von α,ω -Dicarbonsäuren, welche mit $1,18 \pm 0,09 \mu\text{g}/\text{mg}$ 22 % zum Gesamtpolyester beitrugen. Monocarbonsäuren waren mit 18 % am Polymer beteiligt. Im Wildtyp waren aromatische Komponenten mit $0,65 \pm 0,08 \mu\text{g}/\text{mg}$ zu etwa 12 % zur Formierung des Samenschalenpolyesters beteiligt. Alkohole wiesen einen relativen Anteil von 10,3 % auf. Die zweifach und dreifach hydroxylierten Monomere, hier als poly-Hydroxysäuren beschrieben, waren mit 8,6 % Samenschalenpolyesters beteiligt.

Im Vergleich der absoluten Mengen der einzelnen Stoffklassen ist zu erkennen, dass im Polymer der Samenschale von *pox* bis auf die Stoffklasse der poly-Hydroxysäuren alle Stoffklassen in gesteigerter Menge vorlagen (Abbildung 30 B). Im Falle der aromatischen Verbindungen *trans*- und *cis*-Ferulasäure ist diese Tendenz zur Akkumulation am signifikantesten ausgeprägt. Hier konnte eine annähernde Verdoppelung der Gesamtmenge auf $1,24 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{mg}$ detektiert werden.

Eine detaillierte Analyse der Monomerverteilung im Polyester zeigte, dass sich die bei Betrachtung der Stoffklassen angedeutete Tendenz zur Akkumulation auf die einzelnen Monomere ausweiten lässt (Abbildung 30 A). Außer den mehrfach hydroxylierten

Carbonsäuren sind in *pox* fast alle Monomere in erhöhter Menge vorhanden als im Wildtyp. Hochsignifikante Akkumulationen sind zu beobachten im Falle beider Ferulasäurespezies sowie bei C₁₆ und C₁₈ ω-Hydroxysäuren.

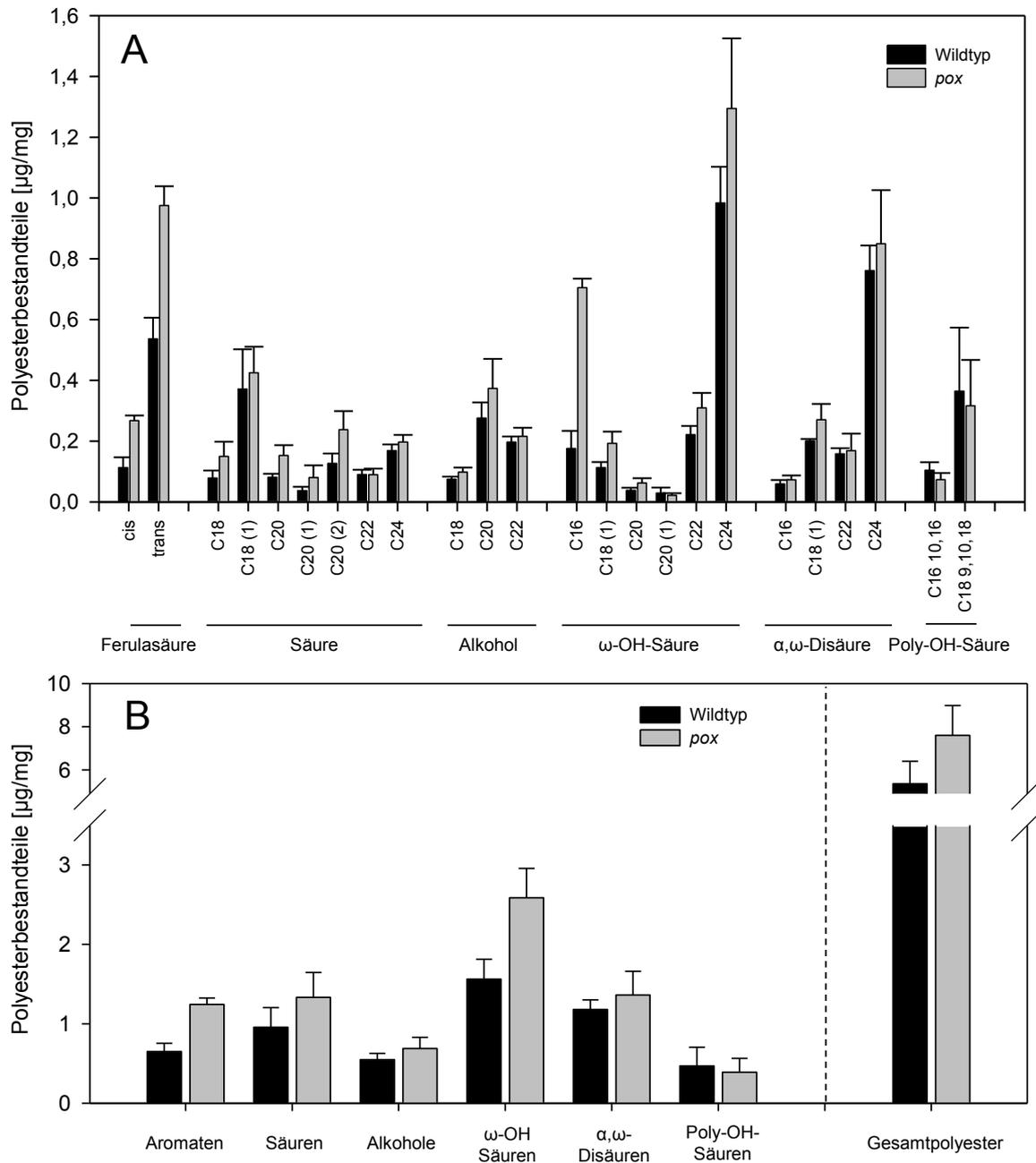


Abbildung 30: Vergleich der Zusammensetzung des Samenschalenpolyesters der *knockout* Mutante *pox* und des korrespondierenden Wildtyps

(A) Darstellung der absoluten Verteilung der Monomere und (B) der Stoffklassen sowie des Gesamtsuberingehaltes der Peroxidase mutante und des korrespondierenden Wildtyps bezogen auf das Trockengewicht des extrahierten Samenschalenmaterials. Die dargestellten Werte sind arithmetische Mittelwerte aus 4 parallelen Einzelanalysen \pm Standardabweichung. Mit Säure = Monocarbonsäure; Alkohol = primärer Alkohol; ω-OH-Säure = ω-Hydroxysäure; α,ω-Disäure = α,ω-Dicarbonsäure; Poly-OH-Säure = poly-Hydroxysäure

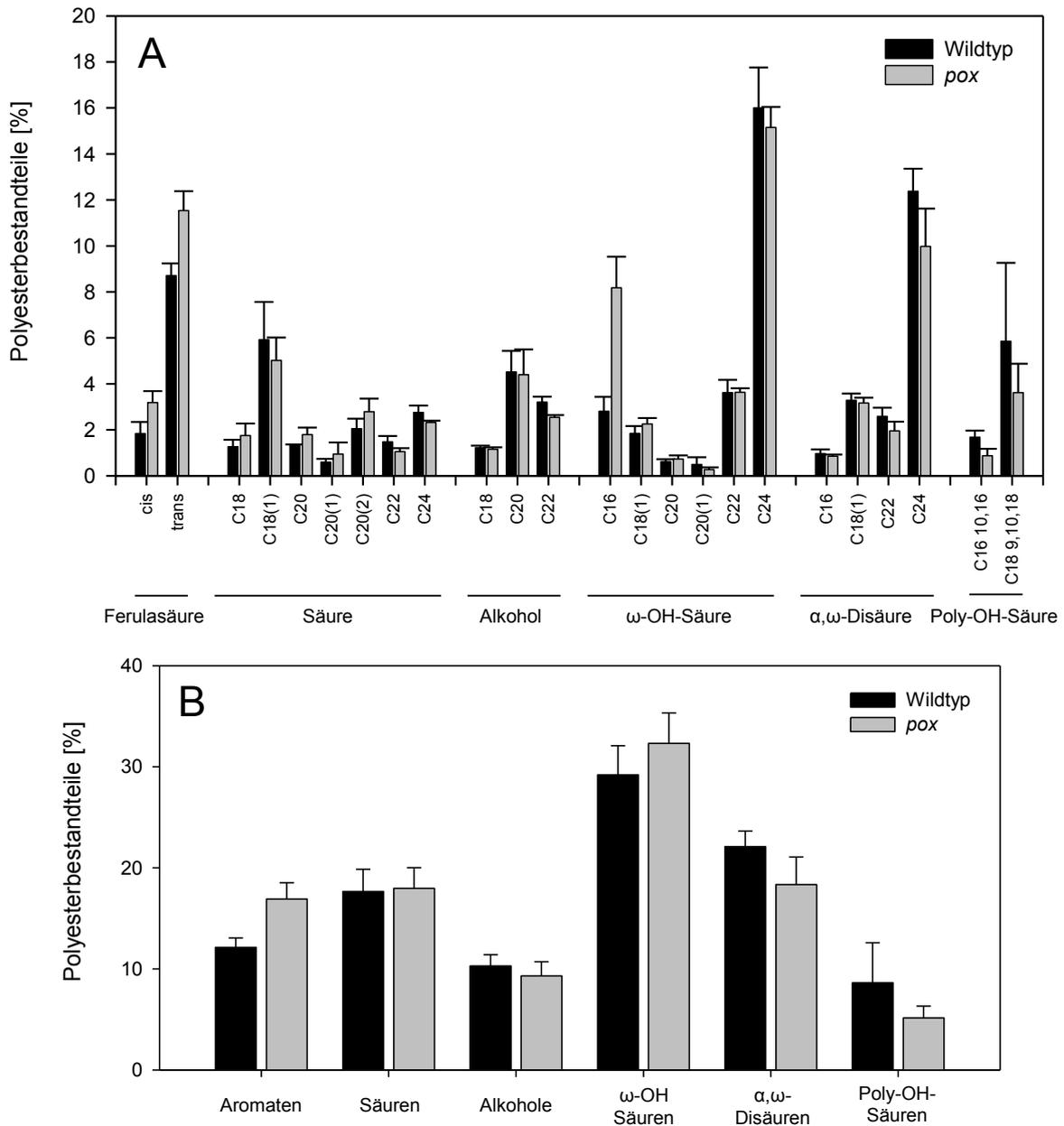


Abbildung 31: Vergleich der relativen Zusammensetzung des Samenschalenpolyesters der *knockout* Mutante *pox* und des korrespondierenden Wildtyps

(A) Darstellung der absoluten Verteilung der Monomere und (B) der Stoffklassen der Linie *pox* und des korrespondierenden Wildtyps. Die dargestellten Werte sind arithmetische Mittelwerte aus 4 parallelen Einzelanalysen \pm Standardabweichung. Mit Säure = Monocarbonsäure; Alkohol = primärer Alkohol; ω -OH-Säure = ω -Hydroxysäure; α,ω -Disäure = α,ω -Dicarbonsäure; Poly-OH-Säure = poly-Hydroxysäure

3.5 Charakterisierung der Doppelmutante *ralph/pox*

In 3.3 und 3.4 konnte gezeigt werden, dass sowohl das Genprodukt von *CYP86B1/RALPH* als auch das Genprodukt von *POX* an der Biosynthese des Wurzelsuberins und des Samenschalenpolyesters beteiligt sind. Ein Ausschalten beider Gene hat einen Einfluss auf die Komposition der beiden genannten Biopolymere. Zum besseren Verständnis der Zusammenhänge in der Biosynthese des Suberin-abgeleiteten Polyesters der Samenschale sollte hier eine Doppelmutante generiert werden, die in beiden genannten Genloci eine Insertionsmutation aufweist. Die Zusammensetzung ihres Samenschalenpolyesters sollte im Folgenden untersucht werden.

3.5.1 Generierung homozygoter Doppelmutanten *ralph/pox*

Die Generierung homozygoter Doppelmutanten in den Genloci *RALPH* (*CYP86B1*, At5g23190) und *POX* (At1g68850) erfolgte durch Kreuzung und Propagation von *knockout* Mutanten beider Gene. Die Mutante *ralph-1* (*cyp86B1-1*, SM.37066) diente hier als Pollendonator, die Mutante *pox* (SALK_053160.41.15.x) als Pollenrezipient. In der direkten Nachkommenschaft der Parentalgeneration (F_1 -Generation) konnte in allen Individuen für beide untersuchten Genloci ein uniform heterozygoter Genotyp nachgewiesen werden. Eine Segregation der Genotypen fand in der Folgegeneration statt. Die Ergebnisse der Genotypisierung von Pflanzen der F_2 -Generation ist in Abbildung 33 gezeigt. Abbildung 33 (A) zeigt die Genotypisierung des Genlocus *CYP86B1/RALPH*. Die hier verwendeten wildtypspezifischen Primer LS331 und LS332 wurden in Kombination mit dem insertionsspezifischen Primer LS186 verwendet. Das PCR-Produkt des Wildtyp-Fragments hatte eine erwartete Größe von 1030 bp, die erwartete Fragmentgröße im Falle einer Insertionsmutante betrug 474 bp. *RALPH/POX-5*, *-6*, *-7*, *-18* und *-20* konnten als homozygote *knockout* Mutanten in Bezug auf das Gen *RALPH* identifiziert werden. Die Ergebnisse der Genotypisierung des *POX*-Genlocus sind in Abbildung 33 (B) dargestellt. Als genspezifische Primer wurden LS498 und LS499 verwendet, als insertionsspezifischer Primer LS347. Für das wildtypspezifische DNA-Fragment war eine Größe von 1055 bp zu erwarten. Das Insertionsmutanten-spezifische Genfragment hatte eine erwartete Produktgröße von etwa 650 bp. Die Linien *RALPH/POX-2*, *-3*, *-5*, *-6*, *-14* und *-16* konnten hier als homozygote Knockoutlinien in Bezug auf das Gen *POX* bestimmt werden. Die Linien *RALPH/POX-5* und *RALPH/POX-6* stellen homozygote Doppelmutanten in den Genen *RALPH* und *POX* dar. Für weiterführende Versuche wurden Nachkommen der Pflanze *RALPH/POX-6*, im Folgenden *ralph/pox* genannt, verwendet.

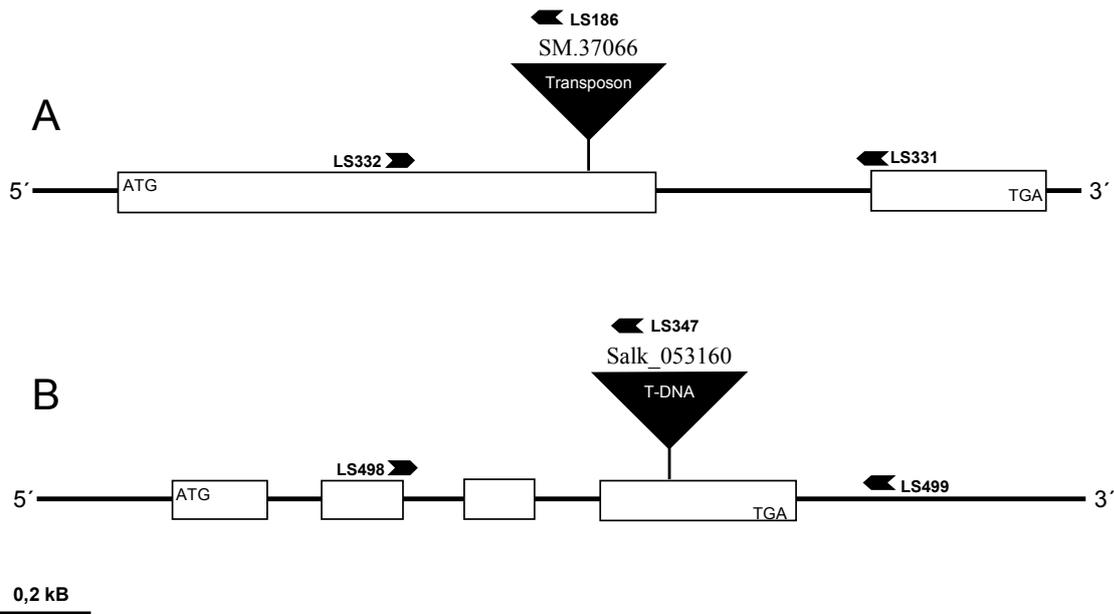


Abbildung 32: Schematische Übersicht der Genloci *CYP86B1/RALPH* (At5g23190) (A) und *POX* (At1g68850) (B)

Schematische Darstellung des Genaufbaus von 5' nach 3'. Boxen kennzeichnen Exonbereiche des jeweiligen Gens. Pfeile zeigen die Position der Genotypisierungsprimer. Schwarze Dreiecke markieren die T-DNA-, beziehungsweise Transposon-Insertionen.

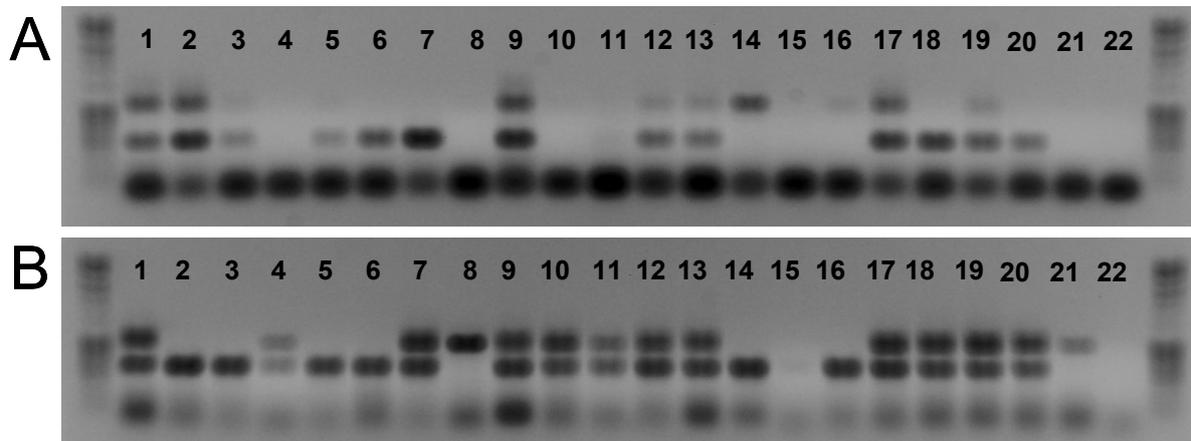


Abbildung 33: Genotypisierung putativer *ralph/pox* Doppelmutanten

1-20: Genotypisierung der potenziellen Doppelmutanten *RALPH/POX*-1 bis -20 in Bezug auf den Genotyp in *RALPH* (A) und *POX* (B); 21: Positivkontrolle mit Wildtyp-DNA; 22: Negativkontrolle mit Reinstwasser; Größenmarker: 100 bp extended; Erwartete Fragmentgrößen in (A): *RALPH* = 1030 bp, *ralph-1* = ca. 474 bp; Erwartete Fragmentgrößen in (B): *POX* = 1055 bp, *pox* = ca. 650 bp.

3.5.2 Analyse des Samenschalenpolyesters von *ralph/pox*

Ausgangsmaterial für die Analyse des Samenschalenpolyesters waren reife, getrocknete Samen der Doppelmutante *ralph/pox* und des korrespondierenden Wildtyps. Zur Isolation des Samenschalenmaterials wurden die Samen, wie in 2.10.5 beschrieben, aufbereitet. Die Umesterung erfolgte mit Borontrifluorid wie in 2.10.6.2 beschrieben. Die Analytik mittels GC-MS und GC-FID erfolgte wie in 2.10.8 beschrieben. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus je drei parallel aufbereiteten Einzelanalysen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Es konnten in dieser Analyse insgesamt 21 dem Samenschalenpolyester von *Arabidopsis thaliana* zugehörige Monomere identifiziert und in Bezug auf das Trockengewicht des extrahierten Samenschalenmaterials quantifiziert werden. Die detektierten aliphatischen Monomere gehörten den Stoffklassen der Monocarbonsäuren, der primären langkettigen Alkohole, der ω -Hydroxysäuren, der α,ω -Dicarbonsäuren und der Stoffklasse der mehrfach hydroxylierten poly-Hydroxycarbonsäuren an. Weiterhin konnten als aromatische Komponenten *trans*- und *cis*-Ferulasäuren identifiziert werden. Die Ergebnisse der Samenschalenpolyester-Analyse sind in Abbildung 34 und Abbildung 35 grafisch aufgetragen. Die Einzelwerte der Analyse sind Tabelle 21 und Tabelle 22 zu entnehmen.

Die aufsummierte Gesamtmenge an isolierten Polyesterbestandteilen betrug im Wildtyp $4,51 \pm 1,01 \mu\text{g}/\text{mg}$. In der Doppelmutante konnten insgesamt $5,31 \pm 1,39 \mu\text{g}/\text{mg}$ Samenschalenpolyesterbestandteile isoliert werden. Prominenteste Stoffklasse im Samenschalenpolyester des Wildtyps waren ω -Hydroxysäuren mit $1,68 \pm 0,47 \mu\text{g}/\text{mg}$ (37 %), und α,ω -Dicarbonsäuren mit $1,08 \pm 0,25 \mu\text{g}/\text{mg}$ (24 %). Ferulasäuren waren mit 14 % am Polyester des Wildtyps beteiligt, Monocarbonsäuren mit 11 %, mehrfach hydroxylierte Monocarbonsäuren mit 9 % und primäre Alkohole mit 6,4 %.

Die relative Verteilung der Polyesterbestandteile der Doppelmutante unterschied sich in mehreren Punkten signifikant von der des Wildtyps. Der relative Anteil der ω -Hydroxysäuren und α,ω -Dicarbonsäuren am Gesamtpolymer war hier mit 28 %, beziehungsweise 10 % im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert. Monocarbonsäuren hatten mit 28 % einen hochsignifikant erhöhten relativen Anteil am Polyester.

Die absoluten Mengen der aromatischen Bestandteile und Monocarbonsäuren waren in der Doppelmutante annähernd verdoppelt, beziehungsweise verdreifacht im Vergleich zum Wildtyp. Während im Wildtyp $0,53 \pm 0,007 \mu\text{g}/\text{mg}$ aromatische Verbindungen und $0,47 \pm 0,11 \mu\text{g}/\text{mg}$ Monocarbonsäuren nachgewiesen wurden, erhöhte sich die absolute der Menge beider Stoffklassen in der Doppelmutante auf $1,0 \pm 0,26 \mu\text{g}/\text{mg}$, beziehungsweise $1,48 \pm 0,42 \mu\text{g}/\text{mg}$. Weiterhin war eine Akkumulation der Monocarbonsäuren über das gesamte Kettenlängenspektrum zu beobachten. Signifikante, beziehungsweise

hochsignifikante Änderungen konnten für die C₂₀ und C₂₄ Monocarbonsäure nachgewiesen werden. Im Falle der *trans*-Ferulasäure ist eine annähernde Verdoppelung des absoluten Gehaltes von $0,54 \pm 0,14 \mu\text{g}/\text{mg}$ auf $0,97 \pm 0,26 \mu\text{g}/\text{mg}$ in der Doppelmutante erkennbar. In der Stoffklasse der ω -Hydroxysäuren konnte in der Doppelmutante eine signifikante Akkumulation der C₁₆ ω -Hydroxysäure festgestellt werden. Mit $0,86 \pm 0,36 \mu\text{g}/\text{mg}$ war die absolute Menge an C₁₆ ω -Hydroxysäure um den Faktor 4 erhöht im Vergleich zum Wildtyp mit $0,21 \pm 0,18 \mu\text{g}/\text{mg}$. Im Falle der zweifach ungesättigten C₁₈ ω -Hydroxysäure konnte ebenfalls eine hochsignifikante Akkumulation in der Doppelmutante nachgewiesen werden. Für C₂₂ und C₂₄ ω -Hydroxysäuren wurde in der Doppelmutante eine starke Reduktion festgestellt. Die Gesamtmenge der C₂₂ ω -Hydroxysäure ist von $0,35 \pm 0,10 \mu\text{g}/\text{mg}$ im Wildtyp auf $0,05 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mg}$ in der Doppelmutante etwa um den Faktor 7 reduziert, die C₂₄ ω -Hydroxysäure zeigte mit $0,74 \pm 0,23 \mu\text{g}/\text{mg}$ im Wildtyp und $0,07 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mg}$ eine etwa zehnfache Reduktion in der Doppelmutante. Im Falle der α,ω -Dicarbonsäuren war eine vergleichbare Tendenz zu beobachten. C₂₂ α,ω -Dicarbonsäure und C₂₄ α,ω -Dicarbonsäure waren ebenfalls hochsignifikant reduziert.

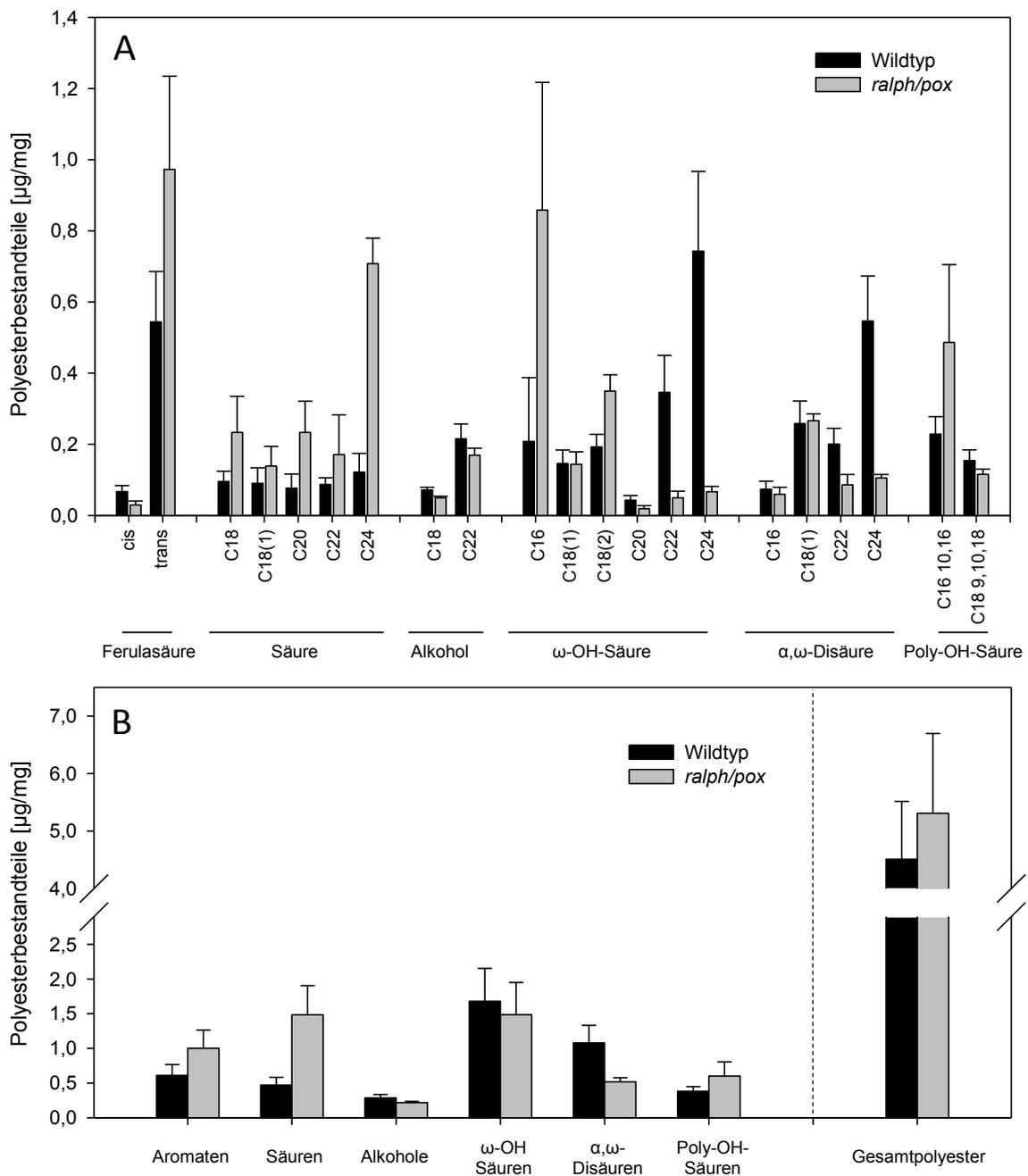


Abbildung 34: Vergleich der Zusammensetzung des Samenschalenpolyesters der Doppelmutante *ralph/pox* und des korrespondierenden Wildtyps

(A) Darstellung der absoluten Verteilung der Monomere (B) der absoluten Verteilung der Stoffklassen sowie der Gesamt-Polyestermenge der Doppelmutante *ralph/pox* und des korrespondierenden Wildtyps. Gezeigt ist jeweils der arithmetische Mittelwert aus 3 parallelen Einzelanalysen \pm Standardabweichung, bezogen auf das Trockengewicht des extrahierten Samenschalenmaterials. Mit Säure = Monocarbonsäure; Alkohol = primärer Alkohol; ω -OH-Säure = ω -Hydroxysäure; α,ω -Disäure = α,ω -Dicarbonsäure; Poly-OH-Säure = poly-Hydroxysäure

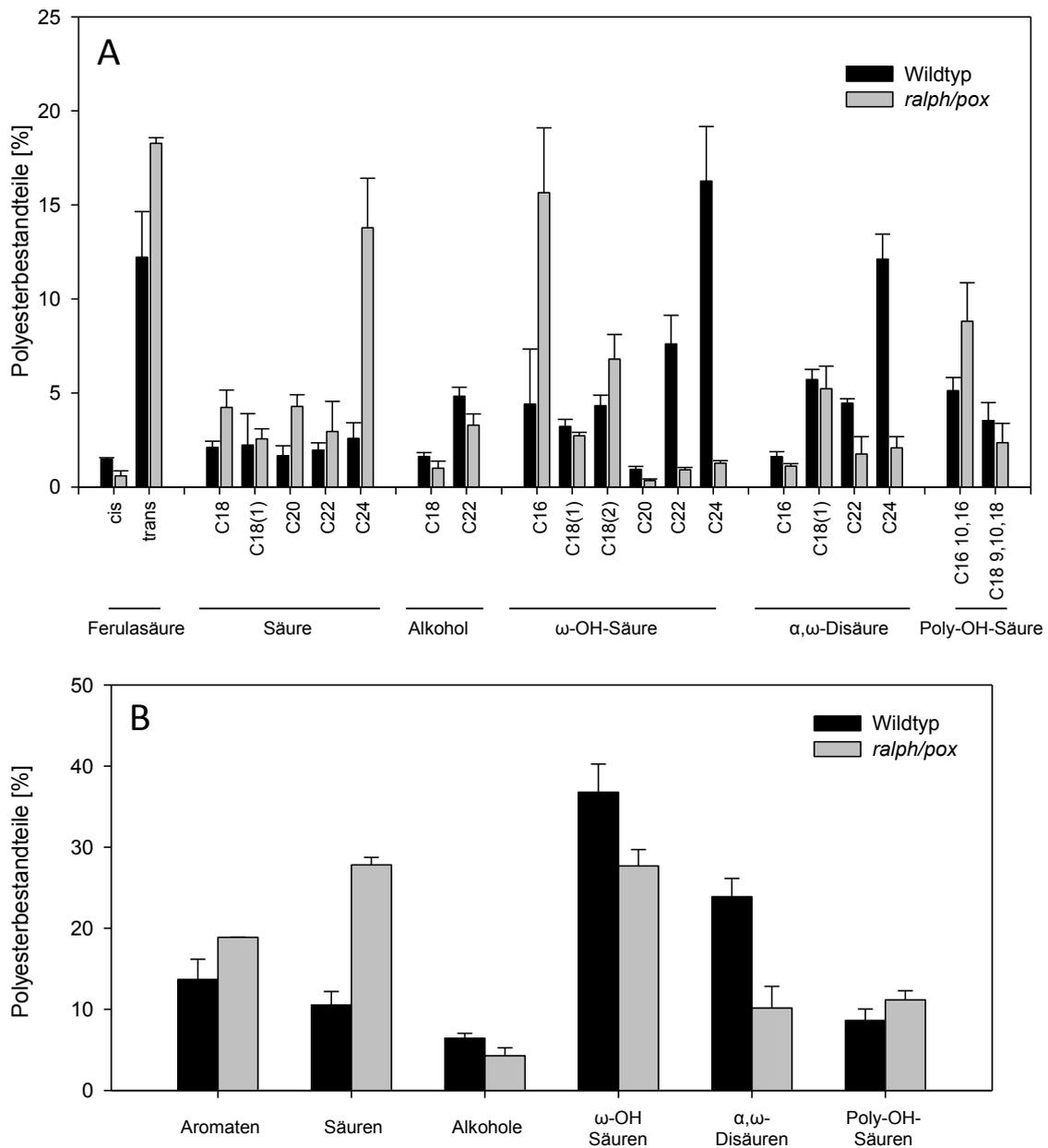


Abbildung 35: Vergleich der relativen Zusammensetzung des Samenschalenpolyesters der Doppelmutante *ralph/pox* und des korrespondierenden Wildtyps

(A) Darstellung der relativen Verteilung der Monomere (B) und der Stoffklassen der Doppelmutante *ralph/pox* und des korrespondierenden Wildtyps. Gezeigt ist jeweils der arithmetische Mittelwert aus 3 parallelen Einzelanalysen \pm Standardabweichung. Mit Säure = Monocarbonsäure; Alkohol = primärer Alkohol; ω-OH-Säure = ω-Hydroxysäure; α,ω-Disäure = α,ω-Dicarbonsäure; Poly-OH-Säure = poly-Hydroxysäure

3.6 Charakterisierung der Doppelmutante *kcs17/ralph*

Wie in 3.3 gezeigt, konnte für das CYP86B1/RALPH eine Beteiligung an der Biosynthese des Samenschalenpolyesters in *Arabidopsis* nachgewiesen werden. In einer vorangegangenen Arbeit wurde dies ebenfalls für KCS17, einer β -Ketoacyl-CoA-Synthase nachgewiesen (Nosbüsch, 2009). Die *kcs17* Insertionsmutante ist charakterisiert durch einen reduzierten Anteil an C_{24} ω -Hydroxysäure und C_{24} α,ω -Disäure bei gleichzeitiger Akkumulation der C_{22} Monomere dieser beiden Molekülspezies in ihrem Samenschalenpolyester. Beide Enzyme überlappen sich zumindest teilweise in ihrer Substratspezifität. Zum besseren Verständnis der biochemischen Zusammenhänge in der Synthese des Samenschalenpolyesters sollten hier beide Mutationen in einem Genom vereinigt und die Zusammensetzung des Samenschalenpolyesters der Doppelmutante analysiert werden.

3.6.1 Generierung homozygoter *kcs17/ralph* Doppelmutanten

Die Generierung von *kcs17/ralph* Doppelmutanten erfolgte durch Kreuzung der homozygoten *knockout* Mutanten *ralph-1* (*cyp86B1-1*, SM.37066) und *kcs17-1* (GK-128C11). *ralph-1* war hier der Pollenrezipient, *kcs17-1* fungierte als Pollendonator. Die F_1 -Generation zeigte einen uniform heterozygoten Genotyp für beide beobachteten Genloci. In der darauf folgenden F_2 -Generation fand eine Segregation der Genotypen statt. Abbildung 33 (A) zeigt die Ergebnisse der Genotypisierung des Genlocus *RALPH* (*CYP86B1*). Die wildtypspezifischen Primer LS331 und LS332 wurden kombiniert mit dem insertionsspezifischen Primer LS186. Im Falle einer Insertionsmutante war ein PCR-Produkt von 474 bp zu erwarten, die erwartete Fragmentgröße im Falle des Wildtypallels betrug 1030 bp. *KCS17/RALPH-3* und *-5* konnten als homozygote *knockout* Linien in Bezug auf das Gen *RALPH* identifiziert werden.

Die Genotypisierung des *KCS17*-Genlocus ist in Abbildung 33 (B) gezeigt. Als genspezifische Primer wurden LS540 und LS541, als insertionsspezifischer Primer LS542 verwendet. Für das Allel des Wildtyps wurde hier eine Fragmentgröße von 1196 bp erwartet. Im Falle einer Insertionsmutante betrug die erwartete Größe des DNA-Fragmentes etwa 570 bp. Die Individuen *KCS17/RALPH-1*, *-2*, *-3* und *-5* konnten als homozygote *Knockout*mutanten in Bezug auf das Gen *KCS17* bestätigt werden. Homozygote Doppelmutanten der Gene *KCS17* und *RALPH* waren somit *KCS17/RALPH-3* und *-5*. Für weiterführende Studien wurden hier Nachkommen der Doppelmutante *KCS17/RALPH-5*, im Folgenden *kcs17/ralph* genannt, verwendet.

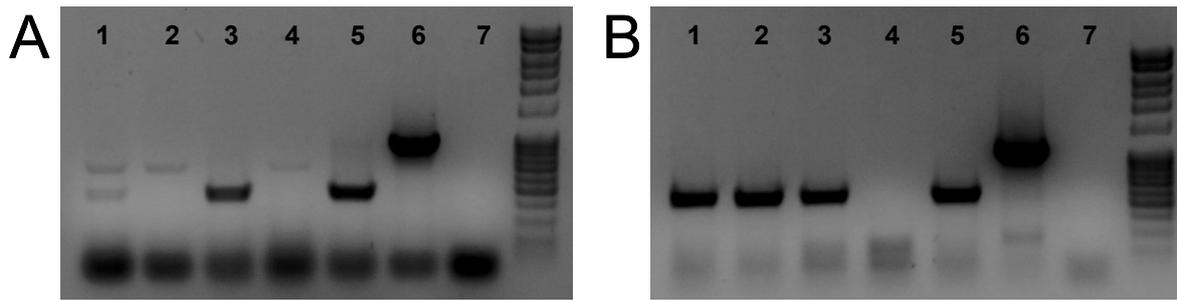


Abbildung 36: Genotypisierung putativer *kcs17/ralph* Doppelmutanten

1-5: Genotypisierung der putativen Doppelmutanten *KCS17/RALPH-1* bis -5 in Bezug auf den Genotyp in *RALPH* (A) und *KCS17* (B); 6: Positivkontrolle mit Wildtyp DNA; 7: Negativkontrolle mit Reinstwasser; Größenmarker: 100 Bp Extended; Erwartete Fragmentgrößen in (A): *RALPH-1* = 1030 bp, *ralph-1* = ca. 474 bp; Erwartete Fragmentgrößen in (B): *KCS17*= 1196 bp, *pox* = ca. 570 bp.

3.6.2 Analyse des Samenschalenpolyesters von *kcs17/ralph*

Ausgangsmaterial für die Analyse der Komposition des Samenschalenpolyesters der Doppelmutante *kcs17/ralph* und des korrespondierenden Wildtyps waren reife, getrocknete Samen. Die Samen wurden zur Isolation der Samenschale wie in 2.10.5 beschrieben aufbereitet. Zur Freisetzung der Monomere aus dem Polymerverbund wurde eine säurekatalysierte Umesterung mit Borontrifluorid durchgeführt. Nach Extraktion der Monomere und deren Derivatisierung (2.10.7) erfolgte eine qualitative und quantitative Analyse via GC-MS und GC-FID (2.10.8). Die hier vorgestellten Daten stellen Mittelwerte aus 3 parallel aufbereiteten Einzelanalysen dar, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Es konnten 21 Monomere identifiziert, in Bezug auf das Trockengewicht des extrahierten Samenschalenmaterials quantifiziert und dem Samenschalenpolyester von *Arabidopsis thaliana* zugeordnet werden. Die identifizierten Monomere gehörten den Stoffklassen der Aromaten, der Monocarbonsäuren, der primären Alkohole, der ω -Hydroxysäuren, der α,ω -Dicarbonsäuren und der poly-Hydroxycarbonsäuren an. Die Ergebnisse der Analyse des Samenschalenpolyesters sind in Abbildung 37 und Abbildung 38 grafisch dargestellt und in Tabelle 23 und Tabelle 24 zusammengefasst.

Insgesamt konnten im Wildtyp $4,51 \pm 1,01$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ Monomere des Samenschalenpolyesters detektiert werden. Die Gesamtmenge in der Doppelmutante *kcs17/ralph* unterschied sich mit $3,85 \pm 0,47$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ nicht signifikant von der Gesamtmenge des Wildtyps.

In der relativen Verteilung konnte in allen aliphatischen Stoffklassen eine signifikante Änderung im Vergleich zum Wildtyp dargestellt werden. Der relative Anteil an Monocarbonsäuren war von 11 % im Wildtyp auf 34 % in der Doppelmutante um den Faktor 3 erhöht. ω -Hydroxysäuren waren mit 37 % am Polymer des Wildtyps beteiligt. In der Doppelmutante konnten 16 % der Monomere als ω -Hydroxysäuren identifiziert werden. Der relative Anteil der α,ω -Dicarbonsäuren am Samenschalenpolyester war von 24 % im Wildtyp auf 14 % in der *kcs17/ralph*-Mutante signifikant reduziert.

Diese Verhältnisse sind auch bei Betrachtung der absoluten Werte ersichtlich. In der Doppelmutante konnte eine Akkumulation von Monocarbonsäuren der Kettenlänge C₂₂ und C₂₄ nachgewiesen werden. Die Menge an C₂₂ Monocarbonsäure stieg hier von $0,09 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mg}$ auf $0,27 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{mg}$ signifikant an, Die Menge an C₂₄ Monocarbonsäure stieg von $0,12 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{mg}$ auf $0,78 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{mg}$ etwa um den Faktor 7 an. Im Falle der C₂₂ und C₂₄ ω -Hydroxysäuren und α,ω -Dicarbonsäuren war eine signifikante Reduktion der C₂₂ und C₂₄ Spezies dieser Stoffklassen nachweisbar. Die C₂₂ ω -Hydroxysäure war von $0,35 \pm 0,11$ im Wildtyp auf $0,06 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mg}$ in der Doppelmutante reduziert, die korrespondierende Disäure von $0,20 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{mg}$ auf $0,07 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{mg}$. Die C₂₄ ω -Hydroxysäure zeigte eine Reduktion von $0,74 \pm 0,22 \mu\text{g}/\text{mg}$ auf $0,07 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mg}$. Die korrespondierende C₂₄ α,ω -Dicarbonsäure war von $0,55 \pm 0,13 \mu\text{g}/\text{mg}$ im Wildtyp auf $0,1 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mg}$ in der Doppelmutante reduziert. Bei Betrachtung der C₁₆ 10,16-Dihydroxysäure konnte in der Doppelmutante eine Akkumulation beobachtet werden. Sie ist von $0,23 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{mg}$ Wildtyp auf $0,35 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{mg}$ in kcs17/ralph signifikant gesteigert

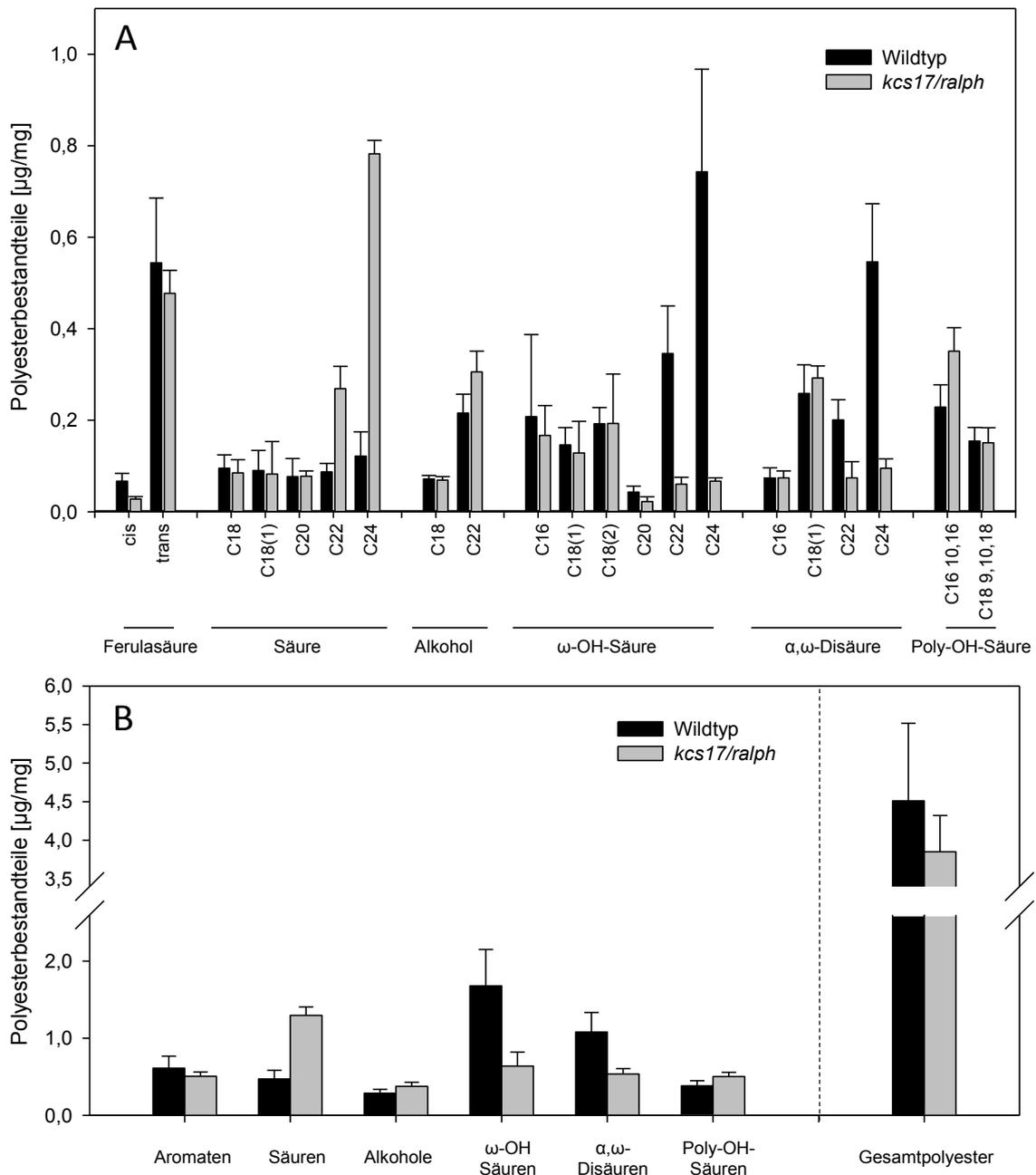


Abbildung 37: Vergleich der Zusammensetzung des Samenschalenpolyesters der Doppelmutante *kcs17/ralph* und des korrespondierenden Wildtyps

(A) Darstellung der absoluten Verteilung der Monomere, (B) der absoluten Verteilung der Stoffklassen und der Gesamtmenge des Samenschalenpolyesters der Doppelmutante *kcs17/ralph* und des korrespondierenden Wildtyps. Gezeigt ist jeweils der arithmetische Mittelwert aus 3 parallelen Einzelanalysen \pm Standardabweichung, bezogen auf das Trockengewicht des extrahierten Samenschalenmaterials. Mit Säure = Monocarbonsäure; Alkohol = primärer Alkohol; ω -OH-Säure = ω -Hydroxysäure; α,ω -Disäure = α,ω -Dicarbonsäure; Poly-OH-Säure = poly-Hydroxysäure

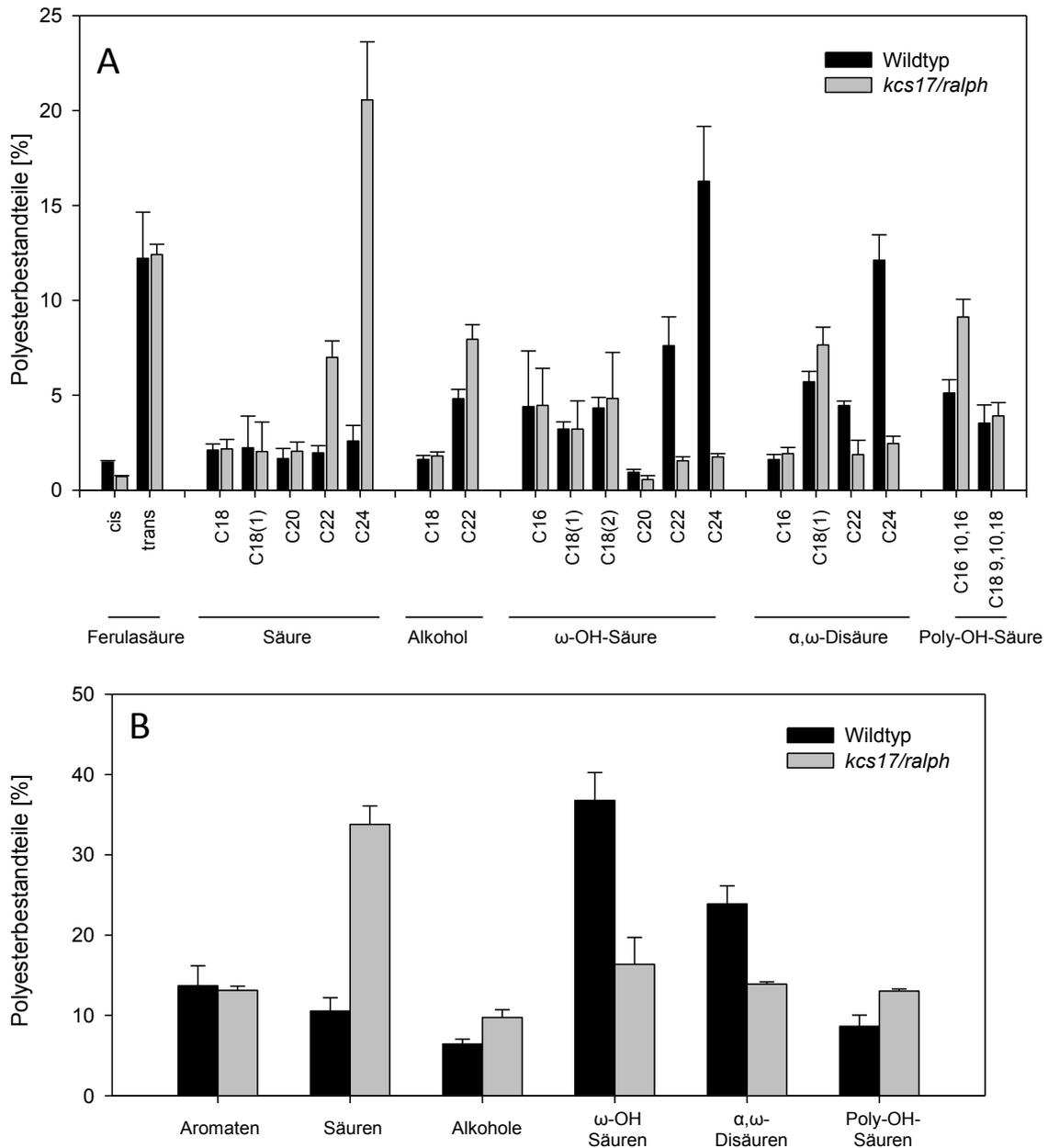


Abbildung 38: Vergleich der relativen Zusammensetzung des Samenschalenpolyesters der Doppelmutante *kcs17/ralph* und des korrespondierenden Wildtyps

(A) Darstellung der relativen Verteilung der Monomere und (B) der Stoffklassen der Doppelmutante *kcs17/ralph* und des korrespondierenden Wildtyps. Gezeigt ist jeweils der arithmetische Mittelwert aus 3 parallelen Einzelanalysen \pm Standardabweichung. Mit Säure = Monocarbonsäure; Alkohol = primärer Alkohol; ω -OH-Säure = ω -Hydroxysäure; α,ω -Disäure = α,ω -Dicarbonsäure; Poly-OH-Säure = poly-Hydroxysäure

3.7 Charakterisierung der Doppelmutante *ralph/horst*

Die Genprodukte von *CYP86A1/HORST* und *CYP86B1/RALPH* konnten als ω -Hydroxylasen mit Beteiligung an der Suberinbiosynthese charakterisiert werden (Höfer *et al.*, 2008; Compagnon *et al.*, 2009). Das Suberin der Insertionsmutanten *cyp86A1/horst* zeigte eine Reduktion der ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren mit Kettenlängen C_{16} und C_{18} . Im Wurzelsuberin der *cyp86B1/ralph* Insertionsmutanten konnte eine Reduktion von ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren mit Kettenlängen $>C_{20}$ nachgewiesen werden. Zum besseren Verständnis der biochemischen Zusammenhänge der Suberinbiosynthese in *Arabidopsis* sollte hier eine Doppelmutante *ralph/horst* generiert und in Bezug auf ihre Suberin-Zusammensetzung in den Geweben der Wurzel charakterisiert werden.

3.7.1 Generierung homozygoter *ralph/horst* Doppelmutanten

Die Generierung von homozygoten Insertionsmutanten in den Genen *CYP86B1/RALPH* und *CYP86A1/HORST* erfolgte durch Kreuzung der Insertionsmutantenlinien *horst-1* (*cyp86A1-1*, SALK_107454) und *ralph-1* (*cyp86B1-1*, SM.37066). Die Linie *cyp86A1-1/horst-1* war hier Pollenrezipient, *cyp86B1-1/ralph-1* war Pollendonor. In der ersten Generation der Nachkommenschaft konnten mittels Genotypisierung durch kompetitive PCR (2.6.6) ausschließlich heterozygote Pflanzen in Bezug auf beide untersuchten Allele nachgewiesen werden. Diese Allelverteilung entsprach der nach den Mendel'schen Gesetzen postulierten Uniformität der F_1 -Generation. In der zweiten Filialgeneration fand eine Segregation statt. Die Ergebnisse der Genotypisierung der F_2 -Generation der Linie *RALPH/HORST* sind in Abbildung 40 dargestellt. Abbildung 40 (A) zeigt die Genotypisierung für den Genlocus *RALPH*. Als genspezifische Primer wurden hier LS331 und LS332 verwendet, der insertionsspezifische Primer war LS186. Die Größe des Genproduktes *CYP86B1/RALPH* für das Wildtyp-Allel betrug 1030 bp, die erwartete Fragmentgröße im Falle einer Insertionsmutante betrug 474 bp. Abbildung 40 (B) zeigt die Genotypisierung des Genlocus *HORST*. Wildtypspezifische Primer waren hier LS138 und LS139. Als insertionsspezifischer Primer wurde LS347 verwendet. Im Falle eines Wildtyp-Allels lag die erwartete Produktgröße bei 970 bp, im Falle eines Insertionsmutanten-Allels bei 458 bp. In beiden untersuchten Genloci hat eine Segregation in der F_2 -Generation stattgefunden. Da die beiden untersuchten Genloci auf Chromosom 5 lokalisiert sind, musste zur Ausbildung einer homozygoten Doppelmutante ein *Crossing-Over* des Chromosoms 5 während der Prophase der Meiose stattgefunden haben. Für beide hier untersuchten Gene sind homozygote Wildtypen als auch heterozygote und homozygote Insertionsmutanten identifizierbar. Die Pflanze *RALPH/HORST-1* konnte hier als homozygote Doppelmutante *ralph/horst* in beiden untersuchten Merkmalen identifiziert werden. Die Nachkommenschaft der Linie *ralph/horst-1* wurde für die folgenden Versuche verwendet.

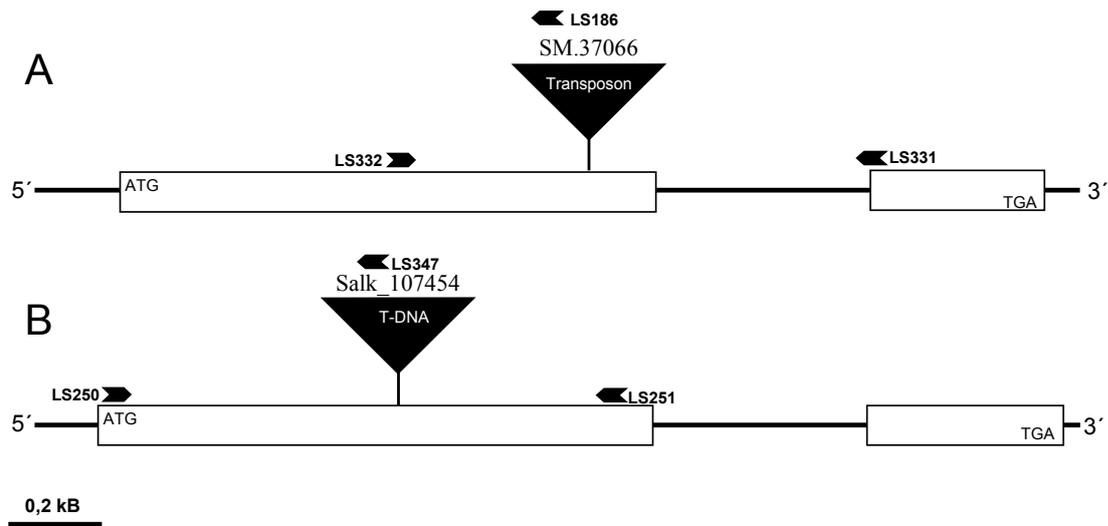


Abbildung 39: Schematische Darstellung der Genloci von *RALPH* (A) und *HORST* (B)

Dargestellt ist der Genlocus des jeweiligen Gens von 5' nach 3'. Boxen kennzeichnen Exonbereiche im jeweiligen Gen, Pfeile markieren die Bindungsorte der Genotypisierungsprimer. Schwarze Dreiecke zeigen die Lokalisation der T-DNA-, beziehungsweise Transposon-Insertion im Gen.

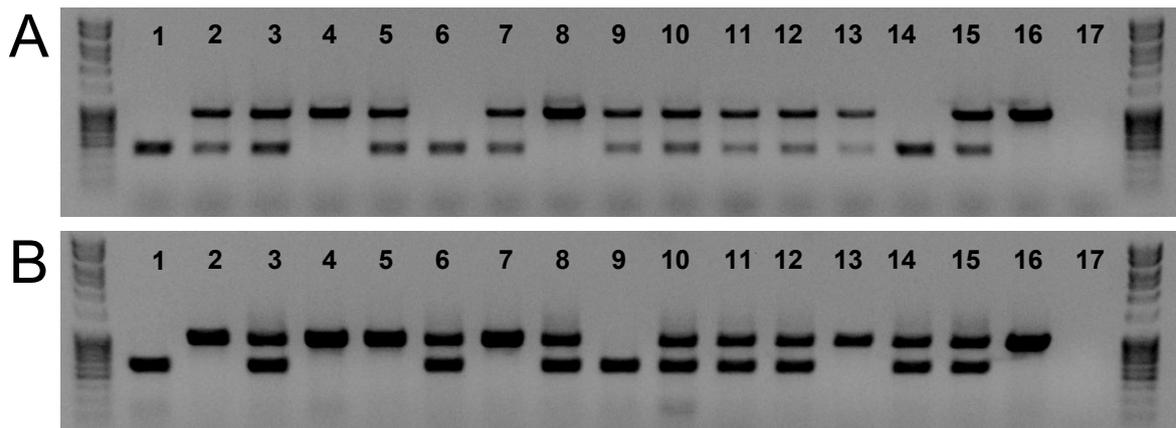


Abbildung 40: Genotypisierung der F₂-Generation putativer Doppelmutanten *ralph/horst*

1-15: Genotypisierung der potenzieller Doppelmutanten *RALPH/HORST-1* bis -15 in Bezug auf den Genotyp in *HORST* (A) und *RALPH* (B); 16: Positivkontrolle mit Wildtyp DNA; 17: Negativkontrolle mit Reinstwasser; Größenmarker: 100 Bp extended; Erwartete Fragmentgrößen in (A): *HORST* = 1030 bp, *horst-1* = ca. 458 bp; Erwartete Fragmentgrößen in (B): *RALPH* = 1030 bp, *ralph-1* = ca. 474 bp

3.7.2 Analyse des Wurzeluberins von *ralph/horst*

Die Probennahme und Aufbereitung des Wurzelmaterials von *ralph/horst* Doppelmutanten und des korrespondierenden Wildtyps wurde wie in 2.10.4 beschrieben durchgeführt. Die Pflanzen wurden in Hydrokultur angezogen (2.3.2), die Ernte des Wurzelmaterials erfolgte 35 Tage nach Aussaat. In einer parallelen Aufarbeitung wurde zum besseren Verständnis der biochemischen Zusammenhänge Wurzelmaterial der korrespondierenden *knockout* Mutanten *cyp86B1-1/ralph-1* und *cyp86A1-1/horst-1* geerntet, aufbereitet und analysiert. Die Umesterungsreaktion erfolgte mit Borontrifluorid (2.10.6.2). Derivatisierung und anschließende Analyse mittels GC-MS und GC-FID wurden wie in 2.10.7 und 2.10.8 durchgeführt. Die vorgestellten Ergebnisse basieren auf einer Analyse mit je drei parallel durchgeführten Einzelanalysen. Die dargestellten Ergebnisse zeigen das arithmetische Mittel, die Fehlerbalken die Standardabweichung.

Es konnten 23 dem Wurzeluberin von *Arabidopsis thaliana* zugehörige Monomere identifiziert und in Bezug auf das Trockengewicht des extrahierten Wurzelmaterials quantifiziert werden. Die identifizierten Monomere gehörten den Stoffklassen der Aromaten, der Monocarbonsäuren, der primären Alkohole, der ω -Hydroxysäuren und der α,ω -Dicarbonsäuren an. Die aromatischen Verbindungen wurden als *trans*- und *cis*-Ferulasäure identifiziert. Alle identifizierten aliphatischen Verbindungen wiesen eine Kettenlängenverteilung von C_{16} – C_{24} auf. Die Ergebnisse der Analyse des Wurzeluberins sind in Abbildung 41 und Abbildung 42 grafisch dargestellt und in Tabelle 27 und Tabelle 28 in Kapitel 7.4 zusammengefasst.

Im Wildtyp konnten $5,35 \pm 0,52$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ Suberinmonomere in der Wurzel nachgewiesen werden. Der Suberingehalt der Wurzel der *knockout* Mutante *cyp86B1-1/ralph-1* entsprach mit $5,77 \pm 0,88$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ dem Suberingehalt der Wurzel des Wildtyps. In der *knockout* Mutante *cyp86A1-1/horst-1* betrug die Gesamtmenge des Suberins $3,18 \pm 0,58$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ und war im Vergleich zum Wildtyp um 41 % reduziert. Die Reduktion des Suberins in *horst-1* beruhte auf einer verringerten Menge an ω -Hydroxysäuren und α,ω -Dicarbonsäuren der Kettenlängen C_{16} und C_{18} , wie bereits in vorangegangenen Analysen gezeigt werden konnte (Höfer *et al.*, 2008). Auch eine Reduktion von Monocarbonsäuren der Kettenlängen C_{22} und C_{24} konnte nachgewiesen werden (Abbildung 46). In der *ralph/horst* Doppelmutante lag die Gesamtmenge des Suberins mit $2,92 \pm 0,41$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ bei 57 % des Wildtypniveaus. Die Reduktion des Suberinmenge in der Wurzel der Doppelmutante beruhte auf einer verringerten Menge an ω -Hydroxysäuren und α,ω -Dicarbonsäuren über den gesamten detektierten Kettenlängenbereich von C_{16} bis C_{24} . Die absoluten Mengen der aromatischen Bestandteile und primären Alkohole sind von den eingeführten Gendefekten nicht beeinflusst.

Im Suberin des Wildtyps und der *horst-1* Linie stellten ω -Hydroxysäuren mit 38 %, beziehungsweise 40 % des Gesamtsuberins die prominenteste Verbindungsklasse dar. In der *ralph-1* Linie betrug der relative Anteil der ω -Hydroxysäuren 29 %, in der *ralph/horst* Doppelmutante 24 %. Prominenteste Verbindungsklasse in den Linien *ralph-1* und *ralph/horst* war die Klasse der Monocarbonsäuren mit 32 % in *ralph-1*, beziehungsweise 38 % in *ralph/horst*. Der relative Anteil der α,ω -Dicarbonsäuren am Gesamtsuberin betrug im Wildtyp 23 %, in der *horst-1* Mutante 13 %, in der *ralph-1* Mutante 25 % und in der *ralph/horst* Doppelmutante 11 %. Im Suberin des Wildtyps stellte die einfach ungesättigte C_{18} ω -Hydroxysäure die Hauptverbindung dar. Mit $0,96 \pm 0,08 \mu\text{g}/\text{mg}$ ist sie zu 18 % am Wurzelsuberin beteiligt, gefolgt von der einfach ungesättigten C_{18} α,ω -Dicarbonsäure mit $0,79 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{mg}$ (15 %). Bei Betrachtung der relativen Verteilung der Monomere in der *ralph/horst* Doppelmutante ist zu erkennen, dass die C_{22} Monocarbonsäure die prominenteste Verbindung des Polymers darstellt. Sie ist mit $0,64 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{mg}$ zu 21,5 % am Polymer beteiligt, während die einfach ungesättigte C_{18} ω -Hydroxysäure mit $0,51 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{mg}$ einen relativen Anteil von 17,3 % am Gesamtpolymer aufweist.

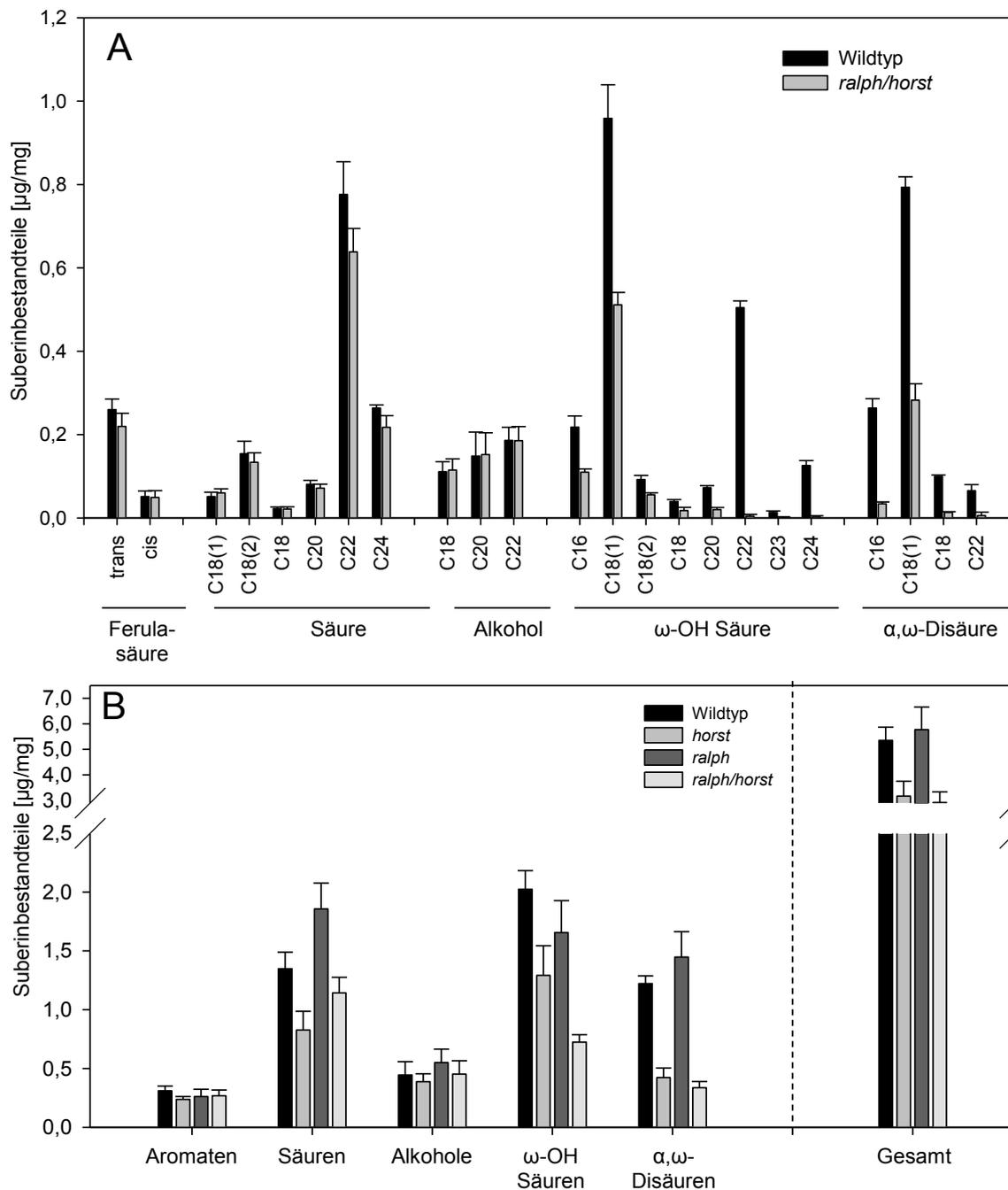


Abbildung 41: Vergleich der Zusammensetzung des Wurzelsuberins der Doppelmutante *ralph/horst* und des korrespondierenden Wildtyps

(A) Darstellung der absoluten Verteilung der Monomere der Doppelmutante *ralph/horst* und des korrespondierenden Wildtyps. (B) Absolute Verteilung der Stoffklassen sowie des Gesamtsuberingehaltes der *ralph/horst* Doppelmutante, des korrespondierenden Wildtyps sowie der parallel aufgearbeiteten Mutantenlinien *ralph-1* und *horst-1*. Gezeigt ist jeweils der arithmetische Mittelwert aus 3 parallelen Einzelanalysen \pm Standardabweichung, bezogen auf das Trockengewicht des verwendeten Wurzelmaterials. Mit Säure = Monocarbonsäure, Alkohol = primärer Alkohol, ω -OH-Säure = ω -Hydroxysäure und α,ω -Disäure = α,ω -Dicarbonsäure

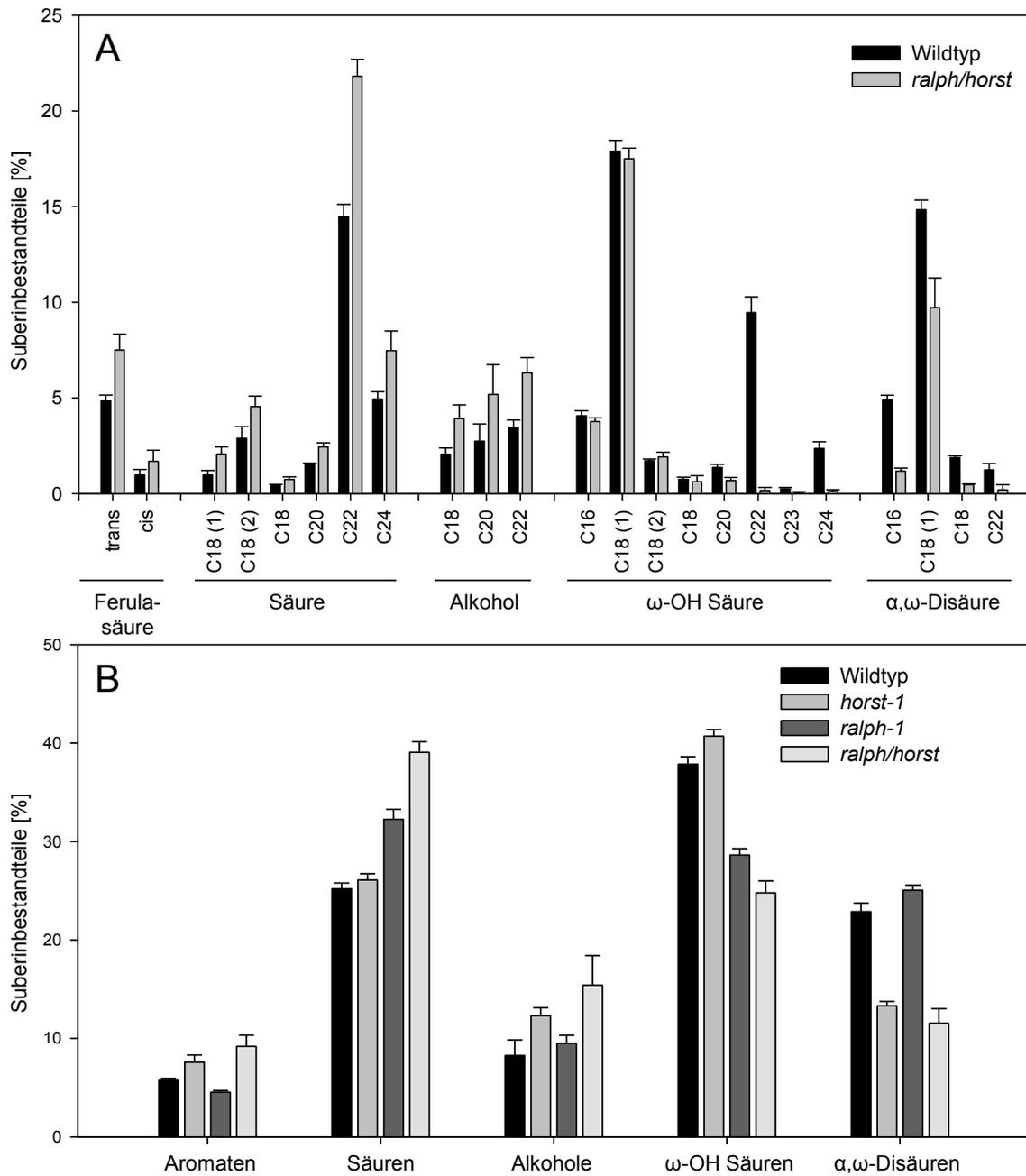


Abbildung 42: Relative Zusammensetzung des Wurzelsuberins der Doppelmutante *ralph/horst* und des korrespondierenden Wildtyps

(A) Darstellung der relativen Verteilung der Monomere der *ralph/horst* Doppelmutante und des korrespondierenden Wildtyps. (B) Vergleich der relativen Verteilung der Stoffklassen der *ralph/horst* Doppelmutante sowie der parallel aufbereiteten *ralph-1* und der *horst-1* Mutantenlinien und des korrespondierenden Wildtyps. Die dargestellten Werte sind arithmetische Mittelwerte aus 3 parallelen Einzelanalysen \pm Standardabweichung. Mit Säure = Monocarbonsäure; Alkohol = primärer Alkohol; ω -OH-Säure = ω -Hydroxysäure; α,ω -Disäure = α,ω -Dicarbonsäure

3.7.3 Anatomie primärer Wurzelbereiche von *ralph/horst* Mutanten

In analytischen Studien des Wurzeluberins der Doppelmutante *ralph/horst* konnten signifikante Unterschiede zum Suberin des Wildtyps nachgewiesen werden (Abbildung 41, Abbildung 42). Zur Aufklärung der Frage, ob die veränderte Komposition des Suberins in der Wurzel die Morphologie und Anatomie der Wurzel der Doppelmutante beeinflusst, wurden mikroskopische Studien an Querschnitten von primären Wurzelbereichen durchgeführt. Es wurden Querschnitte mit 15 µm Schichtdicke von apikalen Regionen der Wurzel des Wildtyps und der *ralph/horst* Mutante angefertigt und mikroskopisch observiert (2.9.1). Die Querschnitte wurden zum Einen im Hellfeld und zum Anderen im Fluoreszenzmikroskop zur Detektion der Autofluoreszenz von aromatischen Zellwandbestandteilen observiert (Filterset: Anregungsfilter BP 450-490 nm, Strahlteiler FT 510 nm, Sperrfilter LP 520 nm). Ein Teil der Querschnitte wurde zur histochemischen Detektion von Suberinlamellen mit Sudan 7B angefärbt (2.9.2). Repräsentative Querschnitte beider Pflanzenlinien 12 mm basal zur Wurzelspitze sind in Abbildung 43 dargestellt.

In den Hellfeldaufnahmen (Abbildung 43 A und B) und den Fluoreszenzaufnahmen (Abbildung 43 C und D) ist erkennbar, dass anatomische Unterschiede in den Wurzeln des Wildtyps und denen der Doppelmutante vorhanden sind. Während in den Wurzeln des Wildtyps Cortezellen, endodermale Zellen und die Gewebe des Zentralzylinders eindeutig unterscheidbar sind, zeigen sich die Zellen der *ralph/horst* Mutante teilweise deformiert. Einzelne Zelllagen sind schwer voneinander unterscheidbar. Bei einer Detektion der Autofluoreszenz ist in der Wurzel des Wildtyps eine intensive Fluoreszenz in den Leitbündeln des Zentralzylinders und in den Apoplasten von Endodermiszellen erkennbar. Die Intensität der Autofluoreszenz in der Doppelmutante, speziell in den endodermalen Geweben, war abgeschwächt und diffus im Vergleich zum Wildtyp. Es konnte hier kein geschlossener Ring aus Endodermiszellen nachgewiesen werden. Histochemisch angefärbte Detailaufnahmen der Endodermis (Abbildung 43 E und F) zeigten stark deformierte und größtenteils kollabierte endodermale Zellen. Die Anfärbung mit Sudan 7B zeigte in der Doppelmutante eine nicht-kontinuierliche und diffuse Rotfärbung in den Bereichen um den Zentralzylinder, während in den Endodermiszellen des Wildtyps eine intensive und kontinuierliche Rotfärbung in apoplastischen Bereichen erkennbar war. Insgesamt wurden etwa 100 Aufnahmen von einzelnen Querschnitten der Wurzeln des Wildtyps und der *ralph/horst* Mutante gemacht. 92 % der observierten Wurzelquerschnitte der Doppelmutante zeigten den hier beschriebenen anatomischen Phänotyp. Im Falle der Wurzeln des Wildtyps zeigten nur 22 % der Querschnitte kollabierte Endodermiszellen.

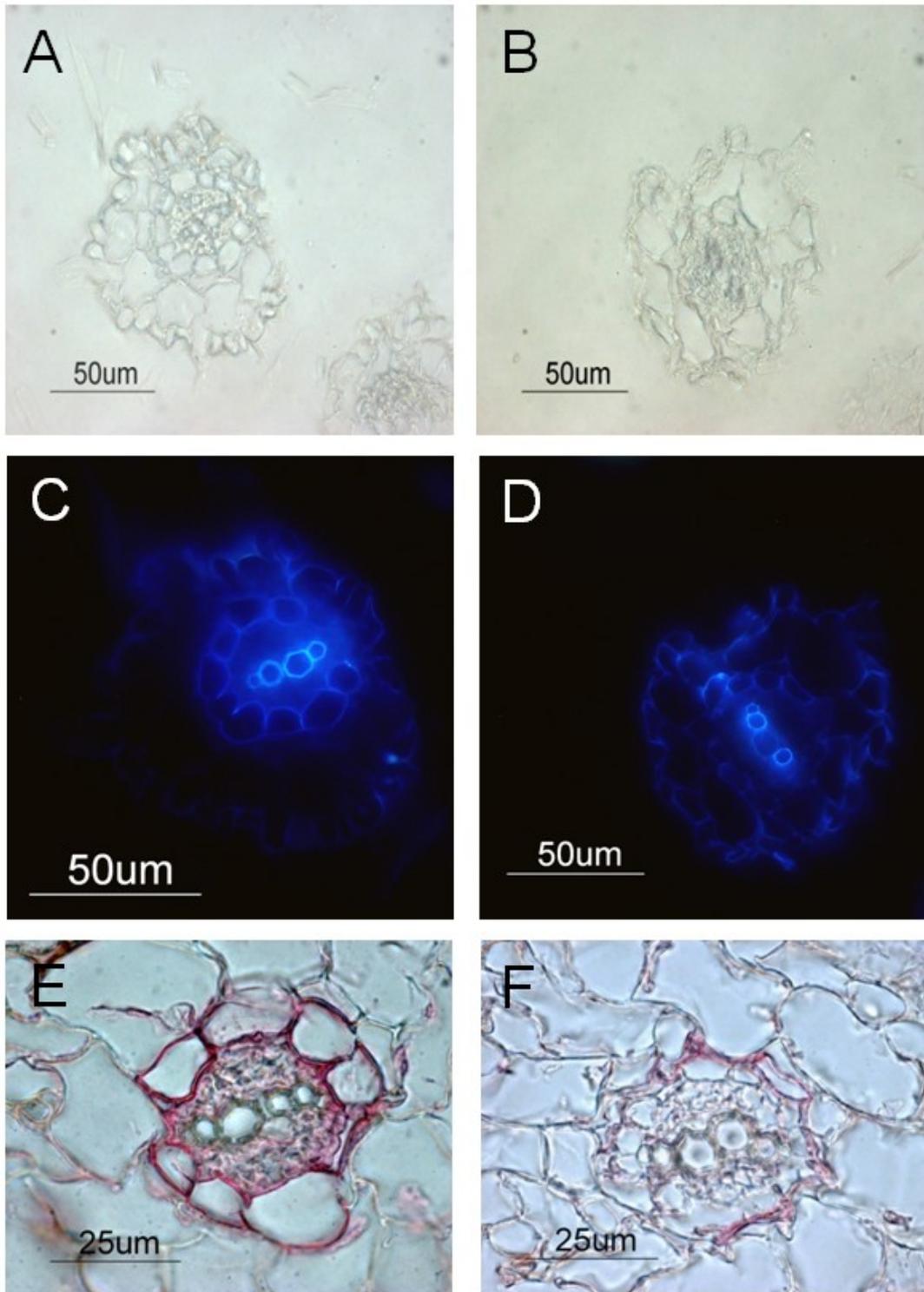


Abbildung 43: Anatomie und Histologie der primären Wurzel des Wildtyps und der Doppelmutante *ralph/horst*

Repräsentative Querschnitte von primären *Arabidopsis* Wurzeln in 12 mm Entfernung zur Wurzelspitze. Mikroskopische Aufnahmen von Wurzelquerschnitten des Wildtyps (A) und der *ralph/horst* Linie (B) im Hellfeld; Detektion der Autofluoreszenz aromatischer Zellwandbestandteile von Wurzelquerschnitten des Wildtyps (C) und der Linie *ralph/horst* (D); Detektion von Suberinlamellen im Apoplasten der Endodermis des Wildtyps (E) und der Doppelmutante (F) durch Anfärbung mit Sudan 7B.

3.8 Charakterisierung der *horst/cyp86B2* Doppelmutante

Für CYP86A1/HORST konnte eine eindeutige Beteiligung an der Suberinbiosynthese nachgewiesen werden. *CYP86A1/HORST* codiert eine ω -Hydroxylase von C₁₆ und C₁₈ Monocarbonsäuren und katalysiert die Ausbildung von korrespondierenden ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren (Höfer *et al.*, 2008). Die Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP86B2 stellt das am nächsten verwandte Protein zu CYP86B1/RALPH dar. Für CYP86B1/RALPH konnte, wie in 3.3 gezeigt, eine Beteiligung an der Suberinbiosynthese nachgewiesen werden. Der hohe Verwandtschaftsgrad von CYP86B2 zu CYP86B1/RALPH legte ebenfalls eine Beteiligung von CYP86B2 an der Suberinbiosynthese nahe. Die Insertionsmutante *cyp86B2* (Salk_070160) wurde in vorangegangenen Studien bereits auf eine Beteiligung an der Suberinbiosynthese hin untersucht (Diehl, 2008). Hier konnten keine Aberrationen des Suberinpolymers nachgewiesen werden. Da hier aber möglicherweise ein hoher Grad an Redundanz zwischen den Enzymen CYP86B1, CYP86B2 und CYP86A1 in Bezug auf ihre Substratspezifität vorliegen könnte, wurde hier die Generierung einer Doppelmutante *horst/cyp86B2* und eine anschließende Analyse der Wurzelsuberin-Zusammensetzung durchgeführt.

3.8.1 Generierung homozygoter *horst/cyp86B2* Doppelmutanten

Die Generierung der Doppelmutante *horst/cyp86B2* erfolgte durch Kreuzung der Insertionsmutantenlinien *horst-1* (*cyp86A1-1*, SALK_107454) und *cyp86B2* (At5g08250, SALK_070150). In der durchgeführten Kreuzung der Parentalgeneration (P-Generation) stellte die Linie *horst-1* den Pollenrezipienten dar, *cyp86B2* den Pollendonor. Direkte Nachkommen der Parentalgeneration (F₁-Generation) wiesen einen uniform heterozygoten Genotyp auf. Eine Segregation der Genotypen konnte in der Nachkommenschaft der F₁-Generation nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Genotypisierung mittels kompetitiver PCR sind in Abbildung 45 dargestellt. Abbildung 45 (A) zeigt die Genotypisierung des Genlocus *HORST* (*CYP86A1*). Genspezifische Primer waren hier LS138 und LS139. Als insertionsspezifischer Primer wurde LS347 verwendet. Im Falle eines Wildtyp-Allels lag die erwartete Produktgröße bei 970 bp, im Falle eines Insertionsmutanten-Allels bei 458 bp. Die Pflanzen *HORST/CYP86B2-2*, *-4*, *-7* und *-14* konnten als homozygote *knockout*-Pflanzen im Genlocus *HORST* identifiziert werden.

Die Genotypisierung des Genlocus *CYP86B2* ist in Abbildung 45 (B) gezeigt. Verwendete Primer waren hier die wildtypspezifischen Primer LS329 und LS330 in Kombination mit dem insertionsspezifischen Primer LS347. Die erwartete Fragmentgröße des Wildtyp-PCR-Produktes betrug 1021 bp. Die erwartete Größe des Genfragmentes im Falle einer

vorhandenen T-DNA-Insertion war 688 bp. In vorangegangenen Untersuchungen konnte für den Fall einer Insertion gezeigt werden, dass die T-DNA-Insertion hier in Form eines Konkatomers vorliegt, einer Verknüpfung von zwei miteinander in umgekehrter Orientierung verbundenen T-DNA-Fragmenten. Als Konsequenz wurden hier im Falle eines *knockouts* durch Insertion zwei PCR-Produkte gebildet. Beide genspezifischen Primer konnten mit dem jeweiligen insertionsspezifischen Primer ein PCR-Produkt ausbilden. Im Falle einer heterozygoten Mutante erscheint auf dem Agarosegel eine vierte, unspezifische Produktbande, die bei etwa 1500 bp lokalisiert ist. In der hier durchgeführten Genotypisierung konnten die Pflanzen *HORST/CYP86B2-11*, *-13* und *-14* als homozygote *knockout* Mutanten im Genlocus *CYP86B2* identifiziert werden. Als homozygote *knockout* Mutante in beiden untersuchten Genloci konnte hier *HORST/CYP86B2-14*, im Folgenden *horst/cyp86B2* genannt, identifiziert werden.

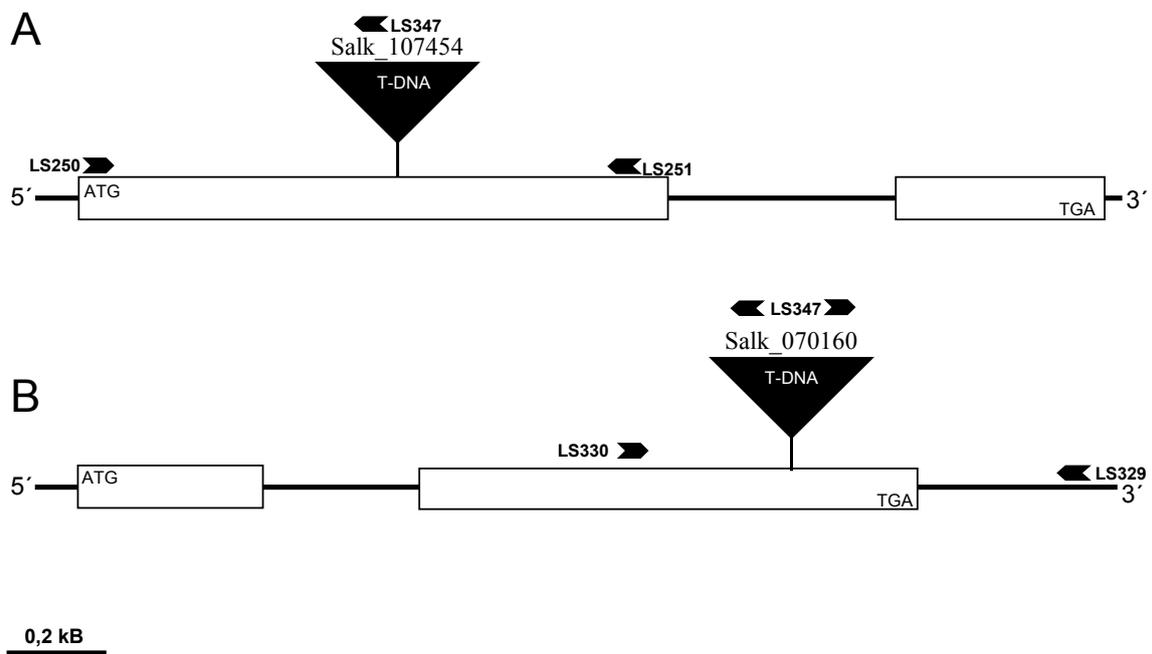


Abbildung 44: Schematische Darstellung der Genloci von *HORST* (A) und *CYP86B2* (B)
 Schematische Darstellung des Genaufbaus von 5' nach 3'. Boxen kennzeichnen Exonbereiche des jeweiligen Gens. Pfeile zeigen die Position der Genotypisierungsprimer. Schwarze Dreiecke markieren T-DNA-Insertionen.

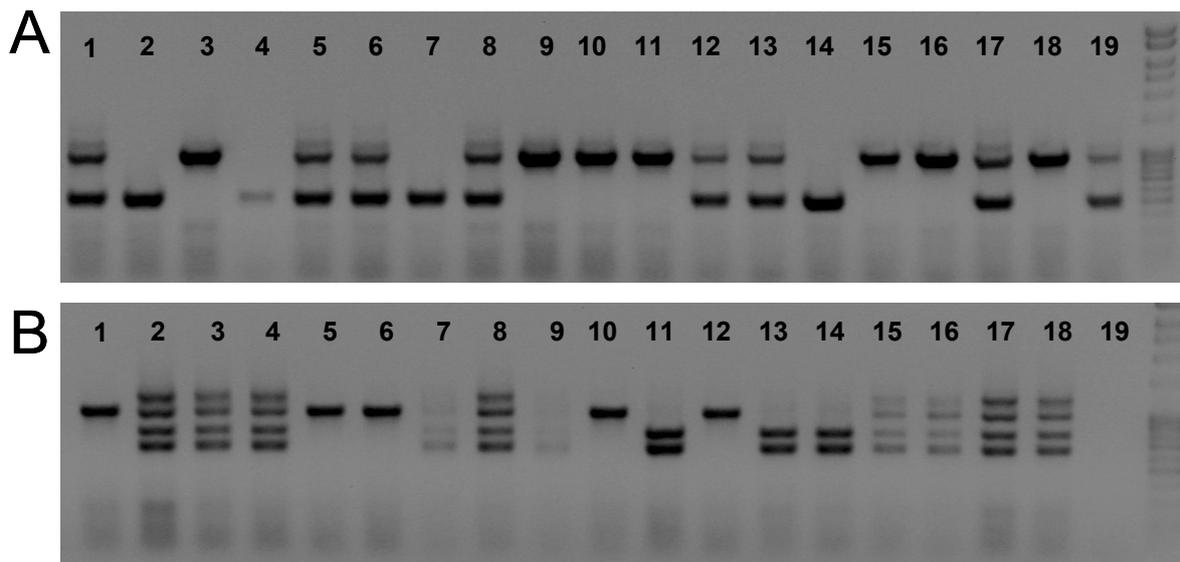


Abbildung 45: Genotypisierung potenzieller *horst/cyp86B2* Doppelmutanten

1-19: Genotypisierung potenzieller Doppelmutanten *HORST/CYP86B2-1* bis -19 in Bezug auf den Genotyp in *CYP86A1/HORST* (A) und *CYP86B2* (B); 20: Größenmarker: 100 Bp Extended; Erwartete Fragmentgrößen in (A): *HORST* = 970 bp, *horst-1* = ca. 458 bp; Erwartete Fragmentgrößen in (B): *CYP86B2* = 1021 bp, *cyp86B2* = zwei Banden aufgrund des Konkamers, eine davon bei 688 bp. Nicht gezeigt: Positivkontrolle mit Wildtyp-DNA und Negativkontrolle mit Reinstwasser

3.8.2 Analyse des Wurzeluberins von *horst/cyp86B2*

Die Probennahme des Wurzelmaterials von *horst/cyp86B2* und des korrespondierenden Wildtyps erfolgte wie in 2.10.4 beschrieben von 35 Tage alten Pflanzen aus Hydrokulturanzucht (2.3.2). Die Umesterungsreaktion wurde mit Borontrifluorid wie in 2.10.6.2 beschrieben durchgeführt. Zur Darstellung möglicher überschneidender Effekte der vereinigten Genotypen und zum besseren Verständnis der biochemischen Zusammenhänge wurden in dieser Analyse ebenfalls Wurzeln des *knockout* Mutante *horst-1* parallel angezogen, geerntet und analysiert.

Es konnten insgesamt 23 dem Wurzeluberin von *Arabidopsis thaliana* zugehörige Monomere identifiziert und in Bezug auf das Trockengewicht des Wurzelmaterials quantifiziert werden. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus drei bis vier parallelen Einzelanalysen, Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Die Monomere konnten den Stoffklassen der Monocarbonsäuren, der primären Alkohole, der ω -Hydroxysäuren und der α,ω -Dicarbonsäuren zugewiesen werden. Des Weiteren wurden *trans*- und *cis*-Ferulasäure identifiziert und quantifiziert. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 46 und Abbildung 47 grafisch dargestellt und in Tabelle 25 und Tabelle 26 in Kapitel 7.4 zusammengefasst.

Die Gesamtmenge des Wurzeluberins des Wildtyps betrug $5,34 \pm 0,31 \mu\text{g}/\text{mg}$. Im Vergleich dazu war die Gesamtmenge des Suberins in der *horst-1* Mutante mit $3,15 \pm 0,55 \mu\text{g}/\text{mg}$ auf 59 % der Suberinmenge des Wildtyps reduziert. Die *horst/cyp86B2* Mutante wies mit

$2,95 \pm 0,18 \mu\text{g}/\text{mg}$ 56 % des Wildtyp-Suberingehaltes auf. Bezogen auf die Stoffklassenverteilung war in beiden untersuchten Mutantenlinien die absolute Menge der ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert. ω -Hydroxysäuren waren in der *horst* Mutante mit $1,28 \pm 0,24 \mu\text{g}/\text{mg}$ um 36 %, α,ω -Disäuren mit $0,42 \pm 0,08 \mu\text{g}/\text{mg}$ um 66 % reduziert. In der *horst/cyp86B2* Doppelmutante konnte für ω -Hydroxysäuren mit $1,13 \pm 0,10 \mu\text{g}/\text{mg}$ eine Reduktion um 44 % und für α,ω -Disäuren mit $0,38 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{mg}$ eine Reduktion um 69 % erfasst werden. Die Gesamtmenge an Monocarbonsäuren im Polymer war in beiden untersuchten Mutantenlinien ebenfalls reduziert. Hier konnte mit $0,83 \pm 0,16 \mu\text{g}/\text{mg}$ für *horst-1* und $0,83 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{mg}$ für *horst/cyp86B2* eine Verringerung an Monocarbonsäuren um jeweils etwa 38 % festgestellt werden.

Die Reduktion der ω -Hydroxysäuren und α,ω -Dicarbonsäuren beruhte im Wesentlichen auf der Reduktion der Monomere mit den Kettenlängen C_{16} bis C_{20} . Im Falle der Monocarbonsäuren war der gegensätzliche Fall zu beobachten. Hier waren die Mengen der C_{16} bis C_{20} Monomeren dieser Stoffklasse weitestgehend gleich, während hochsignifikante Reduktionen der C_{22} und C_{24} Monocarbonsäuren nachweisbar waren. Die Änderungen in der Suberinzusammensetzung betrafen somit die drei Hauptkomponenten des Suberins der *Arabidopsis*-Wurzel. Die einfach ungesättigte C_{18} ω -Hydroxysäure, die einfach ungesättigte C_{18} α,ω -Dicarbonsäure und die C_{22} Monocarbonsäure waren hochsignifikant reduziert.

Eine Betrachtung der relativen Zusammensetzung der Suberinmonomere zeigt, dass die eingeführten Mutationen einen geringfügigen Einfluss auf die relative Komposition des Polymers haben. Bei Betrachtung der anteiligen Mengen ist eine signifikante Reduktion der einfach ungesättigten C_{18} ω -Hydroxysäure, der einfach ungesättigten C_{18} α,ω -Dicarbonsäure und der C_{16} α,ω -Dicarbonsäure sowie eine signifikante Akkumulation der C_{22} ω -Hydroxysäure erkennbar.

Zwischen den Linien *horst-1* und *horst/cyp86B2* sind keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Die beiden Mutantenlinien verhalten sich in Bezug auf ihre Suberin-Zusammensetzung gleich.

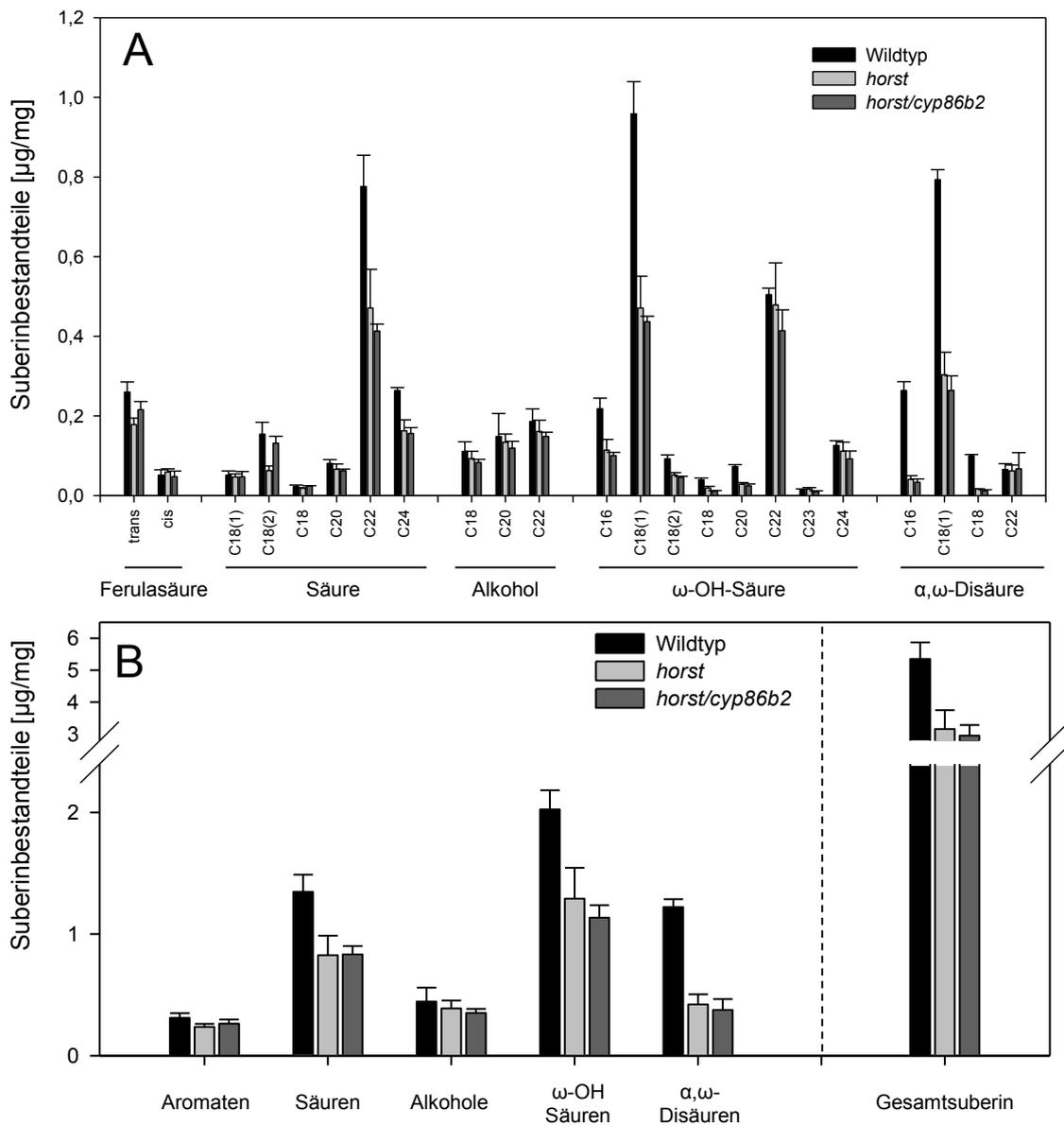


Abbildung 46: Vergleich der Zusammensetzung des Wurzelsuberins der Doppelmutante *horst/cyp86B2*, der Mutante *horst-1* und des korrespondierenden Wildtyps

(A) Darstellung der absoluten Verteilung der Monomere (B) der absoluten Verteilung der Stoffklassen sowie des Gesamtsuberinergehaltes der Doppelmutante *horst/cyp86B2*, der Mutante *horst-1* und des korrespondierenden Wildtyps. Gezeigt ist jeweils der arithmetische Mittelwert aus 3 parallelen Einzelanalysen \pm Standardabweichung, bezogen auf das Trockengewicht des verwendeten Wurzelmaterials. Mit Säure = Monocarbonsäure, Alkohol = primärer Alkohol, ω-OH-Säure = ω-Hydroxysäure und α,ω-Disäure = α,ω-Dicarbonsäure

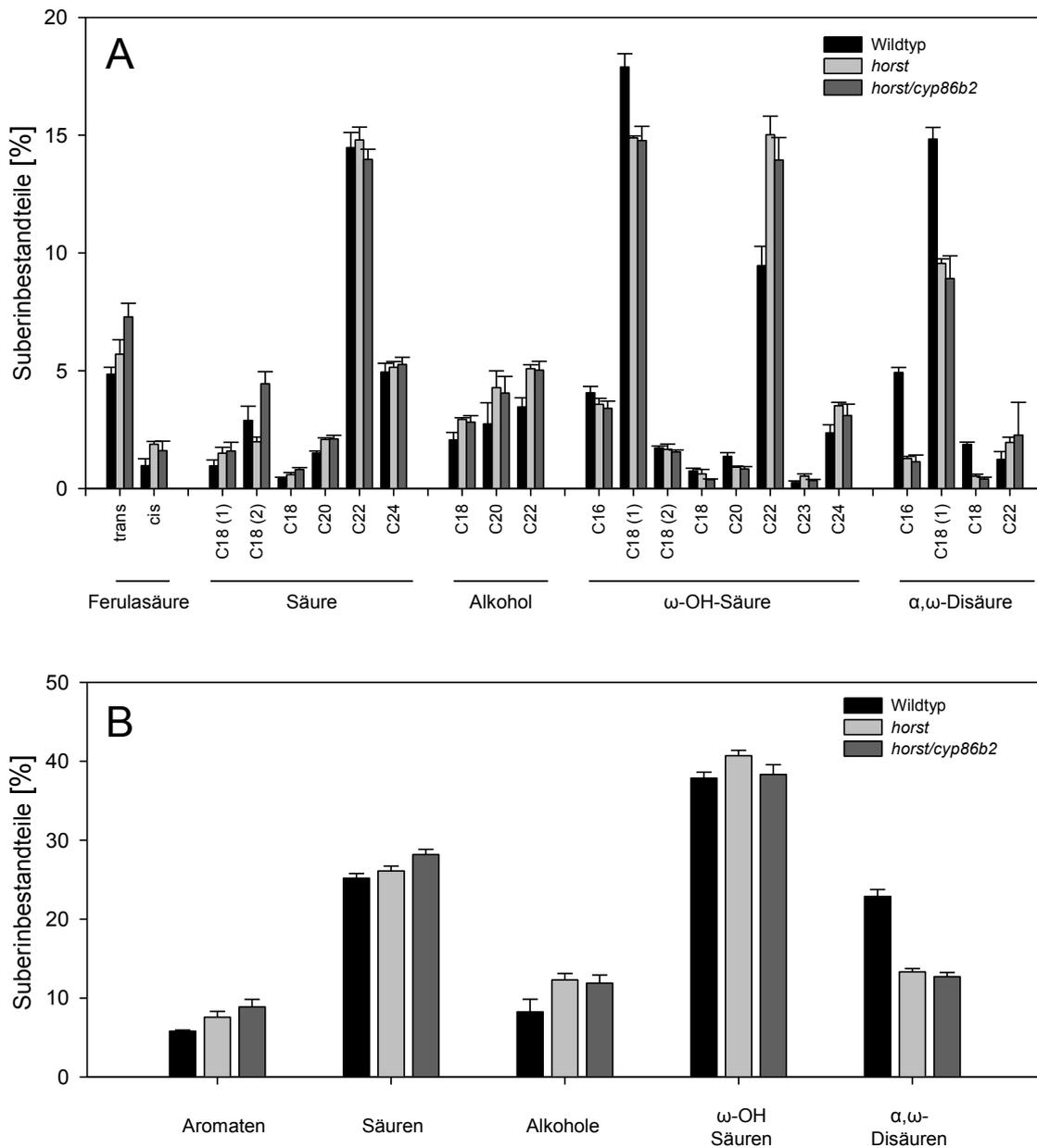


Abbildung 47: Vergleich der relativen Zusammensetzung des Suberinpolyesters der Doppelmutante *horst/cyp86B2*, der Mutante *horst-1* und des korrespondierenden Wildtyps
 (A) Darstellung der relativen Verteilung der Monomere der *horst/cyp86B2* Doppelmutante, der *horst-1* Mutante und des korrespondierenden Wildtyps. (B) Vergleich der relativen Verteilung der Stoffklassen der *horst/cyp86B2* Doppelmutante sowie der parallel aufbereiteten *horst-1* Mutantenlinie und des korrespondierenden Wildtyps. Die dargestellten Werte sind arithmetische Mittelwerte aus 3 parallelen Einzelanalysen \pm Standardabweichung. Mit Säure = Monocarbonsäure; Alkohol = primärer Alkohol; ω-OH-Säure = ω-Hydroxysäure; α,ω-Disäure = α,ω-Dicarbonsäure

3.9 Physiologische Studien

In den analytischen und anatomischen Studien der vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass eine fehlerhafte oder nicht stattfindende Transkription eines oder mehrerer der Gene *CYP86A1/HORST*, *CYP86B1/RALPH* und *POX* einen Einfluss auf die Zusammensetzung des Suberinpolymers, beziehungsweise des Polyesters der Samenschale hat. In den folgenden Kapiteln soll untersucht werden, ob diese Veränderungen physiologische Konsequenzen auf den Wasser- und Nährstoffhaushalt der Pflanze haben und ob sie die Anfälligkeit der Pflanzen gegenüber abiotischen Stressfaktoren beeinflussen.

3.9.1 Erfassung der Samenschalen-Permeabilität von *Arabidopsis*

Insertionsmutanten

Der hier durchgeführte Tetrazolium-Test erfolgte durch Inkubation der Samen von verschiedenen Insertionsmutanten für 4 h und 24 h in 1 %-iger 2,3,5-Triphenyltetrazoliumlösung. Abbildung 48 zeigt die Ergebnisse nach 4 h Inkubation. Für die Samen des Wildtyps (Abbildung 48 A und D) konnte nach einer Inkubation für 4 h keine Rotfärbung nachgewiesen werden. Alle Samen behielten ihre native Färbung. In einem Inkubations-Zeitraum von 4 h konnte somit kein Triphenyltetrazolium die Samenschale des Wildtyps passieren. Samen der Mutantenlinie *ralph-1* sind in Abbildung 48 (B) und (E) gezeigt. Im Gegensatz zu den Samen des Wildtyps war hier bei vereinzelt Samen eine Rotfärbung erkennbar (Abbildung 48 A). Bei einer genaueren Betrachtung der Samen ist ersichtlich, dass eine einsetzende Rotfärbung von der Mikropyle ausging. Die Mikropyle ist die Region der Samenschale, welche die Radicula bei Auskeimung die Samenschale penetriert (Finch-Savage und Leubner-Metzger, 2006). Abbildung 48 (C) und (F) zeigen Samen der *pox*-Mutante nach 4 h Inkubation. Auch hier konnte, wie im Wildtyp keine Rotfärbung nachgewiesen werden. Abbildung 48 (G) und (J) zeigt Samen der Doppelmutante *ralph/pox*. Die Intensität der Rotfärbung und deren Lokalisation ist vergleichbar mit der *ralph* Mutante. Die Samen der Doppelmutantenlinien *kcs17/ralph* (Abbildung 48 H und K) und *ralph/horst* (Abbildung 48 I und L) zeigten ebenfalls eine teils leichte Rotfärbung. Vereinzelt Samen beider Linien zeigten eine intensive Rotfärbung. Dies könnte auf beschädigte oder nicht voll ausdifferenzierte Samen hindeuten.

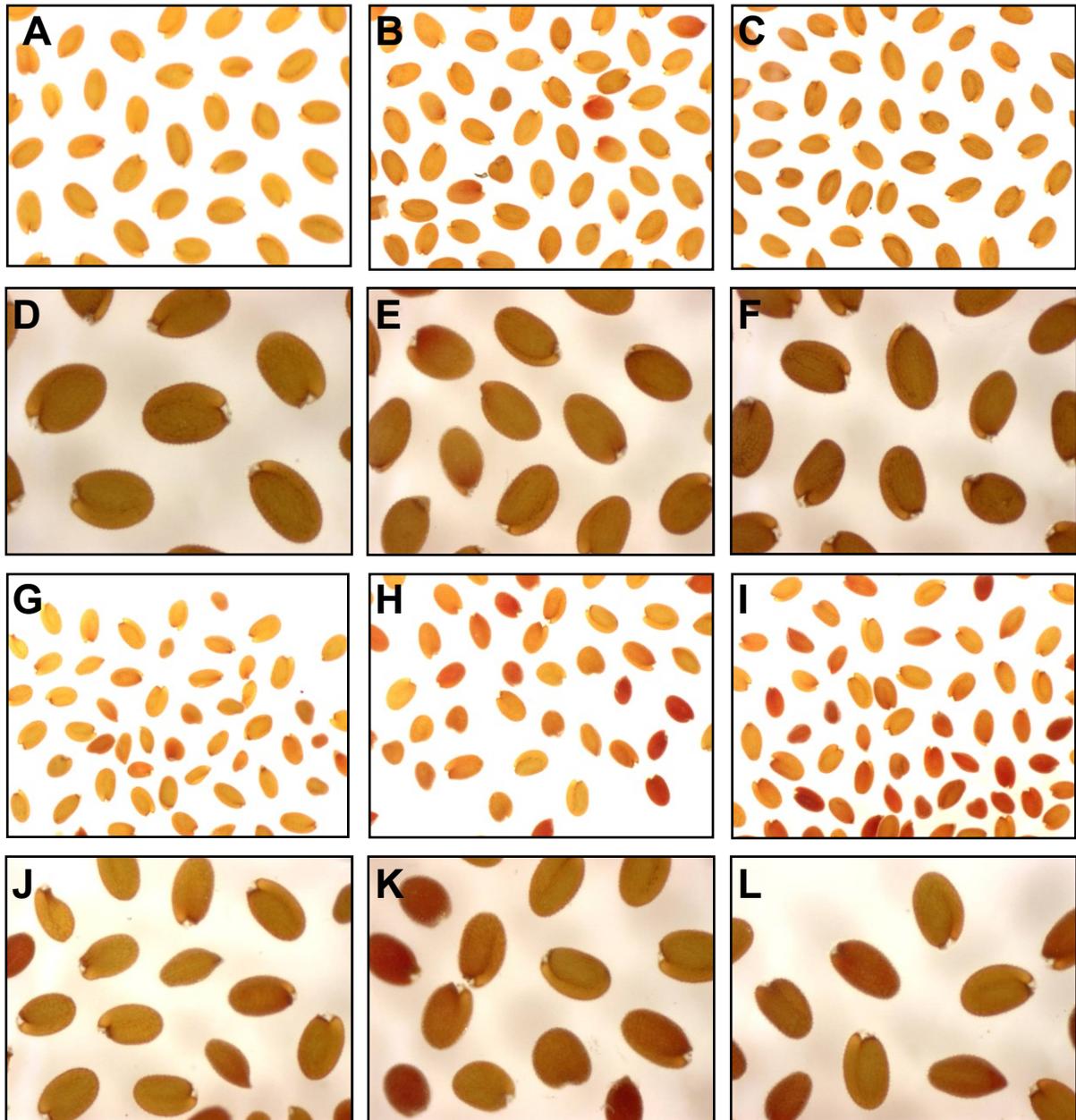


Abbildung 48: Tetrazolium Test zur Bestimmung der Samenschalenpermeabilität

Darstellung der Permeabilität der Samenschale von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp- und Mutantenlinien anhand einer Inkubation der Samen für 4 h in 1 % 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid. (A) und (D) Samen des Wildtyps; (B) und (E) Samen der Mutante *ralph-1*; (C) und (F) Samen der Peroxidase-Mutante *pox*; (G) und (J) Samen der Doppelmutante *ralph/pox*; (H) und (K) Samen der Doppelmutante *kcs17/ralph*; (I) und (L) Samen der Doppelmutante *ralph/horst*

Die Ergebnisse des Tetrazolium-Tests nach 24 h sind in Abbildung 49 gezeigt. An Samen aller untersuchten Pflanzenlinien bis auf Samen der *pox* Mutante konnte eine deutliche Intensivierung der Rotfärbung nachgewiesen werden. Samen der *pox* Mutante (Abbildung 49 C und F) zeigten die gleiche Färbung wie nach 0 h und 4 h Inkubation in 1 % Triphenyltetrazolium. Samen des Wildtyps (Abbildung 49 A und D) wiesen nach 24 h Inkubation eine deutliche Rotfärbung auf. Auch hier ging die Färbung von der Region der Mikropyle aus. Vereinzelt zeigten Samen über die gesamte Fläche eine Färbung. Samen der Mutantenlinie *ralph-1* (Abbildung 49 B und E) zeigten eine teilweise intensivere Rotfärbung als Samen des Wildtyps. Jedoch waren auch hier die Ergebnisse inhomogen und ließen keinen Vergleich mit dem Wildtyp zu. Während manche Samen intensiv rot angefärbt waren, zeigten einige Samen geringe oder keine Rotfärbung. Für die Doppelmutanten *kcs17/ralph* (Abbildung 49 H und K) und *ralph/horst* (Abbildung 49 I und L) konnten vergleichbare Ergebnisse wie an Samen des Wildtyps gezeigt werden. Auch bei Samen der Doppelmutante *ralph/pox* konnten ungefärbte, leicht gefärbte und stark gefärbte Samen in einem Ansatz nachgewiesen werden. Allerdings zeigte hier der überwiegende Teil der Samen eine sehr intensive Rotfärbung im Vergleich zu den anderen untersuchten Linien.

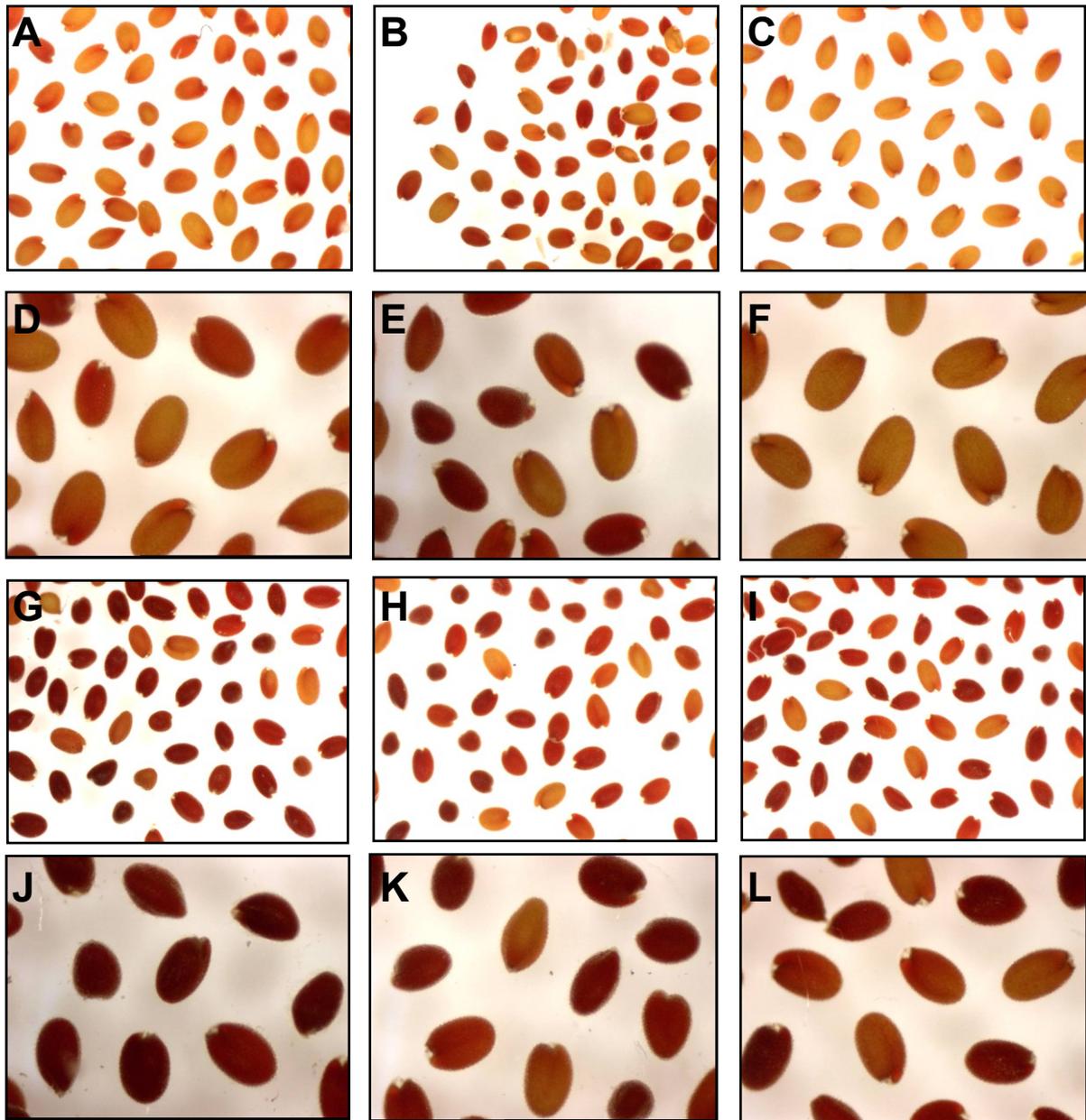


Abbildung 49: Tetrzolium Test zur Bestimmung der Samenschalenpermeabilität

Darstellung der Permeabilität der Samenschale von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp- und Mutantenlinien anhand einer Inkubation der Samen für 24 h in 1 % 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid. (A) und (D) Samen des Wildtyps; (B) und (E) Samen der Mutante *ralph-1*; (C) und (F) Samen der Peroxidase-Mutante *pox*; (G) und (J) Samen der Doppelmutante *ralph/pox*; (H) und (K) Samen der Doppelmutante *kcs17/ralph*; (I) und (L) Samen der Doppelmutante *ralph/horst*

3.9.2 Bestimmung der Keimungsrate und der Überlebensrate von Keimlingen in *ralph/horst*

In diesem Versuch sollte die Keimungsrate und die Überlebensrate von Keimlingen der Doppelmutante *ralph/horst* und des korrespondierenden Wildtyps in Nährmedium mit ansteigenden NaCl- und KCl-Konzentrationen erfasst und miteinander verglichen werden.

Die Überlebensrate von Keimlingen beider betrachteten Linien unter ansteigenden NaCl-Konzentrationen konnte als weitestgehend gleich betrachtet werden (Abbildung 50 B). In beiden Linien wurde auf Standard MS-Agar ohne Zugabe von NaCl eine Überlebensrate von 99-100 % nachgewiesen. Unter milden Stressbedingungen bei 50 mM NaCl konnten 82 % der Samen des Wildtyps und 80 % der Samen der *ralph/horst* Doppelmutante lebensfähige Keimlinge ausbilden. Bei 100 mM NaCl fiel die Überlebensrate der Keimlinge des Wildtyps auf 51 %, die der Keimlinge von *ralph/horst* auf 57 %. Bei NaCl-Konzentrationen über 100 mM waren die Keimlinge beider Pflanzenlinien nicht lebensfähig.

Bei ansteigenden KCl-Konzentrationen im Nährmedium zeigten die Keimlinge der Doppelmutante eine deutlich verringerte Überlebensrate. 50 mM KCl im Nährmedium wurden von 89 % der Keimlinge des Wildtyps toleriert. Bei Keimlingen der *ralph/horst* Linie war die Überlebensrate hier mit 71% deutlich verringert. 100 mM KCl tolerierten 68 % der Wildtypkeimlinge, während hier im Falle der Doppelmutante nur 46 % der Keimlinge überlebensfähig waren. Auch hier konnten, wie im Falle der Auskeimung auf NaCl-haltigem MS-Agar, Keimlinge Konzentrationen über 100 mM KCl nicht überleben.

Bei einer Untersuchung der Keimungsrate zwischen Wildtyp und *ralph/horst* Doppelmutante konnten weitaus größere Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 50 B). In beiden Salzstress-Behandlungen war die Keimungsrate von Samen der *ralph/horst* Linie über einen weiten Konzentrationsbereich deutlich erhöht. Im Falle einer NaCl-Konzentration von 50 mM konnten keine signifikanten Unterschiede in der Keimungsrate festgestellt werden. In beiden Linien lag die Keimungsrate bei etwa 82 %. Eine Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 100 mM hatte auf die Keimungsrate von *ralph/horst* Samen keine Auswirkungen. Es konnte bei 82 % der Samen der Doppelmutantenlinie eine Penetration der Samenschale durch die Keimlingswurzel beobachtet werden. Für Samen des Wildtyps wurde bei gleicher NaCl-Konzentration eine Keimungsrate von 68 % festgestellt. Bei weiter ansteigenden Konzentrationen wurde dieser Effekt deutlicher. Die Keimungsrate bei 150 mM NaCl lag bei Wildtypsamen bei 29 %, während bei Samen der *ralph/horst* Linie die Keimungsrate mit 64 % mehr als doppelt so hoch war. Diese Tendenz wurde ebenfalls bei Konzentrationen von 200 mM und 250 mM NaCl beobachtet. Hier war die Keimungsrate der Doppelmutantenlinie etwa dreifach, beziehungsweise sechsfach erhöht im Vergleich zum Wildtyp. Eine erhöhte Keimungsrate von Samen der Linie *ralph/horst* konnte auch im Falle von KCl als Stressor nachgewiesen werden. Hier konnte bei 50 mM KCl eine Keimungsrate

von 68 % bei Samen des Wildtyps und 77 % bei Samen der Linie *ralph/horst* festgestellt werden. Bei 100 mM KCl war für Samen des Wildtyps eine Keimungsrate von 62 % feststellbar, bei 150 mM und 200 mM KCl lag die Keimungsrate des Wildtyps bei 37 - 39 %. Bei 250 mM und 300 mM KCl keimten etwa 3 % der Samen des Wildtyps. Bei Betrachtung der Keimungsrate der *ralph/horst* Samen konnte bei KCl-Konzentration von 50 mM bis 200 mM keine Abnahme der Keimungsrate festgestellt werden. Sie lag bei 77 – 82 %. Bei 250 mM und 300 mM KCl war die Keimungsrate der *ralph/horst* Samen mit 16 %, beziehungsweise 17 % immer noch fünffach höher als bei Samen des Wildtyps.

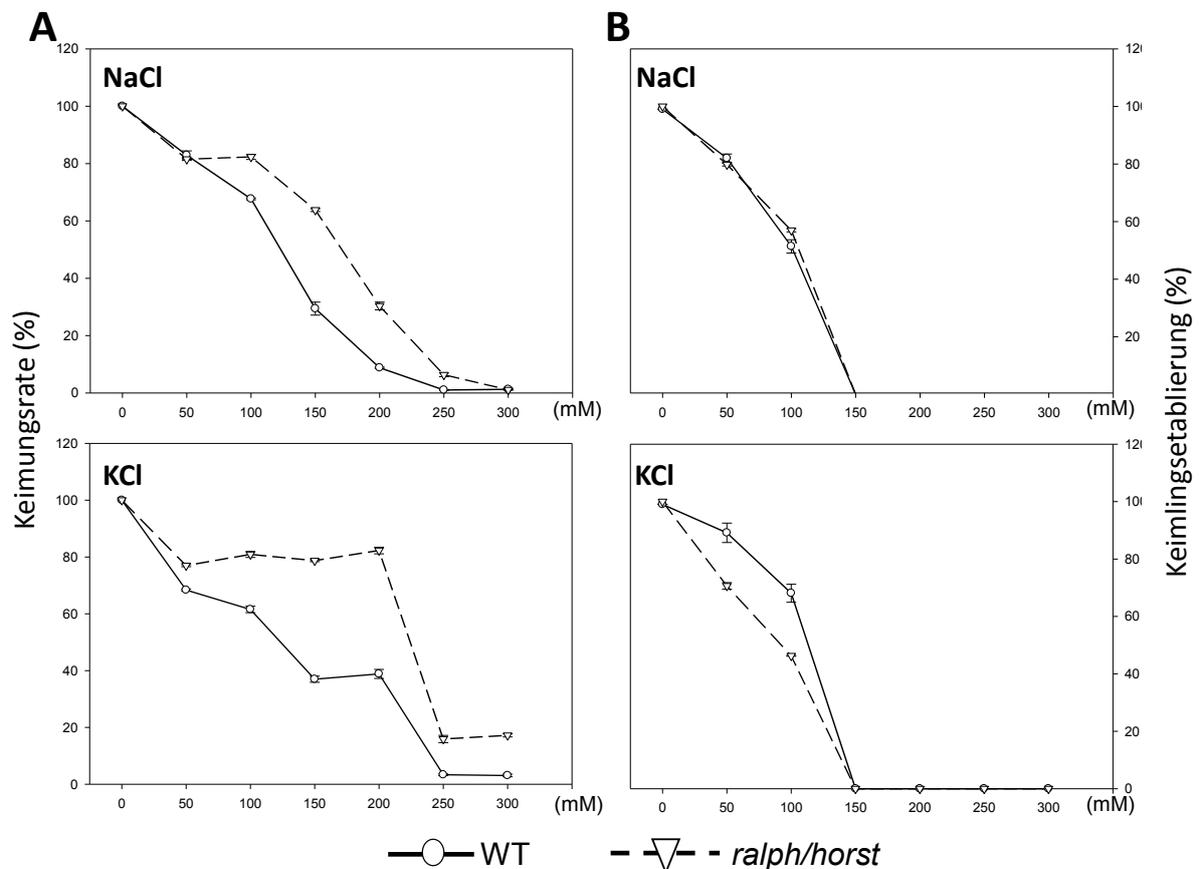


Abbildung 50: Prozentuale Darstellung der Samenkeimungsrate und der Überlebensrate von *Arabidopsis* Keimlingen der *ralph/horst* Doppelmutante und des korrespondierenden Wildtyps
Darstellung der prozentualen Keimungsrate (A) und der Überlebensrate von Keimlingen (B) von *ralph/horst* Keimlingen und Keimlingen des korrespondierenden Wildtyps in MS-Agar mit ansteigenden Konzentrationen an NaCl und KCl nach 14 Tagen. Keimung wurde definiert als Penetration der Samenschale durch die Radicula, lebensfähige Keimlinge wurden determiniert durch die Ausbildung von 2 grünen Kotyledonen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus 3 Parallelen mit je etwa 150 Samen/Parallele. Fehlerbalken zeigen das 95 % Konfidenzintervall.

3.9.3 Sensitivität von Wurzelsuberinmutanten gegenüber Salzstress und osmotischem Stress

Die Untersuchung der Toleranz gegenüber Salzstress und osmotischem Stress diente der Aufklärung der Barrierefunktion des aliphatischen Suberins in der Wurzel von *Arabidopsis thaliana* in Bezug auf apoplastisch transportierte Solute.

Pflanzen des Wildtyps und der Mutanten *cyp86B1-1/ralph-1* und *ralph/horst* wurden für 9 Tage auf Standard MS-Agar, wie in 2.3.3 beschrieben, angezogen und nach 9 Tagen auf MS Agar mit ansteigenden NaCl (50/100/200 mM) oder Mannitolkonzentrationen (75/150/300 mM) transferiert. Die Keimlinge wurden an der Wurzelbasis ausgerichtet um Habitus und Wachstum von Wurzel- und Sprossbereichen vergleichen zu können und für weitere 11 Tage unter den gegebenen Stressbedingungen angezogen und fotografiert.

Die ansteigende Konzentration von Stressfaktoren hatte Auswirkungen auf Wachstum und Anatomie der Pflanzen. Bei 50 mM und 100 mM NaCl waren Verringerungen des Wurzelwachstums und verminderte Seitenwurzelbildung zu beobachten. Eine Anreicherung von 200 mM NaCl im Nährmedium stellte für die Pflanzen eine toxische Konzentration dar. Nach Überführen der gesunden Keimlinge auf MS-Agar mit 200 mM NaCl fand kein weiteres Wurzel- oder Sprosswachstum statt. Die Blätter der beobachteten Pflanzen blichen aus, der Stoffwechsel kam zum Erliegen.

Die Überführung von Keimlingen auf Mannitol-haltigen MS-Agar führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Auch hier wurde mit ansteigenden Konzentrationen eine Verringerung des Wurzel- und Sprosswachstums festgestellt. Die Wurzeln zeigten bei 75 mM und 150 mM Mannitol eine verringerte Seitenwurzelbildung und ein teilweise eingeschränktes Wurzelwachstum. Im Gegensatz zur Behandlung mit NaCl scheint bei der höchsten hier verabreichten Konzentration, 300 mM Mannitol im Nährmedium, die toxische Grenze noch nicht erreicht zu sein. Das Wachstum von Spross- und Wurzelgeweben war bei 300 mM Mannitol stark eingeschränkt, jedoch waren die oberirdischen Teile der Pflanze weiterhin grün und turgoreszent.

Bei Vergleich der unterschiedlichen Genotypen konnten unter allen hier angelegten Stresskonditionen keine Unterschiede festgestellt werden. Ansteigende NaCl- und Mannitolkonzentration im Nährmedium bedingten phänotypische Änderungen im Pflanzenhabitus, jedoch konnte für keine der untersuchten Pflanzenlinien eine veränderte Sensitivität gegenüber den angebotenen Stressfaktoren festgestellt werden.

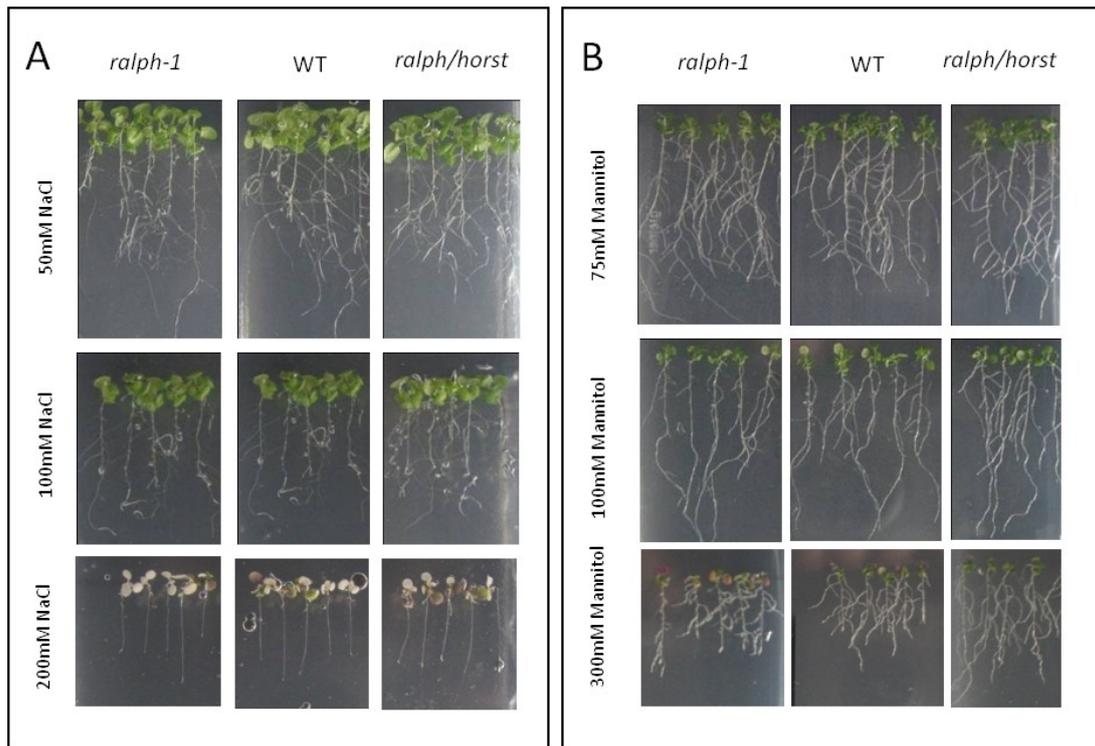


Abbildung 51: Phänotypische Auswirkungen von Salzstress und osmotischem Stress bei *Arabidopsis* Keimlingen

Fotografische Aufnahmen von 21 Tage alten Keimlingen der Linien *cyp86B1-1/ralph-1*, *ralph/horst* und des Wildtyps. Die Keimlinge wurden 11 Tage unter den angegebenen NaCl- (A) und Mannitol-Konzentrationen (B) auf MS-Agar angezogen.

3.9.4 Phänotypische Auswirkungen von Trockenstress auf *Arabidopsis* Wurzelsuberinmutanten

In dem hier durchgeführten Austrocknungsexperiment sollte der Einfluss einer veränderten Wurzelsuberin-Zusammensetzung auf die Toleranz der Pflanze gegenüber langfristigen Wassermangelbedingungen dargestellt werden. Aufgrund der stark beeinflussten Komposition des Wurzelsuberins wurden hier die Insertionsmutantenlinien *cyp86B1-1/ralph-1* und *cyp86A1-1/horst-1* und die korrespondierende Doppelmutantenlinie *ralph/horst* verwendet. Eine schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufes des Austrocknungsversuches ist in Abbildung 52 (F) dargestellt. Abbildung 52 (D) und (E) zeigt die Ergebnisse der Messung der Transpirationsrate und der photochemischen Quantenausbeute als Maß für die Photosyntheserate. Die hier gezeigten Messungen erfolgten an Pflanzen in 100 % Anzuchterde 4 Tage nach der letzten Wässerung und lagen in der Größenordnung der Literaturwerte (Nobel, 1991; Shi *et al.*, 2003). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Transpirations- und Photosyntheserate zwischen den untersuchten Pflanzenlinien festgestellt werden. Messungen der Transpirationsrate und der photochemischen Quantenausbeute an Pflanzen, die auf einem Gemisch aus 25 % Sand

und 75 % Erde (w/w) als Substrat gewachsen sind, zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Genotypen.

Ein Wachstum auf reinem Quarzsand war für keine der untersuchten Linien möglich. Die Pflanzen keimten zwar aus, waren jedoch unter den angelegten Anzuchtbedingungen nicht lebensfähig. Fünf Tage nach Aussaat auf 100 % Sand war die Überlebensrate 0 %.

Bei einem Mischungsverhältnis von 25 % Quarzsand und 75 % Anzuchterde (w/w) konnten erste Merkmale für Trockenstress acht Tage nach der letzten Wässerung beobachtet werden (Abbildung 52 A). Rosettenblätter der T-DNA Insertionsmutantenlinie *cyp861-1/horst-1* sowie des Wildtyps zeigten eine verringerte Turgeszenz der Blätter und beginnende Nekrosen, erkennbar an einer Gelbfärbung an den Blatträndern. Die Insertionsmutante *cyp86B1-1/ralph-1* und die Doppelmutantenlinie *ralph/horst* zeigten zum gleichen Zeitpunkt keine Anzeichen von Trockenstress. Erste Anzeichen von Trockenstress für *ralph-1* und *ralph/horst* in 25 % Quarzsand und 75 % Erde als Substrat konnten 10 Tage nach der letzten Wässerung beobachtet werden.

Bei Pflanzenwachstum auf 100 % Anzuchterde konnten erste Trockenstressindikatoren 12 Tage nach der letzten Wässerung beobachtet werden (Abbildung 52 B). Auch hier zeigten sich ein verringerter Turgor in Blattgeweben und beginnende Nekrosen ausschließlich im Wildtyp und in der *horst-1* Mutante (Abbildung 52 B). Die Mutantenlinien *ralph-1* und *ralph/horst* zeigten erst 14 Tage nach der letzten Wässerung vergleichbare Phänotypen. Im Kontrollversuch konnten für die untersuchten Pflanzenlinien zu keiner Zeit phänotypische Unterschiede nachgewiesen werden (Abbildung 52 C).

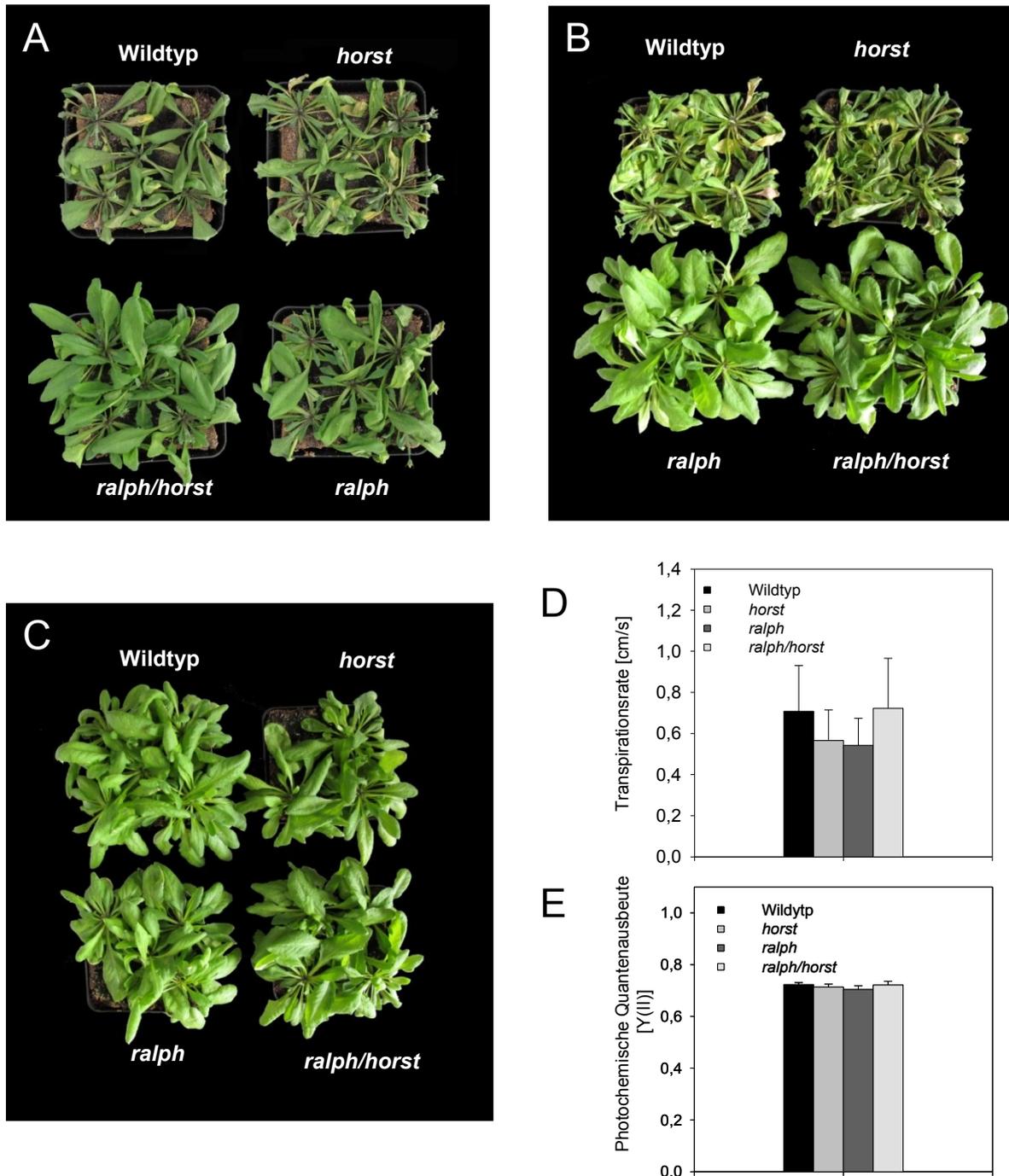


Abbildung 52: Darstellung der Austrocknungstoleranz von Suberinmutanten in *Arabidopsis*

Fotografische Aufnahmen von Pflanzen der Linien *cyp86B1-1/ralph-1*, *cyp86A1-1/horst-1*, *ralph/horst* und des Wildtyps in einem Substrat aus 25 % Quarzsand und 75 % Anzuchterde 8 Tage nach der letzten Wässerung (A) und in einem Substrat aus 100 % Anzuchterde 12 Tage nach der letzten Wässerung (B). (C): Kontrollversuch unter Standard-Anzuchtbedingungen; Bestimmung der stomatalen Transpirationsrate (D) und der photochemischen Quantenausbeute (E) an Blättern der untersuchten Pflanzenlinien 4 Tage nach der letzten Wässerung;

3.10 Erfassung der differentiellen Genexpression in

Wurzelgeweben von Suberinmutanten mittels Microarray

Ziel dieses Versuches war die Erfassung der differentiellen Genexpression in Wurzelgeweben der Linien *cyp86A1-1/horst-1* und *ralph/horst* im Vergleich mit dem Wildtyp. Wie in Kapitel 3.7.2 gezeigt, zeichnen sich beide Mutantenlinien durch ein hochgradig verändertes Wurzelsuberin aus. Die Erfassung der differentiellen Genexpression sollte hier fokussiert werden auf Gewebe, in denen Biosynthese des endodermalen Wurzeluberins stattfindet. Die Detektion dieser Gewebe erfolgte im *Arabidopsis* Wildtyp und in der Linie *ralph/horst* durch histochemische Detektion von Suberinlamellen mit Sudan 7B in Dünnschnitten primärer Wurzelgewebe, wie in Kapitel 2.9 beschrieben. Wie in Abbildung 43 zu sehen, konnte Suberinisierung hier bereits in Bereichen 12 mm basal zur Wurzelspitze detektiert werden. Für die *knockout* Mutante *horst-1* konnte, laut Literaturangaben, eine beginnende Einlagerung von Suberin in die Gewebe der primären Wurzel in einem Bereich 20 mm basal zur Wurzelspitze detektiert werden (Ranathunge und Schreiber, 2011). Anhand der vorliegenden Daten wurde RNA, wie in 2.8.1 beschrieben, aus den primären Wurzelbereichen 10 mm bis 25 mm basal zur Wurzelspitze extrahiert und für die Erfassung der differentiellen Genexpression mittels Microarray aufbereitet. Die Qualitätskontrolle und Aufbereitung der RNA Extrakte, die Durchführung des Microarrays und die Qualitätskontrolle der erhaltenen Datensätze erfolgten durch die Firma imaGenes (ImaGenes GmbH, Berlin). Die erhaltenen Datensätze besaßen eine ausreichende Qualität für eine Auswertung der Expressionsdaten. Detaillierte Informationen über die Qualität der einzelnen Expressionsdatensätze sind in Kapitel 7.5.1 und 7.5.3 zusammengefasst

Zur Darstellung der differentiellen Genexpression in den Wurzelgeweben der untersuchten Pflanzenlinien wurden die 600 Gene mit den höchsten Expressionsdifferenzen zwischen der jeweiligen Mutante und dem Wildtyp erfasst, anhand verfügbarer Genannotationen klassifiziert, in Gruppen eingeteilt und grafisch dargestellt.

Die Gruppe "Acyl-Lipide" beinhaltet Gene, deren Funktion eindeutig mit dem Fettsäuremetabolismus assoziiert sind. In diese Gruppe fallen beispielsweise Fettsäure-Elongasen, Acyl-Transferasen, Lipasen, und Acyl-spezifische Transporter. Die Gruppe der "regulatorischen Proteine" enthält hauptsächlich Proteinkinasen und Proteinphosphatasen, die in Signalkaskaden entscheidend an der Signaltransduktion in der Zelle beteiligt sind. In der Kategorie "Metabolismus" sind Gene zusammengefasst, die im Primärmetabolismus der Pflanze involviert sind. Hier sind zum größten Teil Enzyme des Glukose- und Aminosäurestoffwechsels zusammengefasst. In der Gruppe der "Stress-induzierten Gene" sind Gene gruppiert, die von der Pflanze als Reaktion auf biotische oder abiotische Stressstimuli exprimiert werden und in der Stresstoleranz der Pflanze involviert sind. In der Gruppe der "Proteolyse"-assoziierten Gene sind Transkriptionsprodukte

gruppiert, die einen Zusammenhang zum enzymatischen Proteinabbau in der Zelle aufweisen.

Die Gruppe "gemischte Funktionen" repräsentiert Gene, die keiner der anderen Gruppen direkt zugeordnet werden konnten. Aufgrund ihrer diversen katalytischen Reaktionen in Pflanzen finden in dieser Gruppe auch Mitglieder der Enzymfamilien der Cytochrom-P450-Monooxygenasen und Peroxidasen Eingang. Auch Enzyme des Phenylpropanstoffwechsels sind in dieser Kategorie zusammengefasst. In der Klasse der Gene "unbekannter Funktion" sind Gene gruppiert, die anhand der verfügbaren Genannotationen nicht klassifiziert und keiner der anderen Gruppen zugeordnet werden konnten.

3.10.1 Differenzielle Genexpression in der Suberinmutante *horst-1*

Abbildung 53 zeigt eine grafische Darstellung der relativen Verteilung der differenziell hochregulierten Gene in *horst-1*. Die Gene wurden nach den in Kapitel 3.10 genannten Kriterien in Gruppen eingeteilt.

5,8 % der hier erfassten, hochregulierten Gene in *horst-1* sind charakterisiert durch eine direkte Beteiligung am Lipidmetabolismus. 7,1 % codieren für Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation der Genexpression beteiligt sind, 18,3 % der differenziell hochregulierten Gene codieren für regulatorische Proteine. 3,7 % codieren für Proteine, deren Expression durch biotische und abiotische Stresseinflüsse reguliert werden. 10,2 % der hochregulierten Gene konnten dem Primärmetabolismus zugeordnet werden. 2,4 % der hier erfassten differenziell hochregulierten Gene sind an der Proteolyse beteiligt. Die Gruppe der Gene mit gemischten Funktionen machte 24,1 % der differenziell hochregulierten Gene aus. 28,5 % der differenziell hochregulierten Gene konnten anhand der Microarray-Datensätze nicht charakterisiert und klassifiziert werden.

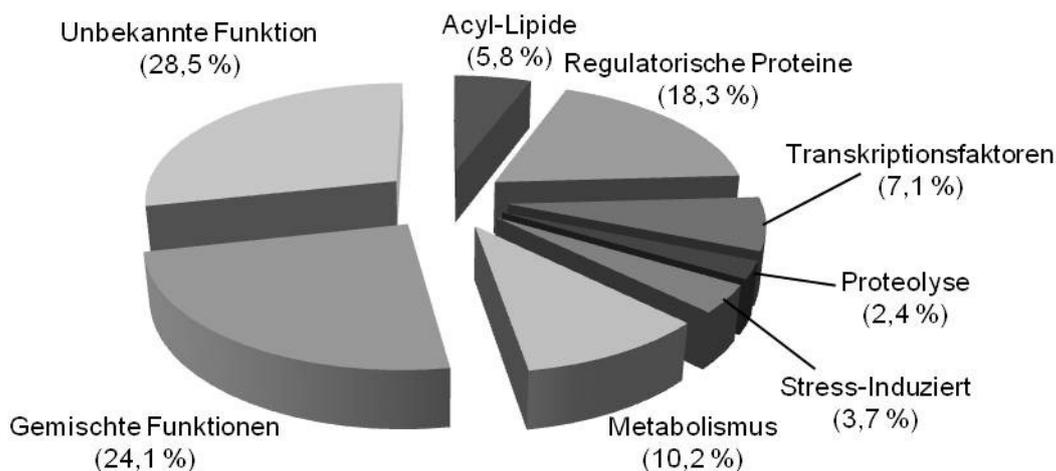


Abbildung 53: Differenziell hochregulierte Gene in den Geweben der Wurzelspitze der Mutante *horst-1*

Differenziell hochregulierte Gene in den Geweben der Wurzelspitze von *horst-1* Linien. Gene unbekannter Funktion konnten anhand der Microarray-Datensätze nicht klassifiziert werden. Gene gemischter Funktion konnten anhand der Microarray-Daten klassifiziert, jedoch keiner der anderen Gruppen zugeordnet werden. Zusammengefasst ist hier jeweils die differenzielle Genexpression der 300 Gene mit der jeweils höchsten Änderung bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 10 % ($p = 0,1$)

Abbildung 54 zeigt eine grafische Darstellung der relativen Verteilung der Top 300 der differenziell runterregulierten Gene in *horst-1*. Die Gene wurden nach den oben genannten Kriterien in Gruppen eingeteilt.

1,3 % dieser Gene waren direkt am Lipidmetabolismus beteiligt. 7,6 % der differenziell runterregulierten Gene codierten für Transkriptionsfaktoren, 9,6 % konnten als regulatorische Proteine klassifiziert werden. 8,3 % der runterregulierten Gene sind durch eine Beteiligung an biotischen und abiotischen Stressreaktionen der Pflanze charakterisiert. 4,2 % der Gene sind beteiligt an der Proteolyse, 9,2 % der Gene konnten dem Primärmetabolismus zugeordnet werden. 15,3 % der runterregulierten Gene konnten keiner der bisher genannten Gruppen zugeordnet werden. Fast die Hälfte (45,5 %) der differenziell runterregulierten Gene in *horst-1* konnte anhand der vorliegenden Datensätze nicht identifiziert und klassifiziert werden.

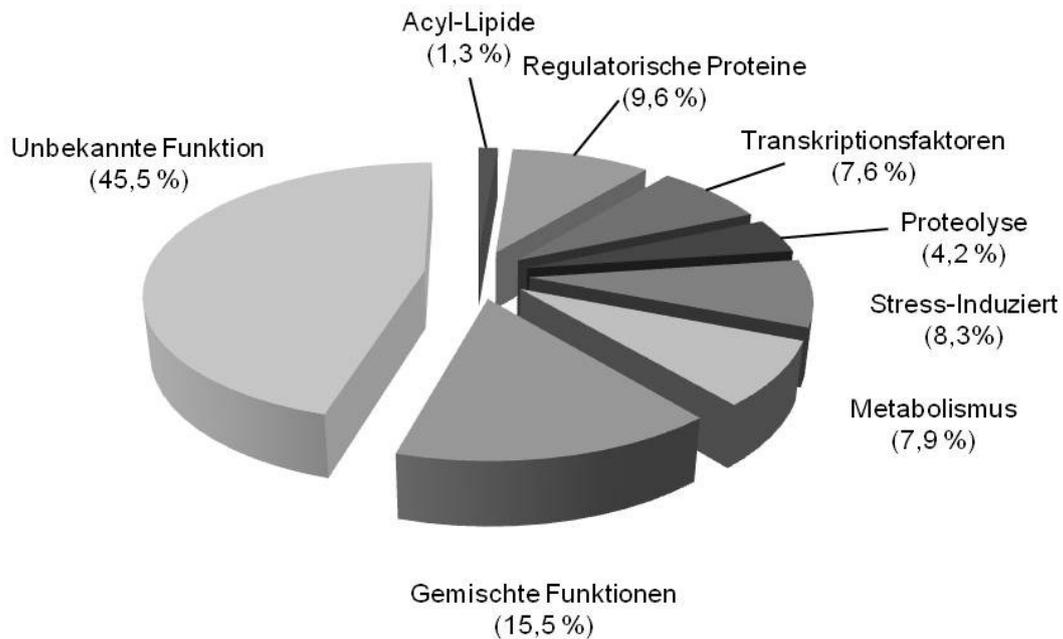


Abbildung 54: Differenziell runterregulierte Gene in den Geweben der Wurzelspitze der Mutante *horst-1*

Differenziell runterregulierte Gene in den Geweben der Wurzelspitze von *horst-1* Linien. Gene unbekannter Funktion konnten anhand der Microarray-Datensätze nicht klassifiziert werden. Gene gemischter Funktion konnten anhand der Microarray-Daten klassifiziert, jedoch keiner der anderen Gruppen zugeordnet werden. Zusammengefasst ist hier jeweils die differenzielle Genexpression der 300 Gene mit der jeweils höchsten Änderung bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 10 % ($p = 0,1$)

Neben der hier beschriebenen Gruppierung der Gene wurde in einem weiteren Versuchsansatz der Datensatz der differenziell exprimierten Gene in *horst-1* nach Genen durchsucht, deren Translationsprodukte direkt oder indirekt an der Suberinbiosynthese beteiligt sein könnten, beziehungsweise von der Pflanze exprimiert werden, um die geänderten Barriereigenschaften des Suberins in der *horst-1* Mutante zu kompensieren. Eine Auswahl von Kandidatengenen ist in Tabelle 29 und Tabelle 30 in Kapitel 7.5.2 zu finden.

3.10.2 Differenzielle Genexpression in der Doppelmutante

ralph/horst

Die relative Verteilung der differenziell hochregulierten Gene in *ralph/horst* Doppelmutanten ist in Abbildung 55 grafisch dargestellt. Die Gene wurden nach den in Kapitel 3.10 genannten Kriterien in Gruppen eingeteilt.

2,3 % der differenziell hochregulierten Gene konnten durch eine direkte Beteiligung am Lipidmetabolismus charakterisiert werden. 11 % der differenziell hochregulierten Gene in *ralph/horst* codieren für Transkriptionsfaktoren, 19 % für andere regulatorische Proteine. 10,7 % der Genprodukte konnte eine Funktion im Primärmetabolismus der Pflanze zugeordnet werden. 0,7 % der Gene waren durch eine Beteiligung an der Proteolyse charakterisiert. 5 % der hochregulierten Gene zeigten eine Beteiligung an der Detektion von und Reaktion auf biotische und abiotische Stressfaktoren. 23 % der hochregulierten Gene in *ralph/horst* wurden der Gruppe der Gene "gemischter Funktionen" zugeordnet. 28,3 % der detektierten Transkriptionsprodukte codieren für Genprodukte, über deren Funktion keine Erkenntnisse vorliegen.

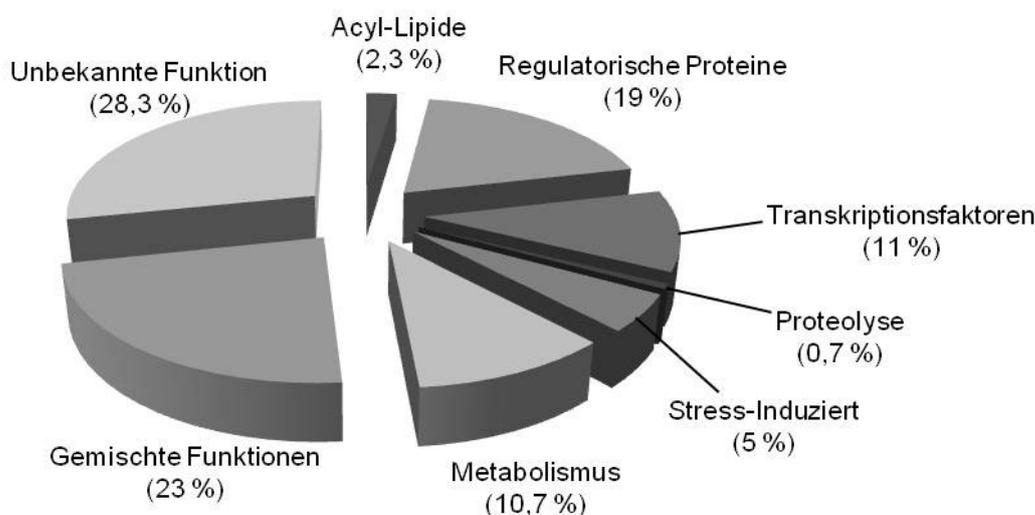


Abbildung 55: Differenziell hochregulierte Gene in den Geweben der Wurzelspitze der Doppelmutante *ralph/horst*

Differenziell hochregulierte Gene in den Geweben der Wurzelspitze von *ralph/horst* Linien. Gene unbekannter Funktion konnten anhand der Microarray-Datensätze nicht klassifiziert werden. Gene gemischter Funktion konnten anhand der Microarray-Daten klassifiziert, jedoch keiner der anderen Gruppen zugeordnet werden. Zusammengefasst ist hier jeweils die differenzielle Genexpression der 300 Gene mit der jeweils höchsten Änderung bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 10 % ($p = 0,1$)

Die relative Verteilung der differenziell runterregulierten Gene ist in Abbildung 56 grafisch dargestellt. 3,6 % der differenziell runterregulierten Gene in der Linie *ralph/horst* waren durch eine Beteiligung am Lipidmetabolismus charakterisiert. 4,3 % codierten für Transkriptionsfaktoren, 10,2 % für andere regulatorische Proteine. 11,8 % der Genprodukte waren charakterisiert durch eine Beteiligung am Primärmetabolismus, 3,2 % der Genprodukte konnten dem Proteolyse-vermittelten Proteinabbau zugeordnet werden. 23,7 % der differenziell runterregulierten Gene in *ralph/horst* wurden in der Gruppe der Gene "gemischter Funktionen" zusammengefasst. 37,2 % der runterregulierten Transkriptionsprodukte codierten für Proteine unbekannter Funktion

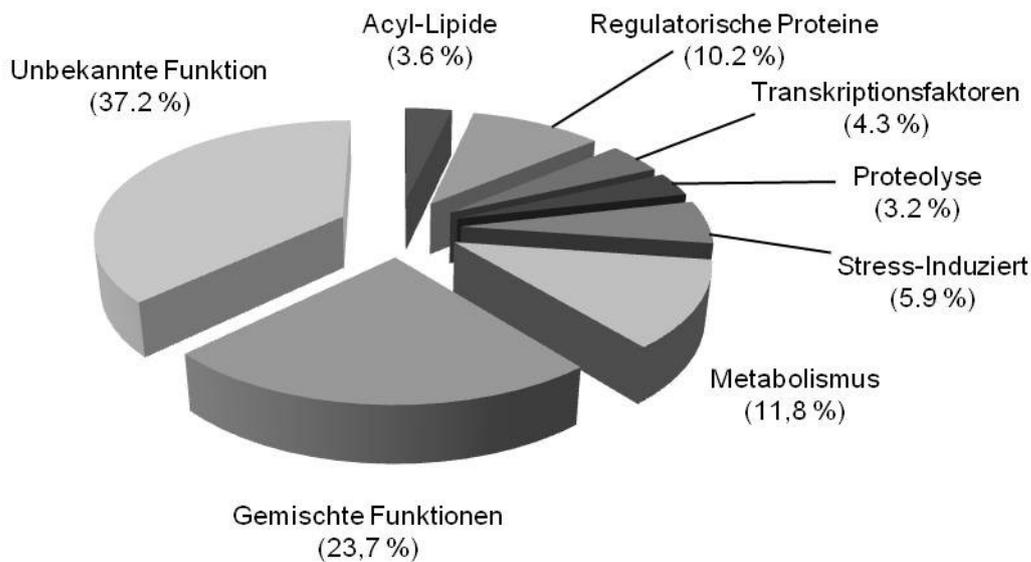


Abbildung 56: Differenziell runterregulierte Gene in den Geweben der Wurzelspitze der Doppelmutante *ralph/horst*

Differenziell runterregulierte Gene in den Geweben der Wurzelspitze von *ralph/horst* Linien. Gene unbekannter Funktion konnten anhand der Microarray-Datensätze nicht klassifiziert werden. Gene gemischter Funktion konnten anhand der Microarray-Daten klassifiziert, jedoch keiner der anderen Gruppen zugeordnet werden. Zusammengefasst ist hier jeweils die differenzielle Genexpression der 300 Gene mit der jeweils höchsten Änderung bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 10 % ($p = 0,1$)

In einem weiteren Versuchsansatz wurde der Datensatz aller differenziell exprimierten Gene in *ralph/horst* nach Genen durchsucht, deren Translationsprodukte direkt oder indirekt an der Suberinbiosynthese beteiligt sein könnten, beziehungsweise von der Pflanze exprimiert werden, um die geänderten Barriereigenschaften des Suberins in der *ralph/horst* Mutante zu kompensieren. Eine Auflistung dieser Kandidatengene ist in Tabelle 31 und Tabelle 32 in Kapitel 7.5.4 gezeigt.

4 Diskussion

4.1 Die Charakterisierung von CYP704B2 in *Oryza sativa*

Männlich sterilen Pflanzenlinien kommt in der Züchtung von Nutzpflanzen eine besondere agronomische und wirtschaftliche Bedeutung zu. Männlich sterile Pflanzen können keinen befruchtungsfähigen Pollen ausbilden und werden in der Hybridzüchtung als Mutterpflanzen zur Produktion von Saatgut eingesetzt. Eine kontrollierte Bestäubung durch ausgesuchte Vaterlinien auf die männlich sterilen Mutterlinien ermöglicht eine erleichterte Generierung von Hybridsorten, welche beispielsweise in Bezug auf den Ertrag optimiert werden können. Die in dieser Arbeit untersuchte *Oryza sativa* Linie *cyp704B2* zeichnet sich durch männliche Sterilität aus und wurde in einem entsprechenden Screening-Verfahren isoliert. Pflanzen dieser Mutantenlinie durchlaufen eine normale vegetative Entwicklung bis zur Ausbildung von Rispen und Blütenorganen, allerdings sind die Antheren der Blüten wesentlich kleiner und tragen keine vollständig ausgebildeten Pollenkörner (Abbildung 14 A und B). Die Ergebnisse der Charakterisierung von CYP704B2 in *Oryza sativa* sind Gegenstand einer Publikation und in Li *et al.*, (2010) zusammengefasst.

In organ- und gewebespezifischen Expressionsstudien im *Oryza sativa* Wildtyp konnte für CYP704B2 ausschließlich Expression in Antheren nachgewiesen werden. Promotor-GUS Studien zeigten eine Expression des Konstrukts *CYP704B2_{pro}:GUS* in den Tapetumzellen der Antheren und in den Geweben der Mikrosporen, jedoch nicht in den Zellen der Antherenepidermis. Mikroskopische Untersuchungen an Antheren der Mutante *cyp704B2* zeigten zu verschiedenen Zeiten der Antheren-, beziehungsweise Pollenentwicklung morphologische und physiologische Defekte in der Entwicklung dieser beiden Pflanzenorgane (Li *et al.*, 2010).

In intakten Antheren findet ein gerichteter Transport von Organellen von den Tapetumzellen des Sporophyten zu den Geweben des Gametophyten statt. Die zeitliche Abfolge des Transports dieser Organellen stimmt überein mit der Ausbildung des Polymers Sporopollenin in der Exine des Pollenkorns. Sporopollenin ist beschrieben als ein von oxygenierten Fettsäuren und Phenylpropanoiden abgeleitetes Biopolymer (Ahlers *et al.*, 2003). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die Gewebe der Antheren an der Formierung des Sporopollenins der Pollenkörner beteiligt sind. Es wird spekuliert, dass in den beobachteten Vesikeln Sporopollenin-Vorstufen transportiert werden. In der Mutante *cyp704B2* konnten diese Transportvesikel während der Pollenentwicklung nicht nachgewiesen werden. Die Sporen der Linie *cyp704B2* zeichnen sich in dieser Phase der Pollenreifung durch eine dünne und unregelmäßige Ausbildung der Exine aus und kollabieren zunehmend. Die Pollenentwicklung in *cyp704B2* führt zu stark degenerierten, nicht funktionsfähigen Pollenkörnern und bedingt die männliche Sterilität der *cyp704B2* Linie (Li *et al.*, 2010).

Die Antheren der Mutante *cyp704B2* zeigen in den späten Phasen der Antherenreifung einen anomalen Aufbau. Während epidermale Zellen in den Antheren des Wildtyps in rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen eine regelmäßige Anordnung aufweisen und von haarartigen Strukturen bedeckt sind, erscheinen Zellen der Antherenepidermis von *cyp704B2* degeneriert und zeichnen sich durch eine glänzende, glatte Oberfläche aus (Abbildung 14). Die mittlere Zelllage der Antheren und die Zellen des Tapetums sind ebenfalls degeneriert und zeigen anomales Zellwachstum.

Die Analyse der Zusammensetzung des Wachses und des Kutins von Antheren des Wildtyps und der Linie *cyp704B2* erfolgte in der Arbeitsgruppe Ökophysiologie der Pflanzen und erforderte zunächst ein Verfahren zur Bestimmung der Oberfläche der zu analysierenden Antheren. Hier wurde ein Korrelationsansatz gewählt, bei dem das erfasste Frischgewicht des Antherenmaterials in die korrelierende Flächeneinheit der Oberfläche umgerechnet werden konnte (Kapitel 2.10.3). Da die Mutation im Gen *CYP704B2* phänotypische Auswirkungen auf die Antherengröße hatte, musste hier eine Oberflächen/Gewichts-Korrelation für die Antheren des Wildtyps sowie für die Antheren der Linie *cyp794B2* durchgeführt werden. Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse sind in Abbildung 15 grafisch dargestellt. Aufgrund ihres kleineren Phänotyps weisen die Antheren der Linie *cyp704B2* bei gleichem Gewicht eine im Vergleich zu den Antheren des Wildtyps mehr als doppelt so große Oberfläche auf.

In der Analyse der Wachszusammensetzung von Antherenkutikeln konnten 18 Monomere identifiziert werden, die dem kutikulären Wachs von Antheren zugeordnet werden konnten. Die absoluten Mengen und die relative Verteilung der Monomere und Stoffklassen des Wachses sind mit Daten aus vorangegangenen Analysen vergleichbar (Jung *et al.*, 2006). In allen Wachsmonomeren, außer der C_{20} und C_{22} Monocarbonsäure und den primären C_{16} Alkohol konnten signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante festgestellt werden. Der Gesamtwachsgehalt war in der Linie *cyp7904B2* signifikant reduziert im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 16, Tabelle 9 und Tabelle 10).

In der Analyse der Zusammensetzung des Kutinpolyesters der Antheren konnten insgesamt 14 Monomere als Methylester identifiziert und dem Antherenkutin von *Oryza sativa* zugeordnet werden. Die identifizierten Monomere konnten den Stoffklassen der Monocarbonsäuren, ω -Hydroxysäuren, α,ω -Dicarbonsäuren und der poly-Hydroxysäuren, beziehungsweise Epoxy-Hydroxysäuren zugeordnet werden. Drei weitere Monomere, hier benannt als URCM-1, URCM-2 und URCM-3 (Unidentified Rice Anther Cutin Monomers) konnten hier nicht klassifiziert, jedoch anhand ihres Massenspektrums identifiziert werden. Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass diese Moleküle Bestandteile des nativen Kutinpolyesters in Reis Antheren sind (Jung *et al.*, 2006). Die erhaltenen Werte der Analyse des Antherenkutins des Wildtyps sind in der Gesamtmenge als auch in der

Monomerverteilung vergleichbar mit Literaturwerten vorausgegangener Antherenkutin-Analysen (Jung *et al.*, 2006).

Die Gesamtmenge des Kutins des Wildtyps betrug $0,823 \pm 0,020 \mu\text{g}/\text{mm}^2$, verteilt auf URCMs (42 %), ω -Hydroxysäuren (26,5 %), Monocarbonsäuren (19 %), poly-Hydroxysäuren/Epoxy-Hydroxysäuren (12 %) und α,ω -Dicarbonsäuren (1 %). Im Vergleich dazu ist die Gesamtmenge des Kutins der Antheren der *cyp704B2* Mutante um mehr als 90 % auf $0,059 \pm 0,012 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ reduziert. Die Reduktion der Gesamtmenge ist auf die Monomere aller beteiligten Stoffklassen übertragbar. Es lag bei allen identifizierten Monomeren eine hochsignifikante Reduktion im Vergleich zum Wildtyp vor.

Die hier durchgeführte Analyse des Antherenkutins konnte zeigen, dass das Genprodukt von *CYP704B2*, trotz seiner auf Tapetumzellen und Mikrosporen beschränkten Expression, von zentraler Bedeutung für die Ausbildung der Kutinmatrix auf der Oberfläche der Antherenepidermis ist. Das stark reduzierte Kutin in der Mutante *cyp704B2* ist wahrscheinlich die Ursache für den strukturellen Defekt der Antherenkutikula (Abbildung 14 E). Aus Studien an Kutinmutanten in *Arabidopsis* ist bekannt, dass eine veränderte Zusammensetzung des Kutinpolymers eine Störung in der Ausbildung der Organidentität bedingen kann (Wellesen *et al.*, 2001; Kurdyukov *et al.*, 2006). Dies kann hier möglicherweise auch auf die Organgröße übertragen werden. Die verringerte Gesamtmenge und die veränderte Zusammensetzung des Antherenkutins der *cyp704B2* Mutante beeinflussen behindern hier möglicherweise die korrekte Inkorporation von interkutikulären und epikutikulären Wachsen in die Polymermatrix, wodurch eine glatte und glänzende Antherenoberfläche ausgebildet wird. Somit wären die Änderungen in der Wachszusammensetzung der Kutikula der Antheren von *cyp704B2* bedingt durch die Aberration in der Zusammensetzung des Kutins und kein direkter Effekt einer veränderten Wachsbiosynthese.

Mutanten der Linie *cyp704B2* zeigen weiterhin, wie oben erwähnt, Defekte in der Entwicklung der Mikrosporen, wahrscheinlich verursacht durch eine fehlerhafte Synthese von Sporopollenin-Vorstufen. Die Beobachtung von Defekten in der Ausbildung der Biopolymere Kutin und Sporopollenin in Abwesenheit von *CYP704B2* deuten auf einen zumindest teilweise überlappenden Syntheseweg dieser beiden Biopolymere mit *CYP704B2* als zentralem Enzym hin. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Tatsache, dass Sporopollenin und Kutin ähnliche aliphatische Komponenten in ihrer Polymermatrix aufweisen (Morant *et al.*, 2007; Dobritsa *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010).

4.2 Kandidatengene der Suberinbiosynthese in *Arabidopsis thaliana*

Transkriptomanalysen des Phellets der Korkeiche (Soler *et al.*, 2007) konnten zeigen, dass neben den Cytochrom-P450-Monooxygenasen und den β -Ketoacyl-CoA-Synthasen diverse weitere Enzyme, beziehungsweise Enzymfamilien in suberinisierten Geweben der Pflanze einer erhöhten Expression unterliegen. Dies konnte unter anderem gezeigt werden für ABC-Transporter (ATP Binding Cassette Transporter). ABC-Transporter sind Transmembranproteine, welche möglicherweise am Export der Suberinbausteine aus der Zelle in den Apoplasten beteiligt sind. Auch GDGL-Lipasen, Enzyme des Lipidmetabolismus, welche eine Freisetzung von veresterten Fettsäuren, beispielsweise aus Glycerolipiden katalysieren, zeigen eine erhöhte Expression im Phellem der Korkeiche.

In *in silico*-Koexpressionsstudien in *Arabidopsis* mittels ATTED-II mit *CYP86A1/HORST* und *CYP86B1/RALPH* als Ausgangspunkt konnte festgestellt werden, dass die Expression von Mitgliedern der GDGL-Lipase Enzymfamilie (At5g37690) und der Enzymfamilie der ABC-Transporter (At5g19410) mit diesen beiden zentralen Enzymen der Suberinbiosynthese koreguliert sind.

Bei der Analyse der Koexpression konnte weiterhin gezeigt werden, dass zwei putative Peroxidase-Gene, At1g68850 und At5g14130, hochgradig mit *CYP86B1/RALPH* koexprimiert, beziehungsweise koreguliert sind. Eine abgeschwächte Koexpression mit *CYP86B1/RALPH* konnte hier auch für das Peroxidase-Gen At5g15180 nachgewiesen werden. Die Beteiligung von Peroxidasen an der Biosynthese, beziehungsweise der Polymerisierung der aromatischen Domäne des Suberins konnte bereits in biochemischen Studien an Wundperidermen der Kartoffel als auch in *in vitro*-Versuchen mit pflanzlichen Peroxidasen nachgewiesen werden (Bernards *et al.*, 1999; Quiroga *et al.*, 2000; Arrieta-Baez und Stark, 2006). Weiterhin konnte ein putatives integrales Membranprotein unbekannter Funktion (At5g44550) identifiziert werden, dessen Expression hochgradig koreguliert ist mit *CYP86B1/RALPH*. Die Expression dieser Gene in den Geweben der Wurzel wurde durch Daten aus veröffentlichten Transkriptomanalysen von *Arabidopsis thaliana* bestätigt (Birbaum *et al.*, 2003; Brady *et al.*, 2007). Die Expression der genannten Gene wurde experimentell durch gewebespezifische Expressionsstudien mittels RT-PCR an RNA-Extrakten des Wildtyps überprüft. Es konnte für alle hier genannten Gene eine Expression in Wurzelgeweben und teilweise Expression in den Geweben der Schote nachgewiesen werden. Die postulierte enzymatische Funktion der Genprodukte und die detektierte Expression in suberinisierten Geweben deuten an, dass die Genprodukte an der Biosynthese des Suberinpolymers, beziehungsweise des Samenschalenpolyesters beteiligt sein könnten. In weiterführenden Studien wurde dies anhand der Charakterisierung der Peroxidase *POX* (At1g68850) überprüft.

Ein zweiter Versuchsansatz fokussierte auf Mitglieder der CYP86-Familie und der CYP94-Familie der P450-Monooxygenasen. Für Mitglieder dieser Enzymfamilien konnte bereits gezeigt werden, dass sie ω -Hydroxylierung langkettiger Fettsäuren katalysieren (Pinot und Beisson, 2011). Des Weiteren konnte für die Genprodukte von *CYP86A1/HORST* (Höfer *et al.*, 2008) und *CYP86B1/RALPH* (Compagnon *et al.*, 2009) als auch *CYP94C1* (Kandel *et al.*, 2007) und *CYP86A8/LACERATA* (Wellesen *et al.*, 2001) eine Beteiligung an der Biosynthese von Fettsäure-basierten Biopolyestern, namentlich Suberin und Kutin nachgewiesen werden. Aufgrund von Sequenzhomologien zu den oben genannten Cytochrom-P450-Monooxygenasen wurden weitere verwandte Mitglieder dieser beiden Genfamilien auf ihre organspezifische Expression in *Arabidopsis thaliana* hin untersucht. Die Ergebnisse dieser organspezifischen Expressionsstudien sind in Abbildung 21 dargestellt. Das Expressionsmuster zeigte hier für *CYP94B2* ein Expressionsmaximum in der Wurzelspitze. Die Expression in der Wurzelspitze könnte als Hinweis auf eine Beteiligung an der Biosynthese von endodermal lokalisiertem Suberin gewertet werden. Für *CYP94D2* und *CYP94B1* konnte eine erhöhte Expression in basalen Teilen der Wurzel nachgewiesen werden. *CYP94D2* und *CYP94B1* zeigten weiterhin eine erhöhte Expression in oberirdischen Pflanzenorganen. Aufgrund der Expression in Blatt, Blüte und Stängel kann hier über eine Beteiligung an der Formierung der Kutikula dieser Pflanzenorgane spekuliert werden. Gleiches gilt für *CYP86C2*, welches ausschließlich im Stängel eine erhöhte Expression aufwies. Eine Expression in den Organen der Schote konnte für *CYP86A4*, *CYP94D2* und in abgeschwächter Form für *CYP86C2* und *CYP94B1* nachgewiesen werden. Dies könnte ein Hinweis auf eine Beteiligung an der Biosynthese des Samenschalenpolyesters oder der Kutikula der Schoten sein.

4.3 Die Bedeutung von CYP86B1/RALPH für die Suberinbiosynthese

Ein zentrales Enzym der Biosynthese von aliphatischem Wurzelsuberin in *Arabidopsis* ist die Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP86A1 (Höfer *et al.*, 2008), welche als ω -Hydroxylase von Fettsäuren der Kettenlänge C₁₆ und C₁₈ charakterisiert wurde. Die Produkte der ω -Hydroxylierung durch CYP86A1 finden Eingang in das Suberinpolymer der Wurzel. C₁₆ und C₁₈ ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren sind indikative Bestandteile des Wurzelsuberins von *Arabidopsis*. Mutantenlinien, in denen eine Ausbildung des funktionellen Proteins CYP86A1 unterbunden wird, zeigen starke biochemische Aberrationen im Aufbau des aliphatischen Wurzelsuberins. Die Gesamtmenge des Polymers ist signifikant reduziert, C₁₆ und C₁₈ ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren sind unterrepräsentiert. Aufgrund der zentralen Rolle des Genproduktes in der Suberinbiosynthese wurde das Enzym als HORST (Hydroxylase Of Root Suberized Tissue) annotiert. CYP86A1 ist ein Mitglied der CYP86 Genfamilie der Cytochrom-P450-Monooxygenasen. Für diverse Mitglieder dieser Genfamilie konnte *in vitro* als auch *in vivo* eine Fettsäure- ω -Hydroxylaseaktivität nachgewiesen werden (Rupasinghe *et al.*, 2007; Pinot und Beisson, 2011).

Bei der Suche nach weiteren, an der Biosynthese von Suberin beteiligten Genprodukten wurde aufgrund dieser enzymatischen Studien und aufgrund der nachgewiesenen Beteiligung von CYP86A1/HORST an der Suberinbiosynthese der Focus auf Mitglieder der CYP86-Familie der P450-Monooxygenasen gelegt. Expressionsanalysen aus Birnbaum *et al.* (2003) konnten zeigen, dass CYP86B1 die P450-Monooxygenase der CYP86-Familie mit der höchsten Expression in den Wurzelgeweben nach CYP86A1/HORST ist. Dies konnte unter Verwendung der GENEVESTIGATOR Datenbank (Zimmermann *et al.*, 2004) bestätigt werden. Hier konnte für CYP86B1 weiterhin eine Expression in den Geweben der Blüte, beziehungsweise der Schote nachgewiesen werden. Eine Analyse von Koregulationsmustern mittels ATTED-II (<http://atted.jp/>) (Obayashi *et al.*, 2007) lieferte Hinweise, dass CYP86A1/HORST und CYP86B1 einer gemeinsamen Regulation der Genexpression unterliegen. Die hier erhobenen *in silico*-Daten legten eine Beteiligung von CYP86B1 an der Suberinbiosynthese nahe.

Erste Studien an CYP86B1 waren Gegenstand einer vorangegangenen Arbeit und sind in Diehl (2008) zusammengefasst. Die ausführliche Charakterisierung des Gens CYP86B1 in *Arabidopsis thaliana* war Gegenstand einer Veröffentlichung (Compagnon *et al.*, 2009). Die Studien zur Charakterisierung von CYP86B1 wurden in der Abteilung Ökophysiologie der Pflanzen der Universität Bonn und im Institut de Biologie Moléculaire des Plantes an der CNRS-Universität Louis Pasteur Unité Propre de Recherche in Strasbourg, Frankreich durchgeführt.

Eine Bestätigung der organspezifischen Expression von *CYP86B1* in den Geweben der Wurzel konnte durch eine semiquantitative organspezifische RT-PCR bestätigt werden (Diehl, 2008). Phylogenetische Analysen der Verwandtschaftsverhältnisse von P450-Monooxygenasen der CYP86 Familie auf Proteinebene konnten zeigen, dass *CYP86B1* und *CYP86B2* über 45 % Sequenzhomologie zu *CYP86A1/HORST* aufweisen.

Eine gewebespezifische Lokalisierung des Genproduktes von *CYP86B1* in den Geweben der primären Wurzel konnte in Kapitel 3.3.1 nachgewiesen werden. Hier wurde, wie in Kapitel 2.7 beschrieben ein Fusionskonstrukt aus der nativen DNA von *CYP86B1* mit dem Reportergen *GFP* unter dem nativen Promotor $PROM_{CYP86B1}$ erstellt und in *Arabidopsis thaliana* eingebracht. Expression und Translation des Konstrukts führen zur Ausbildung eines Fusionsproteins, welches mittels Fluoreszenzmikroskopie in den Geweben der Pflanze lokalisiert werden konnte. Die Ergebnisse der mikroskopischen Lokalisation des Proteins *CYP86B1::GFP* sind in Abbildung 22 dargestellt. Die Lokalisation des Proteins *CYP86B1* beschränkte sich auf einen zentral gelegenen Bereich in den Geweben der primären Wurzel. Eine Lokalisation in den Geweben des Zentralzylinders konnte bei Betrachtung der korrespondierenden Hellfeldaufnahmen in Abbildung 22 ausgeschlossen werden. Form und Ausrichtung der Zellen, in denen Fluoreszenz detektiert wurde, deuten auf eine Expression in endodermalen Zellen hin. Das Fluoreszenzsignal war nicht gleichmäßig über die Zellen der Endodermis verteilt. Einige Zellen zeigten ein starkes Fluoreszenzsignal, während in benachbarten Endodermiszellen keine Fluoreszenz feststellbar war. Eine vergleichbare lückenhafte Verteilung des Translationsproduktes entlang der Zellen der Endodermis wurde in auch in Lokalisationsstudien für GPAT5, einer Glycerol-Acyltransferase mit Beteiligung an der Suberinbiosynthese, nachgewiesen (Beisson *et al.*, 2007).

Weitere gewebespezifische Expressionsstudien mittels Promotor-GUS-Fusionskonstrukten in Compagnon *et al.* (2009) konnten die Endodermis-spezifische Expression bestätigen. Durch Anfärbung lipophiler Substanzen mit Sudan IV konnte in dieser Publikation weiterhin gezeigt werden, dass die GUS-Aktivität mit den Lipid-haltigen Geweben der Endodermis kolokalisiert ist. Es konnte weiterhin GUS-Aktivität in der Hilumregion reifer Samen, in den Tapetumzellen der Antheren und in Abszissionszonen nachgewiesen werden. Abszissionszonen sind beispielsweise die Verbindungsgewebe der Schoten zum Blütenstiel und der Funiculus, welcher die Samen mit der Placenta der Schote verbindet. Abszission in Pflanzen geht einher mit der Ausbildung von Suberin-haltigen Wundperidermen die eine Versiegelung der Gewebe nach Abszission gewährleisten.

Neben der gewebespezifischen Expression von *CYP86B1* wurde in Compagnon *et al.*, (2009) die subzelluläre Lokalisation durch transiente Expression eines Fusionskonstrukts von *CYP86B1* mit dem Reporterprotein *YFP* (Yellow Fluorescent Protein, gelb-fluoreszierendes Protein) unter dem 35S-Promotor in Blättern von *Nicotiana benthamiana*

erfasst. Hier konnte gezeigt werden, dass das Protein CYP86B1-YFP mit dem endoplasmatischen Reticulum, analog zu *CYP86A1/HORST* assoziiert ist.

Zur Aufklärung der Beteiligung von *CYP86B1* an der ω -Hydroxylierung von Monocarbonsäuren in der Suberinbiosynthese wurden analytische Studien der Wurzelsuberinkomposition von *cyp86B1* Insertionsmutanten und RNA-Interferenzlinien durchgeführt. Die Analyse des Wurzelsuberins der *knockout* Mutante *cyp86B1-1* wurde bereits in Diehl (2008) vorgestellt.

Die Ergebnisse der Analyse des Wurzelsuberins der Insertionsmutante *cyp86B1-2* sowie der RNAi-Linien *cyp86B1-3* und *cyp86B1-4* sind in Abbildung 23 grafisch dargestellt. Die absoluten Mengen der Monomere als auch deren relative Verteilung liegen im Rahmen der Literaturwerte und sind mit diesen vergleichbar (Franke *et al.*, 2005; Höfer *et al.*, 2008).

Die Betrachtung der Monomerzusammensetzung enthüllte signifikante Unterschiede im Aufbau des aliphatischen Wurzelsuberins. In der Linie *cyp86B1-2* war eine signifikante Akkumulation der C₂₂-Monocarbonsäure nachweisbar. In den Linien *cyp86B1-3* und *cyp86B1-4* war eine Tendenz zu einer Akkumulation der C₂₂ Säure zu erkennen. Bei Betrachtung der bifunktionalen ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren konnte gezeigt werden, dass C₂₂ und C₂₄ Monomere dieser Stoffklassen in der Linie *cyp86B1-2* hochsignifikant reduziert waren. Sie konnten im umgeesterten Polymer-Extrakt teilweise kaum nachgewiesen werden. In den Linien *cyp86B1-3* und *cyp86B1-4* lag die Menge an C₂₂ und C₂₄ ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren zwischen den detektierten Mengen des Wildtyps und der Insertionsmutante *cyp86B1-2*. Die Ergebnisse der Suberinanalyse der RNAi-Linien deuten einen direkten Zusammenhang zwischen der Expressionsrate des Genproduktes von *CYP86B1* und der Menge an C₂₂ und C₂₄ ω -Hydroxysäuren, C₂₂ und C₂₄ α,ω -Disäuren und C₂₂ Monocarbonsäure im Suberinpolymer an. Ein Vergleich der Suberin-Zusammensetzung der *cyp86B1*-Linien mit dem Suberin der *cyp86A1/horst* Linien lässt einen biochemischen Zusammenhang zwischen diesen beiden nah verwandten Enzymen erkennen. Wie einleitend erwähnt, wurde *CYP86A1/HORST* charakterisiert als eine an der Suberinbiosynthese beteiligte ω -Hydroxylase von C₁₆ und C₁₈ Fettsäuren (Höfer *et al.* 2008). Im Falle von *CYP86B1* legt die Analyse des Wurzelsuberins von Insertions- und RNAi-Linien den Schluss nahe, dass *CYP86B1* ebenfalls ω -Hydroxylierung von langkettigen Fettsäuren katalysiert. Da eine Beeinflussung der Genexpression von *CYP86B1* ausschließlich Auswirkungen auf Moleküle der Kettenlänge $>C_{20}$ hat, kann angenommen werden, dass *CYP86B1* eine hohe Substratspezifität für C₂₂ und C₂₄ Vorstufen von ω -Hydroxysäuren hat.

Die Akkumulation von C₂₂ Monocarbonsäuren in den Mutantenlinien deutet an, dass Monocarbonsäuren identischer Kettenlänge die Substrate für eine ω -Hydroxylierung darstellen. Ein anderes mögliches Szenario in Bezug auf Kettenverlängerung und Funktionalisierung von Fettsäuren wäre, dass zunächst eine Hydroxylierung von

Monocarbonsäuren geringerer Kettenlänge stattfindet, und diese ω -Hydroxysäuren dann zu den finalen längerkettigen ω -Hydroxysäuren elongiert werden (Nosbüsch, 2009).

Aufgrund ihrer Beteiligung an der Suberinbiosynthese wurde CYP86B1 annotiert als RALPH (Root Aliphatic Polyester Hydroxylase). CYP86B1/RALPH stellt bisher die einzige *in vivo*-charakterisierte Fettsäure-Hydroxylase dar, die VLCFAs (Very Long Chain Fatty Acids) mit einer Kettenlänge $>C_{20}$ prozessiert.

Ungeklärt bleibt der enzymatische Mechanismus der Generierung von α,ω -Disäuren aus ω -Hydroxysäuren. Auch hier sind zwei Szenarien möglich. Zum einen kann das Enzym als bifunktionale Oxidase arbeiten und nach erfolgter ω -Hydroxylierung die weitere Oxidierung von ω -Hydroxysäuren zu α,ω -Disäuren katalysieren. Diese Funktionsweise konnte bereits für CYP94A5 und CYP94C1 nachgewiesen werden (Le Bouquin *et al.*, 2001; Kandel *et al.*, 2007). Eine weitere Möglichkeit wäre ein nachgeschaltetes Enzym, welches die entsprechende ω -Hydroxysäure als Substrat für die weitere Oxidation zu Disäure verwendet. Das würde im Falle der vorliegenden Analyse bedeuten, dass die Reduktion von α,ω -Disäuren im Polyester bedingt ist durch den Mangel an ω -hydroxylierten Intermediaten.

ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren stellen bifunktionale Säuren dar. In den Modellvorstellungen der Suberinbiosynthese kommt diesen Monomeren eine besondere Rolle im Aufbau des Suberins zu, da sie aufgrund ihrer zwei funktionellen Gruppen zur Quervernetzung des Polyesters beitragen (Graça und Pereira, 2000b; Kolattukudy, 2001; Graça und Santos, 2006, 2007; Ranathunge *et al.*, 2011). Die Frage, ob die Aberrationen im Suberinpolymer der Wurzel in den *cyp86B1/ralph* Linien die Barrierefunktion des Suberins in Bezug auf Wasser- und Nährstoffhaushalt und Stresstoleranz beeinflussen, soll in Kapitel 4.2 diskutiert werden.

4.4 Die Bedeutung von CYP86B1/RALPH für die Biosynthese des Samenschalenpolyesters

Der Samenschale kommt eine essentielle Funktion im Lebenszyklus der höheren Pflanzen zu. Sie schützt das embryonale Gewebe gegen mechanische und chemische Einflüsse, stellt eine Barriere gegen Gas- und Wasserverlust dar und ist ein entscheidender Faktor in der Aufrechterhaltung der Samendormanz. Die Gewebe der Samenschale sind zur Ausbildung einer Kutikula befähigt. (Boesewinkel und Bouman, 1995; Debeaujon *et al.*, 2000; Finch-Savage und Leubner-Metzger, 2006). Neben der Ausbildung einer Kutikula können in den Geweben der Samenschale Suberin-verwandte Depositionen nachgewiesen werden. Histochemische Färbeverfahren und Promotor-Reporterstudien konnten zeigen, dass die Chalaza-Region der Samenschale, die bei der Keimung von der Radicula durchbrochen wird, Suberinablagerungen aufweist (Beisson *et al.*, 2007; Franke *et al.*, 2009). Neuere Promotor-Reporterstudien mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie an sich entwickelnden Samen konnten zeigen, dass es in den Geweben des äußeren Integuments der Samenschale ebenfalls Hinweise auf Suberinisierungs-Prozesse gibt (Abbildung 2) (Molina *et al.*, 2009).

Erste analytische Studien an Extrakten des umgeesterten Samenschalenpolymers von *Arabidopsis* Samen zeigten, dass der Samenschalenpolyester ein dem Suberin nah verwandtes, beziehungsweise von Suberin abgeleitetes Polymer ist, welches sich aus einem vergleichbaren Spektrum an Monomeren zusammensetzt (Molina *et al.*, 2006; Molina *et al.*, 2008). Hauptbestandteile des Polyesters der Samenschale von *Arabidopsis* sind, Analog zum Suberin der Wurzel, ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren. Ferulasäurespezies, Monocarbonsäuren und primäre Alkohole sind in geringeren Mengen am Samenschalenpolyester beteiligt. Neben diesen Suberin-spezifischen Stoffklassen konnten in Molina *et al.* (2006) weiterhin poly-Hydroxycarbonsäuren und langkettige Diole identifiziert werden. Studien an nahe verwandten *Brassica napus* Samen deuten darauf hin, dass ein großer Anteil dieser mehrfach hydroxylierten Fettsäuren aus den Geweben des Embryos stammt (Molina *et al.*, 2006). Ob die detektierten Diole einen echten Bestandteil des Samenschalenpolyesters darstellen oder ebenfalls dem Gewebe des Embryos zuzuordnen sind, konnte hier nicht geklärt werden. Die Kettenlängenverteilung der Monomere des Samenschalenpolyesters in *Arabidopsis* unterscheidet sich von der des Wurzelsuberins. In den Klassen der Monocarbonsäuren, der ω -Hydroxysäuren und der α,ω -Disäuren ist eine Dominanz der langkettigen Monomere zu erkennen. C_{22} und C_{24} Spezies dieser Stoffklassen dominieren das Polymer. Die C_{24} ω -Hydroxysäure und C_{24} α,ω -Disäure stellen die aliphatischen Hauptkomponenten des nativen Samenschalenpolyesters in *Arabidopsis* dar. Die hier durchgeführte Analyse des Samenschalenpolyesters des *Arabidopsis* Wildtyps konnte diese Literaturwerte weitestgehend bestätigen. Aus der Samenschale des Wildtyps

konnten insgesamt $2,18 \pm 0,87 \mu\text{g}/\text{mg}$ Monomere des Samenschalenpolyesters identifiziert und quantifiziert werden. 36 % dieser Monomere waren ω -Hydroxysäuren mit der C_{24} ω -Hydroxysäure als Hauptbestandteil (21 %). α,ω -Disäuren waren mit 34 % am Gesamtpolymer beteiligt und stellen mit der C_{24} α,ω -Disäure (26 %) die zweite Hauptkomponente des Polyesters. Primäre Alkohole waren mit 16 %, Monocarbonsäuren mit 14 % am Aufbau des Polymers beteiligt. Unterschiede im Vergleich zu den Literaturwerten sind hier wahrscheinlich bedingt durch unterschiedliche Umesterungs- und Extraktionsmethoden. In Molina et al. (2006) erfolgte die Umesterung Natriummethanolat-katalysiert, die Extraktion erfolgte mit Dichlormethan. Aufgrund der hier erfolgten Umeesterung mit methanolischer HCl und der nachfolgenden Extraktion mit Hexan konnten in der vorliegenden Analyse des Samenschalenpolyesters keine aromatischen Verbindungen isoliert werden. Auch langkettige Diole und poly-Hydroxysäuren wurden in der hier durchgeführten Analyse nicht identifiziert.

Bei einem Vergleich der Gesamtmenge des Samenschalenpolyesters zwischen Wildtyp und *cyp86B1/ralph knockout*-, beziehungsweise RNAi Linien konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Bei Betrachtung der relativen Verteilung der Stoffklassen hingegen wurden signifikante Unterschiede detektiert. In den Insertionsmutantenlinien *ralph-1* und *ralph-2* war der relative Anteil an ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren gegenüber dem Wildtyp hochsignifikant reduziert, während Monocarbonsäuren in *ralph-1* und *ralph-2* akkumulierten. Monocarbonsäuren stellen in beiden *knockout* Linien die Hauptstoffklasse des Polyesters dar. In den RNA-Interferenzlinien *ralph-3* und *ralph-4* konnte in Bezug auf diese Stoffklassen die intermediäre Situation zwischen Wildtyp und *knockout* Mutante beobachtet werden. Die Änderungen in der Polyesterkomposition wurden verursacht durch eine hochsignifikante Reduktion von C_{22} und C_{24} ω -Hydroxysäuren sowie α,ω -Disäuren, vergleichbar zum veränderten Suberinaufbau in der Wurzel der *cyp86B1/ralph knockout* Linien. C_{24} ω -Hydroxysäure und α,ω -Disäure, im Polyester des Wildtyps als Hauptkomponenten vorliegend, trugen hier nur noch zu 1-2 % zum Gesamtpolyester bei. Gleichzeitig konnte, analog zum Wurzelsuberinaufbau hier ebenfalls eine Akkumulation der korrespondierenden Monocarbonsäuren festgestellt werden. Im Vergleich zum Wildtyp ist in *ralph-1* und *ralph-2* die absolute Menge an C_{22} Monocarbonsäure um etwa 400 %, die absolute Menge an C_{24} Monocarbonsäure um 650 – 800 % erhöht.

Anhand der hier diskutierten Ergebnisse erschließt sich, dass das Enzym CYP86B1/RALPH auch in den Geweben der Samenschale als ω -Hydroxylase von Monocarbonsäuren fungiert, deren Produkte in den Samenschalenpolyester inkorporiert werden. Allerdings fallen die Effekte des Gen *knockouts* im Polyester der Samenschale dramatischer aus als im Suberin der Wurzel, da hier die C_{22} und C_{24} Monomere der bifunktionalen Säuren die Hauptkomponenten des Samenschalenpolyesters darstellen.

4.5 Charakterisierung der *pox* Mutante

Die Expression des putativen Peroxidase-Gens At1g68850, hier *POX* genannt ist nach den Ergebnissen der *in silico*-Analyse der Koexpression mittels ATTED-II hochgradig koreguliert mit *CYP86B1/RALPH*. Die Ergebnisse der Datenbankanalyse deuten an, dass die Genprodukte von *CYP86B1/RALPH* und *POX* an einem gemeinsamen Biosyntheseweg beteiligt sind.

Modelhafte Vorstellungen des Suberinaufbaus nach Bernards (2002) gehen von einer aromatischen Domäne aus, die mit der Zellwand verbunden ist und einer aliphatischen Domäne, die wiederum mit der aromatischen Domäne verbunden ist (Abbildung 3 B). Mehrere experimentelle Ansätze zur Erforschung von Suberinisierungsvorgängen, beispielsweise in Tomate (*Solanum lycopersicum*) (Quiroga *et al.*, 2000), in Wundperidermen von Kartoffelknollen (*Solanum tuberosum*) (Bernards *et al.*, 1999), oder in *in vitro*-Ansätzen mit Peroxidasen aus der Kartoffel (Arrieta-Baez und Stark, 2006), lieferten Hinweise auf eine mögliche Funktion von anionischen und kationischen Peroxidasen in der Polymerisierung der aromatischen Suberindomäne. In der aromatischen Domäne des Suberins konnten Hydroxycimtsäuren und deren Derivate nachgewiesen werden. Die Quervernetzung wird hier durch einen Peroxidase/H₂O₂-vermittelten radikalischen Prozess, analog zur Ligninpolymerisierung, eingeleitet (Kolattukudy, 1980). Die hier genannten Faktoren deuten auf eine Beteiligung von *POX* an der Biosynthese von aromatischem Suberin hin.

Eine qualitative und quantitative Analyse der Wurzelsuberin-Zusammensetzung der T-DNA-Insertionsmutante *pox* konnte zeigen, dass ein Ausschalten des Gens *POX* den Aufbau des Suberinpolymers beeinflusst (Abbildung 29). Im Falle der langkettigen Monocarbonsäuren (C₂₂-C₂₄), der primären Alkohole mit Kettenlängen C₁₈ und C₂₀ und der gesättigten und mehrfach ungesättigten C₁₈ ω-Hydroxysäuren, sowie der C₂₄ ω-Hydroxysäure konnten geringfügige, aber signifikante Unterschiede zwischen dem Suberin der *knockout* Mutante *pox* und dem des Wildtyps festgestellt werden. Unterschiede mit >99 % Signifikanz konnten jedoch ausschließlich in der Stoffklasse der aromatischen Verbindungen detektiert werden. Interessanterweise konnte hier beobachtet werden, dass ein *knockout* von *POX* eine Akkumulation der beiden detektierten Ferulasäurespezies zur Folge hatte. Bei einer direkten Beteiligung des Genproduktes von *POX* an der Biosynthese des Wurzelsuberins wäre dies so nicht zu erwarten. Hier würde man bei einem Gen *knockout* eine Reduktion der entsprechenden aromatischen Bestandteile erwarten.

Bei der Analyse des Samenschalenpolyesters der *knockout* Mutante *pox* konnten weitaus gravierendere Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 30). Die Akkumulation von Ferulasäurespezies war auch im Samenschalenpolyester der *pox* Mutante deutlich und hochsignifikant ausgeprägt. Damit einhergehend konnte gezeigt werden, dass fast alle

detektierten ω -Hydroxysäuren signifikant bis hochsignifikant akkumulieren. Dieser Effekt war am deutlichsten ausgeprägt bei der C_{16} ω -Hydroxysäure. Ihre Gesamtmenge war im Polyester der *pox* Mutante gegenüber dem Wildtyp annähernd um den Faktor 4 erhöht. In den Stoffklassen der Monocarbonsäuren und der primären Alkohole wurden geringfügigere Unterschiede festgestellt.

Bei der Deutung dieser Ergebnisse muss beachtet werden, dass mit den hier vorliegenden Analysemethoden und nach der Modellvorstellung des Suberinaufbaus aus aliphatischen und aromatischen Domänen keine Bestandteile des mit der Zellwand verbundenen aromatischen Suberins detektiert werden können. Der Analyse der Suberinmonomere ging eine BF_3 -katalysierte Umesterungsreaktion voraus. Die Reaktionsbedingungen dieser Umesterung sind nicht geeignet zur Freisetzung von radikalisch polymerisierten, kovalent verknüpften Bestandteilen der aromatischen, zellwandassoziierten Domäne des Suberins. Ausschließlich veresterte aromatische Bestandteile werden durch die BF_3 -katalysierte Umesterung freigesetzt. Die Akkumulation von veresterten Ferulasäuren im aliphatischen Suberinpolymer kann jedoch auch anders erklärt werden. Voraussetzung hierfür ist, dass zu einem bestimmten Zeitpunkt eine begrenzte Menge an Zimtsäurederivaten im Apoplasten von suberinisierten, beziehungsweise lignifizierten Zellen vorliegt. Dieser Pool an Hydroxymzimsäurederivaten bietet seine Monomere für die radikalische Polymerisierung sowohl von Lignin- als auch von aromatischen Suberinbausteinen an. Weiterhin könnten die Monomere dieses Pools auch für die Veresterung von aromatischen Komponenten mit den Monomeren des aliphatischen Suberins genutzt werden. Die Konsequenz dieser Annahme wäre, dass *POX* möglicherweise an der radikalischen Polymerisierung von Ligninbausteinen oder aromatischen Suberinbausteinen beteiligt ist. Ein Ausschalten des Gens *POX* hätte somit zur Folge, dass die Monomere dieses Pools an Hydroxymzimsäurederivaten nicht mehr in den durch *POX* vermittelten Polymerisierungsprozess eingehen und somit im Überschuss im Apoplasten von in der Suberinbiosynthese befindlichen Zellen vorliegen. Dieser Überschuss an Monomeren, hier Ferulasäuren, könnte somit alternativ in das veresterte Suberinpolymer eingebracht werden.

Die Ergebnisse der Samenschalenanalyse deuten an, dass eine Veresterung von Ferulasäuren mit aliphatischen Bestandteilen des Suberins hauptsächlich über die C_{16} ω -Hydroxysäure stattfindet. Eine hochsignifikante und stark ausgeprägte Akkumulation von Ferulasäuren hat hier eine ebenfalls hochsignifikante und ausgeprägte Akkumulation von C_{16} ω -Hydroxysäuren zur Folge. Die Akkumulation dieser Substanzen liegt mit $0,59 \mu\text{g}/\text{mg}$ und $0,52 \mu\text{g}/\text{mg}$ in einer vergleichbaren Größenordnung. Da auch andere ω -Hydroxysäuren signifikante Akkumulationen im Samenschalenpolyester der *pox* Mutante aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass auch diese vermehrt mit Ferulasäuren verestert werden.

In Bezug auf die Enzymatik der Suberinbiosynthese kann hier festgehalten werden, dass ein vermehrtes Vorhandensein von Ferulasäuren im Apoplasten eine erhöhte Biosynthese von ω -Hydroxysäuren, speziell der C_{16} ω -Hydroxysäure induziert. Enzymatische Rückkopplungsmechanismen scheinen hier die Menge an ω -Hydroxysäuren der Menge an Ferulasäuren anzupassen. Diese These könnte überprüft werden durch Genexpressionsstudien der ω -Hydroxylase *CYP86A1/HORST* in der *pox* Mutante und im korrespondierenden Wildtyp. Wie bereits erwähnt, konnte für *HORST* eine ω -Hydroxylase-Aktivität für C_{16} und C_{18} Monocarbonsäuren nachgewiesen werden (Höfer et al. 2008)

Semiquantitative Permeabilitätsstudien von Samenschalen mittels 2,3,5-Triphenyltetrazolium konnten zeigen, dass die veränderte Zusammensetzung des Samenschalenpolyesters der *pox* Mutante physiologische Auswirkungen auf die Durchlässigkeit der Samenschale hat (Abbildung 49 C und F). Im Vergleich zu den Samen des Wildtyps (Abbildung 49 A und C) wiesen die Samen der *pox* Mutante nach 24 h Inkubation in 1 % Tetrazolium eine deutlich geringere Rotfärbung auf. In vorangegangenen In Permeabilitätsstudien der Samenschale von *Arabidopsis* Mutanten konnte bereits gezeigt werden, dass Aberrationen im Aufbau des Polyesters einen Einfluss auf die Durchlässigkeit von Samenschalen gegenüber Triphenyltetrazolium haben können (Beisson et al. 2007). Die verringerte Durchlässigkeit der Samenschale in Bezug auf das Tracermolekül könnte hier zum Einen begründet sein in der erhöhten Gesamtmenge des Polyesters und zum Anderen im erhöhten Anteil an aliphatischen Bestandteilen des Polymers. Möglicherweise ist der Samenschalenpolyester dadurch engmaschiger aufgebaut und bietet der Penetration durch Tetrazolium somit einen erhöhten Widerstand.

4.6 Charakterisierung der Doppelmutante *ralph/pox*

Datenbankanalysen der Expressionsmuster der Gene *CYP86B1/RALPH* und *POX* (At1g68850) mittels des eFP-Browsers (Winter et al. 2007) konnten zeigen, dass die Expression beider Gene sowohl gewebespezifisch als auch entwicklungspezifisch hochgradig übereinstimmen. Beide Gene sind laut ATTED-II hochgradig koreguliert. In Analysen des Wurzelsuberins und des Samenschalenpolyesters konnte gezeigt werden, dass die Mutanten *cyp86B1/ralph* und *pox* in der Biosynthese dieser Polymere beeinträchtigt sind. Zur Aufklärung der Fragestellung, ob die Effekte der Mutationen in den beiden Genen kumulativ sind wurde auch hier eine Generierung von Doppelmutanten durchgeführt.

Die qualitative und quantitative Analyse des Samenschalenpolyesters der Doppelmutante *ralph/pox* konnte diese Annahme bestätigen. Im Polyester der Doppelmutante konnte ein erhöhter Anteil an aromatischen Verbindungen nachgewiesen werden. Die Gesamtmenge an *trans*-Ferulasäure ist hier annähernd verdoppelt im Vergleich zum Wildtyp. Damit einhergehend wurde eine signifikante Akkumulation der C₁₆ ω-Hydroxysäure nachgewiesen. Die genannten Veränderungen entsprechen den Aberrationen des Samenschalenpolyesters der Knockoutlinie *pox* und können somit auf den Gendefekt in *POX* zurückgeführt werden. Die Insertionsmutantenlinien *cyp86B1-1/ralph-1* und *cyp86B1-2/ralph-2* zeigten in ihrer Samenschalenkomposition einen signifikant reduzierten Anteil an ω-Hydroxysäuren und α,ω-Disäuren der Kettenlängen C₂₂ und C₂₄ sowie eine hochsignifikante Akkumulation der korrespondierenden C₂₂ und C₂₄ Monocarbonsäuren (Abbildung 25). Dieser *cyp86B1/ralph*-spezifische biochemische Phänotyp konnte ebenfalls in der Doppelmutante *ralph/pox* nachgewiesen werden. C₂₂ und C₂₄ ω-Hydroxysäuren und α,ω-Disäuren zeigten signifikante Reduktionen. Die C₂₄ ω-Hydroxysäure, Hauptkomponente des Samenschalenpolyesters, war auf etwa 10 % ihrer Menge im Wildtyp reduziert. Damit einhergehend konnte im Samenschalenpolyester der Doppelmutante ebenfalls eine hochsignifikante Akkumulation der C₂₄ Monocarbonsäure etwa um den Faktor 7 nachgewiesen werden.

Neben den bisher beschriebenen Änderungen in der Polyesterkomposition konnte weiterhin eine tendenzielle Akkumulation der mehrfach hydroxylierten C₁₆ 10,16-Dihydroxysäure nachgewiesen werden. Dieser Effekt konnte anhand der bisherigen Analysen keinem der beiden hier vereinten Genotypen zugewiesen werden.

Zur Darstellung von physiologischen Konsequenzen auf die Durchlässigkeit der Samenschale wurde auch für Samen der Linie *ralph/pox* ein Permeations-Versuch mit Triphenyltetrazolium durchgeführt. Bei kurzfristiger Inkubation in der Färbelösung konnte kein Unterschied zu Samen des Wildtyps festgestellt werden (Abbildung 48). Nach einer Inkubation für 24 h in 1 % Triphenyltetrazolium zeigte die Mehrzahl der Samen der *ralph/pox* Doppelmutante eine intensivere Rotfärbung als die Samen des Wildtyps (Abbildung 49 G und J). Die Samen der Doppelmutante sind somit bei langfristiger Inkubation durchlässiger

für Triphenyltetrazolium. Dieses Ergebnis war so nicht zu erwarten gewesen. Bei Betrachtung der Ergebnisse des Tetrazolium-Tests für die Mutante *cyp86B1-1/ralph-1* konnten keine Unterschiede zum Wildtyp nachgewiesen werden (Abbildung 49 B und E) (Compagnon et al. 2009). Für die Samenschale der Peroxidase-Mutante *pox* konnte gezeigt werden, dass selbst nach 24 h Inkubation in Triphenyltetrazolium-Lösung eine sehr geringfügige Permeation des Tracermoleküls stattfindet (Abbildung 49 C und F). Intakte Samen zeigten keine Rotfärbung. Für die Doppelmutante *ralph/pox* wäre hier ein der *knockout* Mutante *cyp86B1/ralph* oder ein der *knockout* Mutante *pox* entsprechendes Ergebnis zu erwarten gewesen. Möglicherweise sind die durch die multiplen Mutationen herbeigegeführten Veränderungen in der Zusammensetzung des Samenschalenpolyesters zu gravierend um ein funktionelles Polymer aufzubauen, welches langfristig der Penetration durch Triphenyltetrazolium Widerstand leistet.

4.7 Charakterisierung der Doppelmutante *kcs17/ralph*

KCS17 (At4g34510) codiert für eine β -Ketoacyl-CoA-Synthase in *Arabidopsis*. β -Ketoacyl-CoA-Synthasen sind enzymatische Bestandteile eines membrangebundenen Enzymkomplexes, dem Fettsäure-Elongationskomplex. Der FAE-Komplex (FAE = Fatty Acid Elongation-Complex) besteht aus vier enzymatischen Untereinheiten und katalysiert die Kondensation von Malonyl-CoA an eine aktivierte Fettsäure zur Ausbildung von langkettigen Fettsäuren. Das regulierende Enzym des Multienzymkomplexes ist eine β -Ketoacyl-CoA-Synthase, welche den eigentlichen Kondensationsschritt katalysiert (Millar und Kunst, 1997). Im Genom von *Arabidopsis* konnten aufgrund von Sequenzhomologie-Vergleichen 21 *KCS*-Gene identifiziert werden (Kunst und Samuels, 2003; Briesen, 2008). Diversen *KCS* konnte eine Funktion in der Biosynthese des Suberins, des Kutins und der kutikulären Wachse zugewiesen werden (James Jr et al., 1995; Millar und Kunst, 1997; Todd et al., 1999; Yephremov et al., 1999; Franke et al., 2009).

Die Charakterisierung der β -Ketoacyl-CoA-Synthase *KCS17* erfolgte in der Arbeitsgruppe Ökophysiologie der Pflanzen der Universität Bonn. Es konnte hier gezeigt werden, dass *KCS17* an der Biosynthese des Samenschalenpolyesters beteiligt ist (Nosbüsch, 2009). Korrespondierende *kcs17 knockout* Mutanten zeigten einen veränderten Aufbau des Samenschalenpolyesters. In der Mutante akkumulierten C_{22} ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren während C_{24} ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren in verringerter Menge im Polyester nachweisbar waren. Für die C_{24} Monocarbonsäure konnte eine geringfügige Reduktion im Polyester von *kcs17* nachgewiesen werden. Die durchgeführten Analysen legen den Schluss nahe, dass *KCS17* die Elongation von C_{22} zu C_{24} Molekülspezies katalysiert. Die Ergebnisse deuten weiterhin an, dass hier eine Elongation von funktionalisierten Fettsäuren, namentlich ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren stattfindet. In

vorangegangenen Studien an β -Ketoacyl-CoA-Synthasen konnte ausschließlich eine Elongation von Monocarbonsäuren mit anschließender Funktionalisierung nachgewiesen werden. CYP86B1/RALPH konnte als ω -Hydroxylase von C₂₂ und C₂₄ Fettsäuren mit Beteiligung an der Biosynthese des Wurzelsuberins und des Samenschalenpolyesters charakterisiert werden (Diehl, 2008; Compagnon *et al.*, 2009). Die Ergebnisse der Polyesteranalyse in *cyp86B1/ralph* sprechen dafür, dass hier eine Elongation von Monocarbonsäuren zu den Kettenlängen C₂₂ und C₂₄ vor der Funktionalisierung durch CYP86B1/RALPH stattfindet.

Die Analyseergebnisse des Samenschalenpolyesters der Mutanten *cyp86B1/ralph* und *kcs17* legen den Schluss nahe, dass es zwei alternative Synthesewege gibt um hier das Endprodukt zu erhalten. Zum einen kann die Biosynthese von C₂₄ ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren aus den korrespondierenden Monocarbonsäuren durch CYP86B1/RALPH-katalysierte ω -Hydroxylierung, beziehungsweise -Carboxylierung erfolgen. Zum anderen können C₂₄ ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren aus der KCS17-katalysierten Elongation der C₂₂ ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren entstehen. Dieses Prinzip der Redundanz von Synthesewegen ist in der belebten Natur häufig vorzufinden.

Da die beiden Enzyme KCS17 und CYP86B1/RALPH zumindest teilweise eine überlappende Substratspezifität aufweisen, sollte durch Generierung der Doppelmutante *kcs17/ralph* und der Analyse ihres Samenschalenpolyesters aufgeklärt werden, ob die Vereinigung der beiden Mutationen einen additiven Effekt auf die Komposition des Polymers hat.

In den hier durchgeführten Analysen konnte jedoch kein zusätzlicher Effekt festgestellt werden. Die Komposition des Samenschalenpolyesters der Doppelmutante zeigte eine hochsignifikante Reduktion von C₂₂ und C₂₄ ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren bei einer gleichzeitigen hochsignifikanten Akkumulation der korrespondierenden Säuren (Abbildung 37, Abbildung 38). C₂₂ und C₂₄ ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren waren im Polyester der Doppelmutante weiterhin nachweisbar. Die Komposition des Polymers der Doppelmutante ist somit identisch mit dem der Knockout Mutante *cyp86B1/ralph* (Abbildung 25).

4.1 Charakterisierung der *ralph/horst* Doppelmutante

In den letzten Jahren konnten diverse Suberin-assoziierte Gene identifiziert und anhand der Analyse des Suberins korrespondierender *knockout* Mutanten charakterisiert werden. Mit der Generierung der Doppelmutante *ralph/horst* kann hier die erste Pflanzenlinie vorgestellt werden, die durch ein vollständig verändertes aliphatisches Suberinpolymer charakterisiert ist. Für sich genommen sind die beiden beteiligten Mutantenlinien *cyp86B1/ralph* und *cyp86A1/horst* in Bezug auf ihre Suberinkomposition bereits charakterisiert als ω -Hydroxylasen von Fettsäuren mit Beteiligung an der Biosynthese von Suberin, beziehungsweise Fettsäurepolyestern (Diehl, 2008; Höfer, 2008; Höfer *et al.*, 2008; Compagnon *et al.*, 2009). Während CYP86A1/HORST bevorzugt Fettsäuren der Kettenlänge C₁₆ und C₁₈ hydroxyliert, prozessiert CYP86B1/RALPH bevorzugt Monomere der Kettenlängen >C₂₀.

Zum besseren Verständnis der Zusammenhänge wurden bei der Analyse des Wurzelsuberins der Doppelmutante *ralph/horst* auch die korrespondierenden Mutantenlinien *cyp86B1-1/ralph-1* und *cyp86A1-1/horst-1* aufbereitet und analysiert.

In dieser Analyse konnte der *ralph*-spezifische biochemische Phänotyp mit nahezu absoluter Reduktion von ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren der Kettenlänge >C₂₀ und einer Akkumulation der C₂₂ Monocarbonsäure bestätigt werden (Compagnon *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu den Literaturdaten konnte in der hier durchgeführten Analysen ein erhöhter Anteil von Monocarbonsäuren am Gesamtpolymer sowohl im Wildtyp als auch in allen hier untersuchten Mutantenlinien detektiert werden. Die Linie *cyp86A1-1/horst-1* zeigte in der hier durchgeführten Analyse des Wurzelsuberins eine hochsignifikante Reduktionen von ω -oxygenierten Säuren der Kettenlänge C₁₆ und C₁₈. Dies entsprach dem *horst*-spezifischen biochemischen Phänotyp aus Höfer *et al.*, (2008). Verglichen mit den Literaturdaten zeigte sich für *cyp86A1-1/horst-1* in dieser Analyse ebenfalls ein erhöhter Gehalt an Monocarbonsäuren. In beiden Fällen könnten die Unterschiede in der Suberin-Zusammensetzung zwischen den veröffentlichten Daten und den hier erhobenen Daten begründet sein durch Variationen in den Anzuchtsbedingungen und analytischen Aufbereitungstechniken, beispielsweise der jeweiligen Umesterungs- und Extraktionsmethode, als auch durch jahreszeitliche Variationen.

Die Analyse der Suberinkomposition in der Wurzel der Doppelmutante *ralph/horst* konnte zeigen, dass das Polymer dramatische Veränderungen sowohl in der Gesamtmenge als auch in der Zusammensetzung aufweist. Es konnte eine hochsignifikante Reduktion aller ω -oxygenierten Bestandteile des Polymers nachgewiesen werden. Die detektierte Reduktion betraf ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren aller detektierten Kettenlängen (C₁₆ - C₂₄). Dieser Effekt ist eindeutig zurückzuführen auf die Vereinigung der Mutationen in den Genen CYP86B1/RALPH und CYP86A1/HORST in einer Pflanzenlinie.

Die Tatsache, dass trotz der beiden Mutationen noch verringerte Mengen an ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren im Polymer nachweisbar sind deutet an, dass mindestens eine weitere P450-Monooxygenase, redundant zu *CYP86A1/HORST* und *CYP86B1/RALPH*, an der Formierung von bifunktionalen Säuren in der Biosynthese aliphatischer Suberinmonomere beteiligt ist.

Wie bereits erwähnt, sind bifunktionale Monomere essenziell am dreidimensionalen Aufbau des Suberins beteiligt. Primäre Alkohole und Monocarbonsäuren können keine zentrale Rolle in der Quervernetzung des Suberinpolyesters innehaben, da sie im Suberin des Wildtyps zum Einen in geringen Mengen vorkommen und zum Anderen nur eine funktionelle Gruppe bereitstellen. Eine Vernetzung kann somit nicht stattfinden. Auf Basis der chemischen Voraussetzungen kann die Quervernetzung nur durch ω -oxygenierte Fettsäuren und das ebenfalls im Suberin nachweisbare Glycerin gewährleistet werden. Studien der Veresterungsmuster an partiell depolymerisiertem Suberin des Korks der Korkeiche (*Quercus suber*) konnten dies bestätigen.

Hier konnten $C_{18:1}$ ω -Hydroxysäure + $C_{18:1}$ ω -Hydroxysäure sowie $C_{18:1}$ α,ω -Disäure + Glycerin als zentrale Bindemotive identifiziert werden. Die Veresterung von $C_{18:1}$ ω -Hydroxysäuren untereinander erlaubt die Formierung von linearen Ketten, während die Veresterung der α,ω -Disäuren mit Glycerin den Aufbau eines dreidimensionalen Polymers ermöglicht (Graça und Santos, 2006, 2007).

Die Reduktion der gesättigten und ungesättigten ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren betrifft auch die charakteristischen Hauptmonomere des aliphatischen Suberins in *Arabidopsis*, namentlich die $C_{18:1}$ ω -Hydroxysäure und die $C_{18:1}$ α,ω -Disäure. Diese Reduktion der Hauptbestandteile und Hauptstoffklassen des Suberins hat zur Folge, dass die Menge an Monocarbonsäuren im Polymer die Menge an ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren übertrifft (Abbildung 41, Abbildung 42). Monocarbonsäuren sind die Hauptstoffklasse des aliphatischen Suberins der *ralph/horst* Doppelmutante, die C_{22} Monocarbonsäure dominiert das Polymer als Hauptkomponente. Auch im Suberin der *cyp86B1-1/ralph-1* Mutante konnte die aufgrund des Gendefektes akkumulierte C_{22} Monocarbonsäure als Hauptkomponente des Wurzelsuberins bestimmt werden. Generell kann gesagt werden, dass das Suberin der Doppelmutante *ralph/horst* eindeutig Monocarbonsäure-dominiert ist, während in der Mutante *cyp86B1-1/ralph-1* Monocarbonsäuren, ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren zu etwa gleichen Teilen am Polymer beteiligt sind. Der Gesamt-Suberingehalt der Mutante *cyp86A1-1/horst-1* zeigte eine eindeutige Reduktion gegenüber dem Wildtyp, ist jedoch trotz der Reduktion der Hauptkomponenten des Suberins, der $C_{18:1}$ ω -Hydroxysäure und der $C_{18:1}$ α,ω -Disäure weiterhin dominiert von ω -Hydroxysäuren, vergleichbar zum Polymer des Wildtyps.

Suberin hat, neben der Ausbildung von Barriereigenschaften eine Funktion in der Stabilisierung und Festigung der Zellwand und des gesamten Wurzelkörpers, vergleichbar zu der Funktion von eingebetteten Ligninbestandteilen (Franke *et al.*, 2005). In den hier durchgeführten anatomischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Abberationen des Suberins der *ralph/horst* Mutante diese stabilisierende Funktion einschränken (Abbildung 43). Bei einer makroskopischen Betrachtung der Wurzeln der Doppelmutante *ralph/horst* können keine phänotypischen Unterschiede zu Wurzeln des Wildtyps festgestellt werden. Bei einer Durchführung von Querschnitten von primären Wurzeln der *ralph/horst* Mutante wurde jedoch deutlich, dass sich die Wurzel der Linie *ralph/horst* in Bezug auf Stabilität und Starrheit von der Wurzel des Wildtyps unterscheidet. Obwohl hier das Pflanzenmaterial parallel angezogen und für die Mikroskopie aufbereitet wurde und trotz einer parallelen Fixierung des Wurzelmaterials in PBS/Formaldehyd waren suberinisierte endodermale Zellen der Linie *ralph/horst* nach dem Anfertigen von Dünnschnitten stark deformiert im Vergleich zu Querschnitten des Wildtyps, was sich auf die verringerte Stabilität der Zellwand zurückführen lässt. Es konnten hier kaum intakte Querschnitte von primären Wurzeln angefertigt werden. Eine Anfärbung von Suberinlamellen der Endodermis mit Sudan 7B zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine weniger intensive und diffuse Färbung. Endodermale Zellen erschienen teilweise kollabiert, eine intakte Ringstruktur von angefärbten Zellen um den Zentralzylinder konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 43). Die strukturellen Eigenschaften suberinisierter Gewebe scheinen durch die eingeführten Mutationen in der Doppelmutante *ralph/horst* stark eingeschränkt zu sein.

4.1 Charakterisierung der Doppelmutante *horst/cyp86B2*

Die Ergebnisse der Suberinkomposition von *ralph/horst* Doppelmutanten legen die Vermutung nahe, dass bei der enzymatischen Hydroxylierung von Monocarbonsäuren zu ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren eine hohe Redundanz zwischen den katalysierenden Enzymen besteht. Es konnte dabei gezeigt werden, dass trotz der Abwesenheit der zwei ω -Hydroxylasen CYP86B1/RALPH und CYP86A1/HORST weiterhin ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren in das Polymer eingelagert werden. Auch wenn die beiden genannten Enzyme in der Kettenlängenspezifität ihrer Substrate die gesamte Bandbreite an ω -hydroxylierten Molekülspezies abdecken, kann in ihrer Abwesenheit immer noch ω -Hydroxylierung stattfinden. Diese Ergebnisse deuten an, dass mindestens ein drittes Enzym, redundant zu RALPH und HORST, ω -Hydroxylierung von Suberinmonomeren katalysiert. Die postulierten enzymatischen Eigenschaften dieser hypothetischen ω -Hydroxylase legen einen hohen Grad an Sequenzhomologie zu den Enzymen CYP86A1, beziehungsweise CYP86B1 nahe.

Als erster Kandidat für dieses redundante Enzym wurde die Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP86B2 identifiziert. CYP86B2 gehört der gleichen Subfamilie wie CYP86B1 an und ist hochgradig identisch mit CYP86B1. Die Analyse des Wurzelsuberins der *knockout* Mutante *cyp86B2* wurde bereits in Diehl (2008) durchgeführt. Hier konnten keine qualitativen oder quantitativen Unterschiede im Aufbau des Suberinpolymers nachgewiesen werden. Da hier die Möglichkeit besteht, dass aufgrund der Redundanz der Enzyme kein Effekt bei einem *knockout* von CYP86B2 auf die Komposition des Suberins nachweisbar sein könnte, wurde eine Generierung von *horst/cyp86B2* Doppelmutanten durchgeführt. Eine Generierung von *ralph/cyp86B2* Doppelmutanten und *ralph/horst/cyp86B2* Tripelmutanten wurde ebenfalls eingeleitet, konnte jedoch aufgrund der Lokalisation der Gene CYP86B1/RALPH und CYP86B2 auf nahe beieinander liegenden Positionen auf einem Arm des fünften Chromosoms nicht erfolgreich durchgeführt werden. Die Generierung von Doppelmutanten, deren Gene auf einem Chromosom lokalisiert sind setzt eine meiotische Rekombination durch *Crossing-Over* voraus. Je näher die entsprechenden Gene zueinander lokalisiert sind, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit eines zwischen diesen Genen stattfindenden *Crossing-Over* Ereignisses (Mezard, 2006). Die für die Generierung von *ralph/cyp86B2* Doppelmutanten, beziehungsweise *ralph/horst/cyp86B2* Tripelmutanten errechnete *Crossing-Over*-Wahrscheinlichkeit lag bei etwa 1,4 %. Es wurden etwa 300 individuelle Nachkommen der F₁-Generation ohne positives Ergebnis genotypisiert.

Anhand der hier durchgeführten quantitativen und qualitativen Analysen des Wurzelsuberins der *horst/cyp86B2* Doppelmutante konnte dem Enzym CYP86B2 keine redundante Funktion in der Suberinbiosynthese zugewiesen werden. Die in Abbildung 46 und Abbildung 47 dargestellten Ergebnisse zeigen die Komposition des Suberins der *knockout* Mutante

cyp86A1-1/horst-1 und der Doppelmutante *horst/cyp86B2* sowie des Wildtyps. Es kann gesagt werden, dass sich die Zusammensetzung des Wurzeluberins der Doppelmutante *horst/cyp86B2* nicht signifikant vom Suberin der Mutante *horst/cyp86A1-1* unterscheidet. Alle nachweisbaren Aberrationen im Aufbau des Polymers sind somit zurückführbar auf den Gen *knockout* von *CYP86A1/HORST* und nicht *CYP86B2*-spezifisch.

Auch wenn in dieser Analyse kein positives Ergebnis für eine Funktion von *CYP86B2* in der Biosynthese des Wurzeluberins nachweisbar war, kann hier eine enzymatische Redundanz nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zu *CYP86B1/RALPH* würde man erwarten, dass das Enzym *CYP86B2* in seiner Funktion in erster Linie redundant zu dem Enzym *CYP86B1* ist. Ein Ausschalten des Gens *CYP86A1/HORST* würde somit möglicherweise keine erhöhte Aktivität von *CYP86B2* induzieren. Eine erfolgreiche Generierung von *ralph/cyp86B2* Doppelmutanten, beziehungsweise *ralph/horst/cyp86B2* Tripelmutanten könnte die Fragestellung der Redundanz endgültig klären.

4.2 Physiologische Konsequenzen veränderter

Polyesterkomposition in *cyp86B1/ralph* und *ralph/horst*

Pflanzen reagieren auf externe Stimuli durch Modifikation des Suberinisierungsgrades in den Zellwänden der Wurzelzellen. Suberinisierung kann eingeleitet werden als Reaktion auf Verwundung und Pathogenbefall (Agrios, 1997; Ranathunge *et al.*, 2011) und als Reaktion auf ungünstige Umweltbedingungen, beispielsweise erhöhte Salzkonzentration im Substrat oder Trockenheit (North und Nobel, 1994; Reinhardt und Rost, 1995; Steudle und Peterson, 1998). Da sowohl die Doppelmutante *ralph/horst* als auch die *knockout* Mutanten *cyp86A1/horst* und *cyp86B1/ralph* unter Standardanzuchtbedingungen weder in Hydrokultur noch in Bodenkultur einen Phänotyp aufweisen, sollten im Rahmen dieser Arbeit mögliche phänotypische Konsequenzen unterschiedlicher Stressesstimuli zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung festgestellt werden.

4.2.1 Einfluss veränderter Polyesterkompositionen auf die Samenkeimung

Bei der hier durchgeführten Bestimmung der Keimungsrate (3.9.2) konnten zwischen den Samen des Wildtyps und den Samen der Linie *ralph/horst* hochsignifikante Unterschiede festgestellt werden. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 50 (A) gezeigt. Die Keimungsrate von Samen der Doppelmutante war fast über den gesamten Konzentrationsbereich an Salzen im Nährmedium stark erhöht. Dieser Effekt auf die Keimungsrate ist wahrscheinlich begründet in der veränderten Komposition des Samenschalenpolyesters der Doppelmutante, eingeführt durch den *knockout* von *RALPH* (3.3.3) (Compagnon *et al.*, 2009). Mutanten der Linie *cyp86A1/horst* zeigen eine unveränderte Zusammensetzung des Samenschalenpolyesters. Das Enzym CYP86A1/HORST ist nicht am Aufbau des Samenschalenpolyesters beteiligt (Höfer *et al.*, 2008).

Samenkeimung wird induziert durch Imbibition des trockenen Samens und damit einhergehend einer Expansion des Embryos (Finch-Savage und Leubner-Metzger, 2006). Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Keimungsrate wäre somit, dass die Samenschale von *ralph/horst* Samen durchlässiger gegenüber Wasser ist. Die in dieser Arbeit durchgeführten semiquantitativen Permeations-Experimente mithilfe des Tracermoleküls Triphenyltetrazolium (Abbildung 48, Abbildung 49) können hierüber keinen Aufschluss geben. In Bezug auf die Durchlässigkeit gegenüber Triphenyltetrazolium konnten weder für Samen der *cyp86B1/ralph*-Linie noch für Samen der Doppelmutante *ralph/horst* Unterschiede zu den Samen des Wildtyps festgestellt werden. Auch wenn Triphenyltetrazolium allgemein verwendet wird um die Permeabilität von Samenschalen qualitativ darzustellen, kann hier keine direkte Aussage über die Permeabilität der

Samenschale gegenüber Wasser getroffen werden, da sich sowohl Größe als auch Moleküleigenschaften von H₂O und 2,3,5-Triphenyltetrazolium eindeutig unterscheiden.

Eine weitere Erklärung für die erhöhte Keimungsrate der Samen der Doppelmutante könnte in der Stabilität der Samenschale begründet sein. Die Modifikation des Samenschalenpolyesters könnte hier eine erhöhte Brüchigkeit der Samenschale verursachen. Im Ablauf der Samenkeimung ist das Aufbrechen der Samenschale durch die Radicula im Bereich der Testa ein zentrales Ereignis der Keimung (Bewley, 1997; Finch-Savage und Leubner-Metzger, 2006). Die Festigkeit der Samenschale wirkt dem Druck der Keimlingswurzel bei einer Auskeimung entgegen. Eine erhöhte Brüchigkeit der Samenschale könnte somit zur Folge haben, dass eine Penetration der Samenschale durch die Keimlingswurzel auch unter ungünstigen Umweltbedingungen vermehrt stattfindet, da die Samenschale der Wurzel des Embryos einen verringerten Widerstand entgegengesetzt. Dies hätte eine eindeutige Benachteiligung in Bezug auf den reproduktiven Erfolg der Pflanze unter Normalbedingungen zur Folge. Eine Überdauerung von negativen Umwelteinflüssen wäre deutlich eingeschränkt.

4.2.2 Einfluss veränderter Polyesterkompositionen auf die Überlebensrate von Keimlingen

Die Bestimmung der Überlebensrate junger Keimlinge unter ansteigenden Salzkonzentrationen (3.9.2) diente der Untersuchung der Stresstoleranz in den ersten Stadien der Pflanzenentwicklung direkt nach Auskeimung. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 50 (B) gezeigt. In den ersten Phasen der Keimung erfolgt die Ernährung des Keimlings über die Speichergewebe der Kotyledonen (Finch-Savage und Leubner-Metzger, 2006). Nach der Ausbildung einer funktionellen Radicula erfolgt der Übergang zur autotrophen Lebensweise. Die Radicula ermöglicht die Aufnahme von Nährstoffen aus dem Substrat, Photosynthese erfolgt in den Kotyledonen. In diesen sehr frühen Stadien der vegetativen Entwicklung ist die Ausbildung von apoplastischen Barrieren in der Radicula noch in der Entwicklung und in ihrer Funktionalität möglicherweise eingeschränkt. Bei einem Vergleich der Überlebensrate von Keimlingen konnten in einem Konzentrationsbereich von 50 – 100 mM KCl signifikante Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der Linie *ralph/horst* festgestellt werden (Abbildung 50 B). Keimlinge der Doppelmutante zeigten unter den hier angelegten salinen Bedingungen eine um etwa 20 % erhöhte Überlebensrate.

Vorangegangene Analysen des Wurzeluberins in Teilen der Wurzel nahe der Wurzelspitze konnten zeigen, dass das Suberin hier durch einen erhöhten Anteil an Monocarbonsäuren, besonders der C₂₂ Monocarbonsäure in Relation zu den bifunktionalen Säuren charakterisiert ist (Höfer *et al.*, 2008). Dies kann auch für Suberineinlagerungen in den Geweben der

Keimlingswurzel angenommen werden. Die Tendenz zu einer Akkumulation von Säuren im Suberinpolymer apikaler Wurzelregionen kann, wie in 4.1 beschrieben, auch in Analysen des Suberins ganzer Wurzeln der Doppelmutante *ralph/horst* beobachtet werden. Die detektierte Suberinkomposition in ganzen Wurzeln von *ralph/horst* spiegelt somit theoretisch das Suberin junger Wurzeln des Wildtyps wieder. Möglicherweise ist eine Tendenz zu einer säuredominierten Suberin-Zusammensetzung in frühen Stadien der Pflanzenentwicklung von Vorteil in Bezug auf die Stresstoleranz unter salinen Bedingungen. Dies konnte hier zumindest im Falle von KCl als salinem Stressfaktor angedeutet werden.

4.2.3 Einfluss veränderter Polyesterkompositionen auf die Toleranz gegenüber Osmolytika

In einem weiteren Experiment sollten die phänotypischen Auswirkungen von ansteigenden Konzentrationen an Osmolytika auf die Pflanze in der Phase der späteren Keimlingsentwicklung bestimmt werden (2.11.2). Hier erfolgten Auskeimung und frühe Pflanzenentwicklung unter Standardbedingungen. Eine Ausbildung von Suberinbarrieren im Apoplasten von primären endodermalen Zellen sollte so ohne Einfluss von Stressfaktoren gewährleistet werden. Neun Tage nach Auskeimung kann eine voll entwickelte endodermale Zelllage nachgewiesen werden (Baum *et al.*, 2002). Suberin-Depositionen können in diesem Stadium der Pflanzenentwicklung sowohl in Form von Suberinlamellen als auch als Bestandteil von Caspary'schen Streifen nachgewiesen werden und stellen durch die Abdichtung des Apoplasten der endodermalen Zellen eine funktionsfähige Barriere gegen Wasserverlust dar und erlauben eine selektive Nährstoffaufnahme. Die Applikation von Stress erfolgte hier durch eine Überführung der Wurzeln in NaCl- oder Mannitol-haltigen MS-Agar.

Hohe Konzentrationen an osmotisch wirksamen Substanzen im Nährmedium der Pflanze haben ein vermindertes Wasserpotenzial zur Folge. Die Aufnahme von Wasser wird erschwert. Erhöhte NaCl-Konzentrationen im Nährmedium verursachen neben osmotischem Stress eine eingeschränkte Nährstoffaufnahme, oxydativen Stress und ein ionisches Ungleichgewicht in der Pflanze durch Aufnahme von toxischem Na^+ (Verslues *et al.*, 2006).

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 51 gezeigt. Den Erwartungen entsprechend konnte beobachtet werden, dass ansteigende NaCl- und Mannitol-Konzentrationen im Substrat einen eindeutigen Einfluss auf die Pflanzenentwicklung haben. Mit ansteigender Stressorkonzentration werden Spross- und Wurzelwachstum eingeschränkt, die Ausbildung von Seitenwurzeln wird reduziert. Bei hohen Konzentrationen dieser Stressoren ist die Pflanze nicht lebensfähig. Es konnte jedoch bei keiner der hier untersuchten Pflanzenlinien eine erhöhte Anfälligkeit unter den hier

angelegten Stressbedingungen nachgewiesen werden. Pflanzen der Linien *cyp86B1-1/ralph1* und *ralph/horst* zeigten, trotz ihrer zum Teil weitreichenden Veränderungen in Suberinkomposition und Suberin-Gesamtgehalt, die phänotypischen Ausprägungen des Wildtyps unter den gegebenen Wachstumsbedingungen. Nach den hier vorliegenden Ergebnissen kann gesagt werden, dass die Barrierefunktion des Suberinpolyesters in *cyp86B1-1/ralph-1* und *ralph/horst* in ihrer Effektivität gegen die hier untersuchten abiotischen Stressbedingungen mit der des unmodifizierten Polyesters des Wildtyps vergleichbar ist.

4.2.4 Einfluss veränderter Polyesterkompositionen auf die Trockenstresstoleranz

Die Ergebnisse der vorangegangenen Stressexperimente werfen einige Fragen in Bezug auf die Funktion des aliphatischen Suberinpolyesters bei der Nährstoffaufnahme und im Ionenhaushalt der Pflanze auf. Der Literatur ist zu entnehmen, dass bei *Arabidopsis* eine Wässerung mit 100 mM NaCl eine vermehrte Deposition von aliphatischen Suberinbausteinen in die Gewebe der Wurzel induziert (Franke *et al.*, 2009). Der Suberingehalt ganzer Wurzeln war hier annähernd verdoppelt. Studien an der *esb1* Mutante, welche durch einen erhöhten Gehalt an Wurzelsuberin bei gleichbleibender relativer Zusammensetzung charakterisiert ist, konnten zeigen, dass Aberrationen im Aufbau des Suberins in der Wurzel ursächlich sind für eine Veränderung des Gehaltes von essentiellen Nährstoffen und Spurenelementen in den Geweben des Sprosses (Baxter *et al.*, 2009). Die Ergebnisse dieser Untersuchung deuten einen direkten Zusammenhang zwischen Nährstoffhaushalt und Suberinisierung an. Neben einem Einfluss auf den Nährstoffhaushalt der Pflanze konnte in der *esb1* Mutante eine verringerte Transpirationsrate und eine erhöhte Wassernutzungseffizienz während der vegetativen Wachstumsphase als auch eine erhöhte Resistenz gegen Trockenstress nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass ein direkter Zusammenhang zwischen Suberinisierung und Wasserhaushalt der Pflanze besteht.

Da sowohl in den *knockout* Mutanten *cyp86B1/ralph* und *cyp86A1/horst* als auch in der Doppelmutante *ralph/horst* ein verändertes und teilweise stark reduziertes Wurzelsuberin detektiert wurde, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Anfälligkeit von Pflanzen der genannten Genotypen gegenüber Trockenstress bestimmt werden. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 52 dargestellt. Es konnte dabei gezeigt werden, dass sich Pflanzen der Linie *cyp86A1/horst*, charakterisiert durch eine Reduktion an C₁₆ und C₁₈ ω-Hydroxysäuren und α,ω-Disäuren in Bezug auf ihre Trockenstresstoleranz wie Pflanzen des Wildtyps verhalten. Für Mutanten der Linie *cyp86B1/ralph* und *ralph/horst* konnte hier eine erhöhte

Toleranz gegenüber Austrocknung festgestellt werden. Messungen der Transpirationsrate und die Erfassung der photosynthetischen Quantenausbeute an Rosettenblättern deuten an, dass die erhöhte Trockenstressresistenz beider Linien nicht bedingt ist durch eine Verminderung der stomatalen Transpirationsrate oder eine verringerte Photosyntheserate, sondern ein Resultat der veränderten Zusammensetzung des Suberins in der Wurzel ist.

Eine Analyse des Wurzelsuberins der drei Genotypen und des Wildtyps zeigte, dass die Gesamtmenge des Suberins in der Wurzel von *cyp86A1/horst* und *ralph/horst* stark reduziert ist. Diese Reduktion alleine scheint jedoch nicht ausschlaggebend für die Barriereigenschaften des Suberins gegen Wasserverlust unter Trockenstressbedingungen zu sein, wie man aus den Ergebnissen in Baxter et al. (2009) schließen könnte.

Bei eingehender Betrachtung der relativen Verteilung der Suberinmonomere in Bezug auf die Gesamtmenge des Suberins ist ersichtlich, dass in den Pflanzenlinien *cyp86B1/ralph* und *ralph/horst*, die eine erhöhte Trockenstresstoleranz aufweisen, der Anteil an Monocarbonsäuren am Polymer den Anteil an ω -Hydroxysäuren und an α,ω -Disäuren übertrifft (Abbildung 42). Monocarbonsäuren stellen die Hauptstoffklasse des Suberins von *cyp86B1/ralph* und *ralph/horst* dar, mit der C_{22} Monocarbonsäure als Hauptmonomer. Diese Änderungen in der relativen Zusammensetzung könnten ein entscheidender Faktor der erhöhten Stresstoleranz gegenüber Austrocknung der Linien *cyp86B1/ralph* und *ralph/horst* sein. Die Verminderung der ω -Hydroxysäuren und α,ω -Disäuren bedingt eine Änderung des Verhältnisses von Carboxylgruppen zu Hydroxylgruppen im Polymer. Beide funktionellen Gruppen sind essenziell für die Quervernetzung des Polymers. Eine Verringerung der verfügbaren Hydroxygruppen könnte von der Pflanze biochemisch kompensiert werden durch eine vermehrte Einbettung von Glycerin als Verbindungsglied. Ein vermehrtes Vorkommen von Glycerin im Polyester hätte, aufgrund der drei assoziierten Hydroxylgruppen und der geringen Größe des Moleküls ein dichter gepacktes Polymer zur Folge, welches möglicherweise dem Wasserverlust aus der Pflanze an das umgebende Substrat unter Trockenstressbedingungen einen erhöhten Widerstand entgegensetzt.

Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass durch die signifikante Reduktion polarer funktioneller Gruppen in ω -Position von langkettigen Fettsäuren die Hydrophobizität des Polymers erhöht wird. Die erhöhte Dichte des Suberinpolyesters und die erhöhte Hydrophobizität würden somit zu einer verringerten "Porengröße" für den apoplastischen Transport von Wassermolekülen führen. Weiterhin kann spekuliert werden, dass die erhöhte Trockenstresstoleranz durch eine vermehrte Einlagerung von Suberin-assoziierten Wachsen in das Suberinpolymer begründet ist. In Geweben von unterirdischen Speicherorganen, beispielsweise dem Periderm der Kartoffelknolle konnte gezeigt werden, dass Suberin hier eng assoziiert ist mit linearen aliphatischen Molekülen mit 20 bis zu mehr als 30 Kohlenstoffatomen (Walton, 1990). Diese Suberin-assoziierten Wachse haben einen

entscheidenden Einfluss auf die Barriereigenschaften dieser Periderme. In Extrakten ganzer Wurzeln von *Arabidopsis* konnten in vorangegangenen Studien möglicherweise Suberin-assoziierte Wachse isoliert werden (Li *et al.*, 2007). Aufgrund der ungewöhnlichen Komposition der identifizierten Wurzelwaxse wird ihr Vorkommen in *Arabidopsis* und ihre Assoziation mit dem Wurzelsuberin zurzeit jedoch kontrovers diskutiert (Schreiber, 2010). Eine weitere mögliche Erklärung für die erhöhte Austrocknungstoleranz der beiden Mutanten könnte sein, dass die Pflanzen der Linien *cyp86B1/ralph* und *ralph/horst* aufgrund der massiven Defekte im Aufbau des Suberins schon in frühen Phasen ihrer Entwicklung gezwungen sind, alternative Maßnahmen gegen Wassermangelbedingungen und andere wurzelspezifische Stressfaktoren einzuleiten. Durch eine bereits erfolgte Adaption an die genannten Stressbedingungen in den frühen Entwicklungsphasen sind diese alternativen Mechanismen bereits voll ausgebildet wenn die Pflanzen einem experimentellen Stressfaktor ausgesetzt werden.

4.3 Analyse der differentiellen Genexpression in primären Wurzeln von *horst-1* und der *ralph/horst*

Die Erfassung der Genexpression der Suberinmutanten *horst-1*, *ralph/horst* und des korrespondierenden Wildtyps erfolgte durch Auftragung von cDNA-Kopien der RNA-Extrakte primärer Wurzelgewebe auf einen cDNA Microarray. Die Verwendung eines Microarrays ermöglicht die Aufnahme des gesamten RNA Expressionsspektrums einer Zelle oder eines Gewebes. Durch einen Vergleich der Expressionsspektren kann differenzielle Expression von Genen in den Mutantenlinien im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp erfasst werden.

Sowohl in *horst-1* als auch in *ralph/horst* konnte gezeigt werden, dass regulatorische Proteine, speziell Transkriptionsfaktoren, differenziell exprimiert sind im Vergleich zum Wildtyp. 7,4 % der runterregulierten Gene und 7,1 % der hochregulierten Gene in *horst-1* codierten für Transkriptionsfaktoren. In der Doppelmutante *ralph/horst* codierten 4,3 % der runterregulierten und 11 % der hochregulierten Gene für Transkriptionsfaktoren. Die hier detektierten Transkriptionsfaktoren konnten den MYB-, NAC-, WRKY- und AP2-Familien der Transkriptionsfaktoren zugeordnet werden. Transkriptionsfaktoren haben eine entscheidende Funktion in der Regulation von biologischen Prozessen durch die Kontrolle der Genexpression auf transkriptioneller Ebene. Die zentrale Bedeutung von Transkriptionsfaktoren für den Lebenszyklus von Pflanzen spiegelt sich in der hohen Anzahl an Transkriptionsfaktoren im Genom von *Arabidopsis* wieder. Insgesamt codieren 5,9 % des Genoms von *Arabidopsis* für Transkriptionsfaktoren, die meisten davon sind pflanzenspezifisch (Riechmann *et al.*, 2000). Eine veränderte

Wurzelsuberin-Zusammensetzung bedingt somit eine eindeutig veränderte Regulation der Transkription durch differenzielle Expression von Transkriptionsfaktoren.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass in den *horst-1* und *ralph/horst* Gene des Lipidmetabolismus differenziell exprimiert sind. In der Gruppe "Acyl-Lipide" sind Lipid-spezifische Transporter, Elongasen, Acyltransferasen Lipidhydrolasen und andere Lipid-spezifische Enzyme zusammengefasst. 5,8 % der hochregulierten und 1,3 % der Gene runterregulierten Gene in *horst-1* und 2,3 % der hochregulierten und 3,6 % der runterregulierten Gene in *ralph/horst* stehen in direktem Zusammenhang mit dem Lipidmetabolismus. Eine veränderte Zusammensetzung des aliphatischen Suberins in beiden Mutantenlinien bedingt hier offensichtlich eine veränderte Regulation des Lipidhaushaltes der Pflanzen.

Neben der allgemeinen Auswertung und Klassifizierung der Daten sollten durch eine detaillierte Betrachtung der differenziell exprimierten Gene in *horst-1* und *ralph/horst* Kandidaten identifiziert werden, die in Bezug auf die Suberinbiosynthese und deren Regulation von Interesse sein könnten.

In der Gruppe der "Acyl-Lipide" In *horst-1* unterlagen die Acyltransferase *GPAT1* und die Elongase *KCS3* einer erhöhten Genexpression. *GPAT1* wurde bereits in vorangegangenen Studien charakterisiert und ist beteiligt am Glycerolipid-Metabolismus. Korrespondierende *knockout* Mutanten zeigten eine eingeschränkte Pollenentwicklung und erhöhte männliche Sterilität (Zheng *et al.*, 2003). *KCS3* wurde bisher nicht näher charakterisiert. Da bereits für diverse Acyltransferasen und β -Ketoacyl-CoA-Synthasen eine Funktion in der Biosynthese aliphatischer Zellwandpolymere nachgewiesen werden konnte, stellen diese Gene interessante Kandidaten in Bezug auf eine Beteiligung an der Suberinbiosynthese dar (Todd *et al.*, 1999; Beisson *et al.*, 2007; Franke *et al.*, 2009; Li-Beisson *et al.*, 2009). Eine erhöhte Expression in *horst-1* zeigte sich ebenfalls für das Gen *CER2* (*ECERIFERUM2*). Für *CER2* konnte eine Acyltransferase-Aktivität nachgewiesen werden. Korrespondierende *cer2 knockout* Mutanten sind charakterisiert durch eine eingeschränkte Biosynthese kutikulärer Wachse des Stängels (Jenks *et al.*, 1995; Xia *et al.*, 1996). *CER2* hat hier möglicherweise eine Funktion in der Kompensation der veränderten Barriereigenschaften des Suberins der *horst-1* Mutante durch Einlagerung von Wachsbestandteilen in das Suberin-Polymer. Neben den genannten Kandidatengenen zeigten auch diverse Lipidtransporter der LTP-Familie und der ABC-Familie eine erhöhte Expression in *horst-1*. Diese und weitere Kandidatengene sind in Tabelle 29 und Tabelle 30 aufgelistet.

Da P450-Monooxygenasen eine zentrale Funktion in der Biosynthese des aliphatischen Suberins innehaben, sollte auch hier nach möglichen Kandidatengenen mit Beteiligung an der Suberinbiosynthese gescreent werden. Interessante Kandidatengene sind hier *CYP77B1* und *CYP94B3*. *CYP77B1* zeigte eine erhöhte Expression in *horst-1*. Für ein Mitglied

derselben Enzymfamilie, CYP77A6, konnte bereits eine Funktion als Fettsäure-Hydrolase in der Biosynthese des Blütenkutins nachgewiesen werden (Li-Beisson *et al.*, 2009). Auch *CYP94B3* ist in *horst-1* eindeutig hochreguliert. In experimentellen Ansätzen konnte für P450-Monooxygenasen der CYP94-Familie eine Hydroxylierungsaktivität von Fettsäuren, analog zu den an der Suberinbiosynthese beteiligten Enzymen CYP86A1/HORST und CYP86B1/RALPH, gezeigt werden (Pinot und Beisson, 2011).

In der Gruppe der Transkriptionsfaktoren konnte für die meisten AP2-Transkriptionsfaktoren eine erhöhte Expression in *horst-1* festgestellt werden. Transkriptionsfaktoren mit AP2-Domänen kommt eine zentrale Rolle in der Regulation der Trockenstress- und Kältestresstoleranz zu (Liu *et al.*, 1998; Sakuma *et al.*, 2002). Für SHINE, einem Transkriptionsfaktor der AP2-Familie konnte eine regulatorische Funktion in der Biosynthese von kutikulären Wachsen nachgewiesen werden. Eine Überexpression von *SHINE1* in *Arabidopsis* induzierte eine erhöhte Trockenstresstoleranz (Aharoni *et al.*, 2004). AP2-Transkriptionsfaktoren könnten hier vermehrt exprimiert werden um die veränderten Barriereigenschaften des Suberins in *horst-1* zu kompensieren.

Neben diesen möglicherweise an der Suberinbiosynthese involvierten Genprodukten konnte in *horst-1* eine erhöhte Expression von membrangebundenen Wasserkanälen detektiert werden. Die verstärkte Einlagerung von Wasserkanälen in die Zellmembranen erfolgt möglicherweise als indirekte Reaktion auf die veränderten Barriereigenschaften des Suberins in der Wurzel.

Bei Betrachtung der differentiellen Expression von Genen in der *ralph/horst* Doppelmutante konnte, wie in *horst-1*, eine erhöhte Expression der Acyltransferase *GPAT1* nachgewiesen werden. Bei Analyse der Expressionsprofile der Cytochrom-P450-Monooxygenasen in *ralph/horst* konnte eine signifikant reduzierte Expression von *CYP86B2* detektiert werden. Dies war bei Betrachtung der differentiellen Genexpression in *horst-1* nicht zu beobachten. In phylogenetischen Verwandtschaftsanalysen konnten gezeigt werden, dass *CYP86B2* die nächst homologe P450-Monooxygenase zu *CYP86B1/RALPH* ist (Nelson *et al.*, 2004). Die hier erhobenen Expressionsdaten deuten an, dass die Expression von *CYP86B2* an das Vorhandensein des Enzyms *CYP86B1/RALPH* in der Zelle gekoppelt ist. Möglicherweise sind *CYP86B1/RALPH* und *CYP86B2* in einem Stoffwechselweg hintereinander geschaltet, sodass das Produkt der katalytischen Reaktion von *CYP86B1/RALPH* das Substrat für *CYP86B2* darstellt. Durch negative Rückkopplungsmechanismen bei Abwesenheit von *CYP86B1/RALPH*, beziehungsweise dessen enzymatischem Reaktionsprodukt würde somit die Expression von *CYP86B2* runterreguliert werden. Vorstellbar wäre beispielsweise, dass *CYP86B2* die Oxygenierung der von *CYP86B1/RALPH* gebildeten ω -Hydroxysäuren zu α,ω -Disäuren katalysiert.

Weitere deutliche Änderungen im Expressionsprofil konnten für P450-Monooxygenasen der CYP82 Familie nachgewiesen werden. Die Expression von *CYP86C2* und *CYP86C3* war signifikant reduziert, die Expression von *CYP82F1* signifikant erhöht im Vergleich zum Wildtyp. Über P450-Monooxygenasen der CYP82 Familie ist wenig bekannt, jedoch konnte für *CYP82A1* in *Pisum sativum* eine Expression als Reaktion auf Verwundung festgestellt werden (Whitbred und Schuler, 2000). Enzyme der CYP82 Familie sind bisher ausschließlich in dikotylen Pflanzen nachgewiesen worden (Nelson *et al.*, 2004).

Bei einer Betrachtung der differentiellen Expression von Transkriptionsfaktoren in *ralph/horst* konnte, analog zum Expressionsmuster in *horst-1*, für Transkriptionsfaktoren mit AP2-Domänen eine erhöhte Genexpression detektiert werden. Die AP2-Transkriptionsfaktoren AT5G52020 und DRE2B (AT2G40340) konnten in beiden Mutantenlinien als erhöht exprimiert nachgewiesen werden und stellen somit interessante Kandidatengene mit möglicher Beteiligung an der Regulation der Suberinbiosynthese dar.

Analog zur *horst-1* Mutante konnte in der Doppelmutante *ralph/horst* ebenfalls eine erhöhte Expression von Membran-lokalisierten Wassertransportern nachgewiesen werden. Die Wasserkanäle *TIP2;3* und *TIP2;2* zeigten die höchste differentielle Expression in beiden Mutantenlinien. Alle hier genannten und weitere Kandidatengene sind in Tabelle 31 und Tabelle 32 aufgelistet.

5 Zusammenfassung

Suberinablagerungen in den Wurzeln höherer Pflanzen tragen entscheidend zur Regulation des Wasserhaushaltes bei. Sie ermöglichen der Wurzel eine selektive Aufnahme von Nährstoffen, erlauben den Ausschluss toxischer Substanzen und stellen eine Barriere für die Penetration von Pathogenen dar. Der Suberin-assoziierte Polyester der Samenschale trägt zum Schutz des Embryos bei und ermöglicht embryonalen Geweben eine Überdauerung von negativen Umwelteinflüssen bei Samendormanz. Trotz der entscheidenden Bedeutung dieser Zellwand-assoziierten Biopolyester für den Lebenszyklus höherer Pflanzen blieben die bisherigen Erkenntnisse zur Biosynthese von Suberin und Suberin-assoziierten Polyestern lückenhaft.

In dieser Arbeit konnten durch Datenbank-basierte Recherche und organspezifische Expressionsstudien in *Arabidopsis thaliana* Gene identifiziert werden, deren Translationsprodukte an der Biosynthese der genannten Zellwandpolyester direkt und indirekt beteiligt sind.

In einem *reverse genetics* Versuchsansatz konnte CYP86B1/RALPH als Fettsäure- ω -Hydroxylase in der Biosynthese von Wurzelsuberin und dem Zellwandpolyester der Samenschale charakterisiert werden. CYP86B1 stellt die erste *in vivo* charakterisierte ω -Hydroxylase von Fettsäuren mit einer Kettenlänge $>C_{20}$ in höheren Pflanzen dar. Da ω -oxygenierte Fettsäuren zentrale Bausteine des aliphatischen Suberins darstellen, ist CYP86B1 ein Schlüsselenzym der Biosynthese des Wurzelsuberins und des Samenschalen-Polyesters.

Für die putative Peroxidase POX konnte ebenfalls eine indirekte Beteiligung an der Biosynthese des Suberins der Wurzel und des Polyesters der Samenschale nachgewiesen werden.

In einem weiteren experimentellen Ansatz dieser Arbeit konnten durch die Kreuzung von Insertionsmutanten und die Generierung von Doppelmutanten Erkenntnisse über die regulatorischen und enzymatischen Zusammenhänge in der Suberinbiosynthese gewonnen werden. Im Rahmen dieser Kreuzungsexperimente wurden Mutantenlinien generiert, die durch ein hochgradig verändertes Wurzelsuberin charakterisiert sind. Die Doppelmutanten *ralph/horst* und *ralph/pox* waren charakterisiert durch hochgradig veränderte Kompositionen des Suberin-Polyesters der Wurzel und der Samenschale.

Anhand physiologischer Studien konnte gezeigt werden, dass sich die Mutante *pox* durch eine verringerte Permeabilität der Samenschale auszeichnet. In der *knockout* Mutante *cyp86B1/ralph* und der Doppelmutante *ralph/horst* konnte in einem Austrocknungsexperiment unter Laborbedingungen eine erhöhte Toleranz gegen Dehydrierung nachgewiesen werden.

Zur Erweiterung der Erkenntnisse der regulatorischen Zusammenhänge der Suberin-Biosynthese auf transkriptioneller Ebene wurde eine Aufnahme der differentiellen Genexpression ausgewählter Suberinmutanten mittels Microarray durchgeführt.

Ein weiterer Ansatz dieser Arbeit diente der Charakterisierung der P450-Monooxygenase CYP704B2 in *Oryza sativa*. In den hier durchgeführten Analysen des Kutins und der kutikulären Wachse von Antheren der korrespondierenden Mutante *cyp704B2* konnte gezeigt werden, dass CYP704B2 ein zentrales Enzym der Biosynthese des Antherenkutins ist. Die Aberrationen des Antherenkutins tragen zur Ausbildung der männlichen Sterilität der Linie *cyp704B2* bei.

6 Literaturverzeichnis

- Agrawal VP, Kolattukudy PE** (1978) Purification and characterization of a wound-induced ω -hydroxyfatty acid:NADP oxidoreductase from potato tuber disks (*Solanum tuberosum* L.). Archives of Biochemistry and Biophysics **191**: 452-465
- Agrios G** (1997) Plant Pathology. Academic Press Inc., San Diego
- 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 Online **16**: 2463-2480
- Ahlers F, Lambert J, Wiermann R** (2003) Acetylation and Silylation of Piperidine Solubilized Sporopollenin from Pollen of *Typha angustifolia* L. Zeitschrift für Naturforschung **58c**: 807 - 811
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR** (2003) Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. Science **301**: 653-657
- Arrieta-Baez D, Stark RE** (2006) Modeling suberization with peroxidase-catalyzed polymerization of hydroxycinnamic acids: Cross-coupling and dimerization reactions. Phytochemistry **67**: 743-753
- Baum SF, Dubrovsky JG, Rost TL** (2002) Apical organization and maturation of the cortex and vascular cylinder in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) roots. American Journal of Botany **89**: 908-920
- Baxter I, Hosmani PS, Rus A, Lahner B, Borevitz JO, Muthukumar B, Mickelbart MV, Schreiber L, Franke RB, Salt DE** (2009) Root Suberin Forms an Extracellular Barrier That Affects Water Relations and Mineral Nutrition in *Arabidopsis*. Plos Genetics **5**: 12
- Beisson F, Li YH, Bonaventure G, Pollard M, Ohlrogge JB** (2007) The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of *Arabidopsis*. Plant Cell **19**: 351-368

- Benveniste I, Tijet N, Adas F, Philipps G, Salaün J-P, Durst F** (1998) CYP86A1 from *Arabidopsis thaliana* Encodes a Cytochrome P450-Dependent Fatty Acid Omega-Hydroxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **243**: 688-693
- Bernards MA** (2002) Demystifying suberin. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **80**: 227-240
- Bernards MA, Fleming WD, Llewellyn DB, Priefer R, Yang X, Sabatino A, Plourde GL** (1999) Biochemical Characterization of the Suberization-Associated Anionic Peroxidase of Potato. *Plant Physiology* **121**: 135-146
- Bernards MA, Lewis NG** (1992) Alkyl ferulates in wound healing potato tubers. *Phytochemistry* **31**: 3409-3412
- Bewley JD** (1997) Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* **9**: 1055-1066
- Bird D, Beisson F, Brigham A, Shin J, Greer S, Jetter R, Kunst L, Wu X, 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
- Birnbaum K, Shasha DE, Wang JY, Jung JW, Lambert GM, Galbraith DW, Benfey PN** (2003) A Gene Expression Map of the *Arabidopsis* Root. *Science* **302**: 1956-1960
- Boesewinkel FD, Bouman F** (1995) The seed: structure and function. *In* G Galili, J Kigel, eds, *Seed Development and Germination*. Dekker, M., New York, pp 1-24
- Brady SM, Orlando DA, Lee J-Y, Wang JY, Koch J, Dinneny JR, Mace D, Ohler U, Benfey PN** (2007) A High-Resolution Root Spatiotemporal Map Reveals Dominant Expression Patterns. *Science* **318**: 801-806
- Briesen I** (2008) Charakterisierung von β -Ketoacyl-CoA-Synthasen in *Arabidopsis thaliana*. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
- Brundrett MC, Kendrick B, Peterson CA** (1991) Efficient Lipid Staining in Plant Material with Sudan Red 7B or Fluoral Yellow 088 in Polyethylene Glycol-Glycerol. *Biotechnic & Histochemistry* **66**: 111-116
- Caspary R** (1866) Bemerkung über die Schutzscheide und die Bildung des Stammes und der Wurzel. *Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik* **4**: 101-123
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**:

735-743

- Compagnon V, Diehl P, Benveniste I, Meyer D, Schaller H, Schreiber L, Franke R, Pinot F** (2009) CYP86B1 Is Required for Very Long Chain ω -Hydroxyacid and α,ω -Dicarboxylic Acid Synthesis in Root and Seed Suberin Polyester. *Plant Physiology* **150**: 1831-1843
- Curtis MD, Grossniklaus U** (2003) A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta. *Plant Physiology* **133**: 462-469
- Debeaujon I, Leon-Kloosterziel KM, Koornneef M** (2000) Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **122**: 403-413
- 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 Online* **21**: 1230-1238
- DeVries S, Hoge H, Bisseling T** (1988) Isolation of total and polysomal RNA from plant tissues. In SB Gelvin, SR A, eds, *Plant molecular biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 1 - 5
- Diehl P** (2008) Untersuchungen zur Bedeutung von Cytochrom-P450-Monooxygenasen für die Biosynthese aliphatischer Zellwandpolymere in *Arabidopsis thaliana*. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
- Dobritsa AA, Shrestha J, Morant M, Pinot F, Matsuno M, Swanson R, Moller BL, Preuss D** (2009) CYP704B1 Is a Long-Chain Fatty Acid omega-Hydroxylase Essential for Sporopollenin Synthesis in Pollen of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **151**: 574-589
- Duan H, Schuler MA** (2005) Differential Expression and Evolution of the *Arabidopsis* CYP86A Subfamily. *Plant Physiology* **137**: 1067-1081
- Edlund AF, Swanson R, Preuss D** (2004) Pollen and Stigma Structure and Function: The Role of Diversity in Pollination. *The Plant Cell Online* **16**: S84-S97
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G** (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* **171**: 501-523

- 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, Hofer R, Briesen I, Emsermann M, Efremova N, Yephremov A, Schreiber L** (2009) The *DAISY* gene from *Arabidopsis* encodes a fatty acid elongase condensing enzyme involved in the biosynthesis of aliphatic suberin in roots and the chalaza-micropyle region of seeds. *Plant Journal* **57**: 80-95
- Franke R, Schreiber L** (2007) Suberin - a biopolyester forming apoplastic plant interfaces. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 252-259
- Gou J-Y, Yu X-H, Liu C-J** (2009) A hydroxycinnamoyltransferase responsible for synthesizing suberin aromatics in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 18855-18860
- Graça J, Pereira H** (2000a) Methanolysis of bark suberins: analysis of glycerol and acid monomers. *Phytochemical Analysis* **11**: 45-51
- Graça J, Pereira H** (2000b) Suberin Structure in Potato Periderm: Glycerol, Long-Chain Monomers, and Glyceryl and Feruloyl Dimers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 5476-5483
- Graça J, Santos S** (2006) Linear Aliphatic Dimeric Esters from Cork Suberin. *Biomacromolecules* **7**: 2003-2010
- Graça J, Santos S** (2007) Suberin: A biopolyester of plants' skin. *Macromolecular Bioscience* **7**: 128-135
- Graça J, Schreiber L, Rodrigues J, Pereira H** (2002) Glycerol and glyceryl esters of ω -hydroxyacids in cutins. *Phytochemistry* **61**: 205-215
- Höfer R** (2008) Untersuchungen zur Suberinentwicklung und der Bedeutung von P450-Monooxygenasen bei der Suberinbiosynthese in *Arabidopsis thaliana*. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
- Höfer R, Briesen I, Beck M, Pinot F, Schreiber L, Franke R** (2008) The *Arabidopsis* cytochrome P450 *CYP86A1* encodes a fatty acid omega-hydroxylase involved in suberin monomer biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **59**: 2347-2360
- Holloway PJ** (1977) Aspects of Cutin Structure and Formation. *Biochemical Society Transactions* **5**: 1263-1266
- Hose E, Clarkson DT, Steudle E, Schreiber L, Hartung W** (2001) The exodermis: a variable apoplastic barrier. *Journal of Experimental Botany* **52**: 2245-2264

- James Jr DW, Lim E, Keller J, Plooy I, Ralston E, Dooner HK** (1995) Directed Tagging of the Arabidopsis *FATTY ACID ELONGATION1 (FAE1)* Gene with the Maize Transposon Activator. *The Plant Cell Online* **7**: 309-319
- Jeffree CE** (1996) Structure and ontogeny of plant cuticles. *In* G Kerstiens, ed, *Plant Cuticles: An Integrated Functional Approach*. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK, pp 33-82
- Jenks MA, Tuttle HA, Eigenbrode SD, Feldmann KA** (1995) Leaf Epicuticular Waxes of the Eceriferum Mutants in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **108**: 369-377
- Jung KH, Han MJ, Lee DY, Lee YS, Schreiber L, Franke R, Faust A, Yephremov A, Saedler H, Kim YW, Hwang I, An G** (2006) Wax-deficient *anther1* is involved in cuticle and wax production in rice anther walls and is required for pollen development. *Plant Cell* **18**: 3015-3032
- Kandel S, Sauveplane V, Compagnon V, Franke R, Millet Y, Schreiber L, Werck-Reichhart D, Pinot F** (2007) Characterization of a methyl jasmonate and wounding-responsive cytochrome P450 of *Arabidopsis thaliana* catalyzing dicarboxylic fatty acid formation in vitro. *Febs Journal* **274**: 5116-5127
- Kolattukudy P** (2001) Polyesters in Higher Plants. *In* W Babel, A Steinbüchel, eds, *Biopolyesters*, Vol 71. Springer Berlin / Heidelberg, pp 1-49
- Kolattukudy PE** (1980) Bio-Polyester Membranes of Plants - Cutin and Suberin. *Science* **208**: 990-1000
- Kolattukudy PE** (1985) Enzymatic Penetration of the Plant Cuticle by Fungal Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **23**: 223-250
- Kunst L, Samuels AL** (2003) Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research* **42**: 51-80
- Kurdyukov S, Faust A, Nawrath C, Bär S, Voisin D, Efremova N, Franke R, Schreiber L, Saedler H, Métraux J-P, Yephremov A** (2006) The Epidermis-Specific Extracellular BODYGUARD Controls Cuticle Development and Morphogenesis in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **18**: 321-339
- Le Bouquin R, Skrabs M, Kahn R, Benveniste I, Salaün J-P, Schreiber L, Durst F, Pinot F** (2001) CYP94A5, a new cytochrome P450 from *Nicotiana tabacum* is able to catalyze the oxidation of fatty acids to the ω -alcohol and to the corresponding diacid. *European Journal of Biochemistry* **268**: 3083-3090

- Leprince O, Buitink J** (2010) Desiccation tolerance: From genomics to the field. *Plant Science* **179**: 554-564
- Leveau JHJ** (2007) Microbia Communities in the Phyllosphere. *In Annual Plant Reviews Volume 23: Biology of the Plant Cuticle*. Blackwell Publishing Ltd, pp 334-367
- Li-Beisson Y, Pollard M, Sauveplane V, Pinot F, Ohlrogge J, Beisson F** (2009) Nanoridges that characterize the surface morphology of flowers require the synthesis of cutin polyester. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 22008-22013
- Li-Beisson Y, Shorrosh B, Beisson F, Andersson MX, Arondel V, Bates PD, Baud S, Bird D, DeBono A, Durrett TP, Franke RB, Graham IA, Katayama K, Kelly AA, Larson T, Markham JE, Miquel M, Molina I, Nishida I, Rowland O, Samuels L, Schmid KM, Wada H, Welti R, Xu C, Zallot R, Ohlrogge J** (2010) Acyl-Lipid Metabolism. *The Arabidopsis Book* **8**: 1-65
- Li H, Pinot F, Sauveplane V, Werck-Reichhart D, Diehl P, Schreiber L, Franke R, Zhang P, Chen L, Gao Y, Liang W, Zhang D** (2010) Cytochrome P450 Family Member CYP704B2 Catalyzes the ω -Hydroxylation of Fatty Acids and Is Required for Anther Cutin Biosynthesis and Pollen Exine Formation in Rice. *The Plant Cell Online* **22**: 173-190
- Li YH, Beisson F, Ohlrogge J, Pollard M** (2007) Monoacylglycerols are components of root waxes and can be produced in the aerial cuticle by ectopic expression of a suberin-associated acyltransferase. *Plant Physiology* **144**: 1267-1277
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1998) Two Transcription Factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA Binding Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought- and Low-Temperature-Responsive Gene Expression, Respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* **10**: 1391-1406
- Lulai EC, Corsini DL** (1998) Differential deposition of suberin phenolic and aliphatic domains and their roles in resistance to infection during potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) wound-healing. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **53**: 209-222
- Mendel JG** (1866) Versuche über Pflanzen-Hybriden. *Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn* **IV** 3-47

- Mezard C** (2006) Meiotic recombination hotspots in plants. *Biochemical Society Transactions* **34**: 531-534
- 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 Online* **11**: 825-838
- Millar AA, Kunst L** (1997) Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme. *The Plant Journal* **12**: 121-131
- Moire L, Schmutz A, Buchala A, Yan B, Stark RE, Ryser U** (1999) Glycerol Is a Suberin Monomer. New Experimental Evidence for an Old Hypothesis. *Plant Physiology* **119**: 1137-1146
- Molina I, Bonaventure G, Ohlrogge J, Pollard M** (2006) The lipid polyester composition of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* seeds. *Phytochemistry* **67**: 2597-2610
- Molina I, Li-Beisson Y, Beisson F, Ohlrogge JB, Pollard M** (2009) Identification of an *Arabidopsis* Feruloyl-Coenzyme A Transferase Required for Suberin Synthesis. *Plant Physiology* **151**: 1317-1328
- Molina I, Ohlrogge JB, Pollard M** (2008) Deposition and localization of lipid polyester in developing seeds of *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *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. *Plant Cell* **19**: 1473-1487
- Murashige T, Skoog F** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497
- Nawrath C** (2002) The Biopolymers Cutin and Suberin. *In The Arabidopsis Book*. The American Society of Plant Biologists, p e0021
- Neinhuis C, Barthlott W** (1997) Characterization and Distribution of Water-repellent, Self-cleaning Plant Surfaces. *Annals of Botany* **79**: 667-677
- Nelson DR** (1999) Cytochrome P450 and the Individuality of Species. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **369**: 1-10

- Nelson DR, Schuler MA, Paquette SM, Werck-Reichhart D, Bak S** (2004) Comparative Genomics of Rice and *Arabidopsis*. Analysis of 727 Cytochrome P450 Genes and Pseudogenes from a Monocot and a Dicot. *Plant Physiology* **135**: 756-772
- Nip M, Tegelaar EW, Leeuw JW, Schenck PA, Holloway PJ** (1986) A new non-saponifiable highly aliphatic and resistant biopolymer in plant cuticles. *Naturwissenschaften* **73**: 579-585
- Nobel PS** (1991) *Physiochemical and Environmental Plant Physiology*. Academic Press Inc., San Diego
- North GB, Nobel PS** (1994) Changes in Root Hydraulic Conductivity for Two Tropical Epiphytic Cacti as Soil Moisture Varies. *American Journal of Botany* **81**: 46-53
- Nosbüscher D** (2009) Untersuchung des β -Ketoacyl-CoA-Synthase-Gens At4g34510 in *Arabidopsis thaliana*. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
- Obayashi T, Kinoshita K, Nakai K, Shibaoka M, Hayashi S, Saeki M, Shibata D, Saito K, Ohta H** (2007) ATTED-II: a database of co-expressed genes and cis elements for identifying co-regulated gene groups in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* **35**: D863-D869
- Pfündel EE, Agati G, Cerovic ZG** (2007) Optical Properties of Plant Surfaces. *In* Annual Plant Reviews Volume 23: Biology of the Plant Cuticle. Blackwell Publishing Ltd, pp 216-249
- Pinot F, Beisson F** (2011) Cytochrome P450 metabolizing fatty acids in plants: characterization and physiological roles. *Febs Journal* **278**: 195-205
- Pinot F, Bosch H, Alayrac C, Mioskowski C, Vendais A, Durst F, Salaün JP** (1993) ω -Hydroxylation of Oleic Acid in *Vicia sativa* Microsomes (Inhibition by Substrate Analogs and Inactivation by Terminal Acetylenes). *Plant Physiology* **102**: 1313-1318
- Pinot F, Salaün J-P, Bosch H, Lesot A, Mioskowski C, Durst F** (1992) ω -Hydroxylation of Z9-octadecenoic, Z9,10-epoxystearic and 9,10-dihydroxystearic acids by microsomal cytochrome P450 systems from *Vicia sativa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **184**: 183-193
- Pollard M, Beisson F, Li YH, Ohlrogge JB** (2008) Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in Plant Science* **13**: 236-246

- Quiroga M, Guerrero C, Botella MA, Barceló A, Amaya I, Medina Mal, Alonso FJ, de Forchetti SM, Tigier H, Valpuesta V** (2000) A Tomato Peroxidase Involved in the Synthesis of Lignin and Suberin. *Plant Physiology* **122**: 1119-1128
- Ranathunge K, Schreiber L** (2011) Water and solute permeabilities of *Arabidopsis* roots in relation to the amount and composition of aliphatic suberin. *Journal of Experimental Botany* **62**: 1961-1974
- Ranathunge K, Schreiber L, Franke R** (2011) Suberin research in the genomics era - New interest for an old polymer. *Plant Science* **180**: 399-413
- Reinhardt DH, Rost TL** (1995) Salinity accelerates endodermal development and induces an exodermis in cotton seedling roots. *Environmental and Experimental Botany* **35**: 563-574
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C-Z, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang JZ, Ghandehari D, Sherman BK, Yu G-L** (2000) *Arabidopsis* Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes. *Science* **290**: 2105-2110
- Riederer M, Schreiber L** (2001) Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *Journal of Experimental Botany* **52**: 2023-2032
- Rupasinghe SG, Duan H, Schuler MA** (2007) Molecular definitions of fatty acid hydroxylases in *Arabidopsis thaliana*. *Proteins - Structure Function and Bioinformatics* **68**: 279-293
- Sakamoto K, Briggs WR** (2002) Cellular and Subcellular Localization of Phototropin 1. *The Plant Cell Online* **14**: 1723-1735
- Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2002) DNA-Binding Specificity of the ERF/AP2 Domain of *Arabidopsis* DREBs, Transcription Factors Involved in Dehydration- and Cold-Inducible Gene Expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **290**: 998-1009
- Sawhney VK, Polowick PL** (1986) Temperature-induced modifications in the surface features of stamens of a tomato mutant: An SEM study. *Protoplasma* **131**: 75-81

- Schreiber L** (2007) Endodermis. *In Handbook of Plant Science*.
John Wiley & Sons, Ltd
- Schreiber L** (2010) Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. *Trends in Plant Science* **15**: 546-553
- 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
- Schuler M, Duan H, Bilgin M, Ali S** (2006) *Arabidopsis* cytochrome P450s through the looking glass: a window on plant biochemistry. *Phytochemistry Reviews* **5**: 205-237
- Schuler MA, Werck-Reichhart D** (2003) Functional genomics of P450s. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 629-667
- Shao SQ, Meyer CJ, Ma FS, Peterson CA, Bernards MA** (2007) The outermost cuticle of soybean seeds: chemical composition and function during imbibition. *Journal of Experimental Botany* **58**: 1071-1082
- Shi H, Lee B-h, Wu S-J, Zhu J-K** (2003) Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotech* **21**: 81-85
- Soler M, Serra O, Molinas M, Huguet G, Fluch S, Figueras M** (2007) A genomic approach to suberin biosynthesis and cork differentiation. *Plant Physiology* **144**: 419-431
- Soliday CL, Kolattukudy PE** (1977) Biosynthesis of Cutin ω -Hydroxylation of Fatty Acids by a Microsomal Preparation from Germinating *Vicia faba*. *Plant Physiology* **59**: 1116-1121
- Steudle E, Peterson CA** (1998) How does water get through roots? *Journal of Experimental Botany* **49**: 775-788
- Tijet N, Helvig C, Pinot F, LeBouquin R, Lesot A, Durst F, Salaün JP, Benveniste I** (1998) Functional expression in yeast and characterization of a clofibrate-inducible plant cytochrome P-450 (CYP94A1) involved in cutin monomers synthesis. *The Biochemical Journal* **583** - 589
- Tissier AF, Marillonnet S, Klimyuk V, Patel K, Torres MA, Murphy G, Jones JDG** (1999) Multiple Independent Defective *Suppressor-mutator* Transposon Insertions in *Arabidopsis*: A Tool for Functional Genomics. *Plant Cell* **11**: 1841-1852

- Tocquin P, Corbesier L, Havelange A, Pieltain A, Kurtem E, Bernier G, Périlleux C** (2003) A novel high efficiency, low maintenance, hydroponic system for synchronous growth and flowering of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* **3**: 2
- Todd J, Post-Beittenmiller D, Jaworski Jan G** (1999) *KCS1* encodes a fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase affecting wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **17**: 119-130
- Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK** (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. (vol 45, pg 523, 2006). *Plant Journal* **46**: 1092-1092
- Walton TJ** (1990) Waxes, cutin and suberin. *In* J Harwood, J Boyer, eds, *Methods in Plant Biochemistry*, Vol 4. Academic Press, New York, pp 106-158
- Wan Y-L, Eisinger W, Ehrhardt D, Kubitscheck U, Baluska F, Briggs W** (2008) The Subcellular Localization and Blue-Light-Induced Movement of Phototropin 1-GFP in Etiolated Seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* **1**: 103-117
- 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
- Werck-Reichhart D, Bak S, Paquette S** (2002) Cytochromes P450. *In* *The Arabidopsis Book*. The American Society of Plant Biologists, pp 1-28
- Werck-Reichhart D, Feyereisen R** (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology* **1**: 3003.3001 - 3003.3009
- Whitbred JM, Schuler MA** (2000) Molecular Characterization of CYP73A9 and CYP82A1 P450 Genes Involved in Plant Defense in Pea. *Plant Physiology* **124**: 47-58
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ** (2007) An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS ONE* **2**: e718

- Xia Y, Nikolau BJ, Schnable PS** (1996) Cloning and Characterization of *CER2*, an *Arabidopsis* Gene That Affects Cuticular Wax Accumulation. *The Plant Cell Online* **8**: 1291-1304
- Xiao F, Mark Goodwin S, Xiao Y, Sun Z, Baker D, Tang X, Jenks MA, Zhou J-M** (2004) *Arabidopsis* CYP86A2 represses *Pseudomonas syringae* type III genes and is required for cuticle development. *EMBO J* **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 Online* **11**: 2187-2202
- Zheng Z, Xia Q, Dauk M, Shen W, Selvaraj G, Zou J** (2003) *Arabidopsis* AtGPAT1, a Member of the Membrane-Bound Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase Gene Family, Is Essential for Tapetum Differentiation and Male Fertility. *The Plant Cell Online* **15**: 1872-1887
- Zimmermann HM, Hartmann K, Schreiber L, Steudle E** (2000) Chemical composition of apoplastic transport barriers in relation to radial hydraulic conductivity of corn roots (*Zea mays* L.). *Planta* **210**: 302-311
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W** (2004) GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* Microarray Database and Analysis Toolbox. *Plant Physiology* **136**: 2621-2632

7 Anhang

7.1 Verwendete Lösungen und Medien

Hydrokultur-Nährlösung		Samensterilisationslösung	
2,02 mM	Ca(NO ₃) ₂ * 4 H ₂ O	10,50 ml	Aqua demin.
0,26 mM	NH ₄ H ₂ PO ₄	2,00 ml	12 % NaHClO
10,20 mM	KNO ₃	12,50 ml	100 % Ethanol
0,98 mM	MgSO ₄ * 7 H ₂ O		
0,06 mM	NaOH		
0,04 mM	EDTA		
0,04 mM	FeSO ₄ * 7 H ₂ O		
19,36 µM	H ₃ BO ₃		
4,06 µM	MnCl ₂ * 4 H ₂ O		
0,63 µM	ZnSO ₄ * 7 H ₂ O		
0,42 µM	CuSO ₄ * 5 H ₂ O		
0,28 µM	MoO ₃		
0,17 µM	CoNO ₃ * 2,6 H ₂ O		
0,06 mM	NH ₄ NO ₃		
MS-Agar		CTAB Isolationspuffer	
20,3 mM	NH ₃ NO ₃	2,00 %	Cethylmethan (w/v)
18,8 mM	KNO ₃	1,40 M	NaCl
4,0 mM	CaCl ₂ * 2H ₂ O	20,00 mM	EDTA
3,1 mM	MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,10 µM	Tris HCL, pH 8,0
1,0 mM	KH ₂ PO ₄	0,20 %	Mercaptoethanol (v/v)
0,1 mM	MnSO ₄ * H ₂ O		
0,0 mM	ZnSO ₄ * 7 H ₂ O		
0,1 mM	H ₃ BO ₃		
5,0 µM	KJ		
1,0 µM	Na ₂ MnO ₄ * 2 H ₂ O		
0,1 µM	CaSO ₄ * 5 H ₂ O		
0,2 µM	CaCl ₂ * 6 H ₂ O		
42,8 mM	Saccharose		
0,1 mM	Na ₂ -EDTA		
0,1 mM	FeSO ₄ * 7 H ₂ O		
0,2 mM	Myoinosit		
13,0 µM	Glycin		
2,0 µM	Nicotinamid		
1,0 µM	Vitamin B6		
74,0 nM	Thiamin		
5,7 µM	K ₂ SO ₄		
0,70 %	Agar Agar (w/v)		
	pH = 5,7, Autoklavieren		
		CTAB Waschpuffer	
		67,00 %	Ethanol (v/v)
		10,00 mM	Ammoniumacetat
		TE-Puffer	
		10,00 mM	Tris-HCl (pH = 7,4)
		1,00 mM	EDTA
		RNA Extraktionspuffer	
		1,00 ml	10 M LiCl
		10,00 ml	1 M Tris HCl (pH 8,0)
		2,00 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)
		10,00 ml	Natriumdodecylsulfat 10 % (w/v)
		77,00 ml	H ₂ O
		100,00 ml	Phenol
		6 x Gelladepuffer	
		0,10 %	Bromphenolblau (w/v)
		40,00 %	Saccharose (w/v)

SOC-Medium

20,00 g/l	Trypton
5,00 g/l	Hefeextrakt
0,50 g/l	NaCl
0,50 mM	KCl
	pH = 7, Autoklavieren
5,00 ml	2 M MgCl ₂ (steril)
20,00 ml	1 M Glucose (steril)

LB Medium

10,00 g/l	Trypton
5,00 g/l	Hefeextrakt
5,00 g/l	NaCl
	pH = 7,2; Autoklavieren

LB Agar

	LB Medium
1,00 %	Agar (w/v)
	pH = 7,2; Autoklavieren

Inokulationsmedium

5,00 %	Saccharose (w/v)
0,05 %	Silwet L-77 (v/v)
	in Leitungswasser

Fixierlösung

10,00 mM	Na ₃ PO ₄
137,00 mM	NaCl
2,70 mM	KCl
	pH = 7,4
3,70 %	Formaldehyd (v/v)

Sudan Rot 7B Färbelösung

0,10 %	Sudan Rot 7B (w/v)
in 50 ml	PEG-400 für (1 h bei 90°C gelöst)
50,00 ml	90 % Glycerin (v/v)

Polysaccharid Hydroxylase-Lösung

2,00 %	Cellulase
2,00 %	Pektinase
0,10 M	Zitronensäuremonohydrat
0,10 %	NaN ₃
	pH = 3

Tetrazolium-Rot Färbelösung

1,00 %	2,3,5 Triphenyltetrazolium (w/v)
	in Aqua demin.

7.2 Verwendete Primer

Zielgen	Primer	Sequenz	Verwendung	Hybridisierungstemperatur
At1g01600, CYP86A4	LS420	5'-GGTATTGGCTATGGTTCAAGAGGA-3'	<i>Forward</i> Primer zur Darstellung der organspezifischen Genexpression des Gens At1g01600 (CYP86A4) mittels RT-PCR. Zu benutzen mit LS421. Produktgröße mit Intron: 986Bp, ohne Intron 856Bp	61,01 °C
	LS421	5'-TGTTGGAGAAACGTGCTACTGTAAG-3'	<i>Reverse</i> Primer zur Darstellung der organspezifischen Genexpression des Gens At1g01600 (CYP86A4) mittels RT-PCR. Zu benutzen mit LS420. Produktgröße mit Intron: 986Bp, ohne Intron 856Bp	61,34 °C
At1g01900, CYP94B2	LS424	5'-ATACCCGGTTATCGGATGCTTAATT-3'	<i>Forward</i> Primer zur Darstellung der organspezifischen Genexpression des Gens At1g01900 (CYP94B2) mittels RT-PCR. Zu benutzen mit LS425. Produktgröße: 821Bp	59,70 °C
	LS425	5'-TGATCAACCAAAACAGCCGTGT-3'	<i>Reverse</i> Primer zur Darstellung der organspezifischen Genexpression des Gens At1g01900 (CYP94B2) mittels RT-PCR. Zu benutzen mit LS424. Produktgröße: 821Bp	58,39 °C
At3g26125, CYP86C2	LS426	5'-GGTTGCTTGCAAGCGAAGTTAAC-3'	<i>Forward</i> Primer zur Darstellung der organspezifischen Genexpression des Gens At3g26125 (CYP86C2) mittels RT-PCR. Zu benutzen mit LS427. Produktgröße: 821Bp	62,72 °C
	LS427	5'-GCCTCTTTTGTGACTTTCGATCTGT-3'	<i>Reverse</i> Primer zur Darstellung der organspezifischen Genexpression des Gens At3g26125 (CYP86C2) mittels RT-PCR. Zu benutzen mit LS426. Produktgröße: 821Bp	61,34 °C
At3g56630, CYP94D2	LS428	5'-ATTTGGTTTCAAGTCGTATCCGATC-3'	<i>Forward</i> Primer zur Darstellung der organspezifischen Genexpression des Gens At3g56630 (CYP94D2) mittels RT-PCR. Zu benutzen mit LS429. Produktgröße mit Intron: 905bp, ohne Intron: 845p	59,70 °C
	LS429	5'-ACCAGCTCAAAGCAGAGGAAGTAG-3'	<i>Reverse</i> Primer zur Darstellung der organspezifischen Genexpression des Gens At3g56630 (CYP94D2) mittels RT-PCR. Zu benutzen mit LS428. Produktgröße mit Intron: 905bp, ohne Intron: 845p	62,72 °C
At5g63450, CYP94B1	LS430	5'-CGCATCACCCCTCTAATCCGAC-3'	<i>Forward</i> Primer zur Darstellung der organspezifischen Genexpression des Gens At5g63450 (CYP94B1) mittels RT-PCR. Zu benutzen mit LS431. Produktgröße: 805 Bp	61,78 °C
	LS431	5'-GATTACACTATCCCTCACGGCTTC-3'	<i>Reverse</i> Primer zur Darstellung der organspezifischen Genexpression des Gens At5g63450 (CYP94B1) mittels RT-PCR. Zu benutzen mit LS430. Produktgröße: 805 Bp	62,72 °C
At1g68850, Peroxidase	LS432	5'-GAACAAGCTCGTGATCATCTCCTGG-3'	<i>Forward</i> Primer zur Darstellung der organspezifischen Genexpression des Gens At1g68850 (Peroxidase, POX) mittels RT-PCR. Zu benutzen mit LS433. Produktgröße mit Introns: 1141bp, ohne Introns: 780bp	64,62 °C
	LS433	5'-GGGAAGGATCTTCTTTAACCCCTAG-3'	<i>Reverse</i> Primer zur Darstellung der organspezifischen Genexpression des Gens At1g68850 (Peroxidase, POX) mittels RT-PCR. Zu benutzen mit LS432. Produktgröße mit Introns: 1141bp, ohne Introns: 780bp	62,98 °C
At5g19410, ABC transporter	LS442	5'-TCTGCTCCTCTTCTTTCTTCTT-3'	<i>Forward</i> Primer zur Darstellung der organspezifischen Genexpression des Gens At5g19410 (ABC-Transporter) mittels RT-PCR. Zu benutzen mit LS443. Produktgröße: 813 bp	59,70 °C
	LS443	5'-GGCGAATTCTATAGGATTAGCTGT-3'	<i>Reverse</i> Primer zur Darstellung der organspezifischen Genexpression des Gens At5g19410 (ABC-Transporter) mittels RT-PCR. Zu benutzen mit LS442. Produktgröße: 813 bp	61,34 °C
At5g37690, GDSL Lipase	LS444	5'-GTCATCTCCACCTATGCAACCG-3'	<i>Forward</i> Primer zur Darstellung der organspezifischen Genexpression des Gens At5g37690 (GDSL-Lipase) mittels RT-PCR. Zu benutzen mit LS445. Produktgröße mit Introns: 2309 bp, ohne Introns 875bp	62,12 °C
	LS445	5'-CAACACTTGTGTCCACATTGCAAC-3'	<i>Reverse</i> Primer zur Darstellung der organspezifischen Genexpression des Gens At5g37690 (GDSL-Lipase) mittels RT-PCR. Zu benutzen mit LS444. Produktgröße mit Introns: 2309 bp, ohne Introns 875 bp	61,01 °C
At5g44550, Membranprotein	LS446	5'-ATGGCGGTTTCAAAGCTTACATT-3'	<i>Forward</i> Primer zur Darstellung der organspezifischen Genexpression des Gens At5g44550 (integrales Membranprotein) mittels RT-PCR. Zu benutzen mit LS447. Produktgröße mit Introns: 971 bp, ohne Introns 797 bp	57,08 °C
	LS447	5'-TTAGTTGGACGAGACGAGAGATT-3'	<i>Reverse</i> Primer zur Darstellung der organspezifischen Genexpression des Gens At5g44550 (integrales Membranprotein) mittels RT-PCR. Zu benutzen mit LS446. Produktgröße mit Introns: 971 bp, ohne Introns 797 bp	61,01 °C
At5g14130, Peroxidase	LS476	5'-CCTAGCGTAGAGCTCATCGTTAAGC-3'	<i>Forward</i> Primer zur Darstellung der organspezifischen Genexpression des Gens At5g14130 (Peroxidase) mittels RT-PCR. Zu benutzen mit LS477. Produktgröße mit Introns: 971 bp, ohne Introns 797 bp	64,62 °C
	LS477	5'-CTCATAGCAGAGCTAAAAGCGCTGT-3'	<i>Reverse</i> Primer zur Darstellung der organspezifischen Genexpression des Gens At5g14130 (Peroxidase) mittels RT-PCR. Zu benutzen mit LS476. Produktgröße mit Introns: 971 bp, ohne Introns 797 bp	62,98 °C
At5g15180, Peroxidase	LS478	5'-ATTGCTTGCTCTTCATTTGCTCC-3'	<i>Forward</i> Primer zur Darstellung der organspezifischen Genexpression des Gens At5g15180 (Peroxidase), mittels RT-PCR. Zu benutzen mit LS479. Produktgröße mit Introns: 1306 bp, ohne Introns 654 bp	61,34 °C
	LS479	5'-TGATTTGACTGCGTATCCGTGTC-3'	<i>Forward</i> Primer zur Darstellung der organspezifischen Genexpression des Gens At5g15180 (Peroxidase), mittels RT-PCR. Zu benutzen mit LS478. Produktgröße mit Introns: 1306 bp, ohne Introns 654 bp	62,98 °C

Zielgen	Primer	Sequenz	Verwendung	Hybridisierungstemperatur
At3g18780; <i>Actin2</i>	LS218	5'- GGCTCCTCTTAACCCAAAGG -3'	<i>Forward</i> Primer zur Darstellung der organspezifischen Genexpression des Gens <i>Actin2</i> mittels RT-PCR. Zu benutzen mit LS219. Produktgröße mit Introns: 417 bp, ohne Introns: 393 bp	59,35 °C
	LS219	5'- TTCTCGATGGAAGAGCTGGT -3'	<i>Reverse</i> Primer zur Darstellung der organspezifischen Genexpression des Gens <i>Actin2</i> mittels RT-PCR. Zu benutzen mit LS219. Produktgröße mit Introns: 417 bp, ohne Introns: 393 bp	57,30 °C
At5g08250; <i>CYP86B2</i>	LS329	5'- AGCCAAACACGAAACTTATGC -3'	<i>Forward</i> Primer zur Genotypisierung der Linie SALK_069713.46.35.x (CYP86B2) . Zu verwenden mit LS330 und LS347. Produktgröße WT = 1021 bp, MT = 688 bp	55,92 °C
	LS330	5'- CCTCGTCCGGATTACTTCTTC -3'	<i>Reverse</i> Primer zur Genotypisierung der Linie SALK_069713.46.35.x (CYP86B2) . Zu verwenden mit LS329 und LS347. Produktgröße WT = 1021 bp, MT = 688 bp	59,82 °C
At5g23190; <i>CYP86B1</i>	LS331	5'- TCCATCAGGAAATACGTCGTC -3'	<i>Forward</i> Primer zur Genotypisierung der Linie SM_37066 (cyp86b1-1/ralph-1) . Zu verwenden mit LS332 und LS186. Produktgröße WT = 1030 bp, MT = 474 bp	57,87 °C
	LS332	5'- CCTACTTGCGTGTGGAAGTTC -3'	<i>Reverse</i> Primer zur Genotypisierung der Linie SM_37066 (cyp86b1-1/ralph-1) . Zu verwenden mit LS331 und LS186. Produktgröße WT = 1030 bp, MT = 474 bp	59,82 °C
At5g23190; <i>CYP86B1</i>	LS333	5'- GTCTGCTCACCAATCAAACC -3'	<i>Forward</i> Primer zur Genotypisierung der Linie SALK_130265.41.50 (cyp86b1-2/ralph-2) . Zu verwenden mit LS334 und LS347. Produktgröße WT = 1073 bp, MT = 474 bp	57,87 °C
	LS334	5'- TTGTAGTTTCGCCCTCAAGAG -3'	<i>Reverse</i> Primer zur Genotypisierung der Linie SALK_130265.41.50 (cyp86b1-2/ralph-2) . Zu verwenden mit LS334 und LS347. Produktgröße WT = 1073 bp, MT = 474 bp	57,87 °C
At1g68850; <i>POX</i>	LS498	5'- GTTTCATGCGCTGATCTTCTC -3'	<i>Forward</i> Primer zur Genotypisierung der Linie SALK_053160 (pox/At1g68850) . Zu verwenden mit LS499 und LS347. Produktgröße WT = 1055 bp	57,87 °C
	LS499	5'- AAGTTTTAAACATTCAAGAACCC -3'	<i>Reverse</i> Primer zur Genotypisierung der Linie SALK_053160 (pox/At1g68850) . Zu verwenden mit LS499 und LS347. Produktgröße WT = 1055 bp	55,88 °C
At4g34510; <i>KCS17</i>	LS540	5'- ACTGTCCATGGATGCTAATGG -3'	<i>Forward</i> Primer zur Genotypisierung der Linie GK128C11 (kcs17-1/At4g34510) . Zu verwenden mit LS541 und LS542. Produktgröße WT = 1196 bp	69,52 °C
	LS541	5'- CTAGCTCATCAATCACGGCTC -3'	<i>Reverse</i> Primer zur Genotypisierung der Linie GK128C11 (kcs17-1/At4g34510) . Zu verwenden mit LS540 und LS542. Produktgröße WT = 1196 bp	57,87 °C
T-DNA; GABI-Kat	LS542	5'- ATATTGACCATCATACTCATTGC -3'	Primer o8409 ; insertspezifischer Primer für pAC161-Insertionen (GABI-Kat)	59,82 °C
T-DNA; pBIN/ROK-2 Vektor	LS347	5'- AACACTCAACCCTATCTCGGGC -3'	pBIN/ROK-2 Primer zum Nachweis einer T-DNA Insertion (SALK T-DNA)	62,12 °C
En/Spm 32	LS186	5'- TACGAATAAGAGCGTCCATTTTAGAGTGA -3'	En/Spm32 Transposonspezifischer Primer zum Nachweis einer Transposoninsertion	62,44 °C
At5g23190; <i>CYP86B1</i>	LS356	5'- ggggacaagttgtacaaaaagcaggct TAGTACTTTACTTACTCGGTAGCAC -3'	<i>Forward</i> primer (mit Gateway attB1-Adapter) zur Amplifikation der Promotorregion und der codierenden Sequenz des Gens At5g23190 (CYP86B1/RALPH) für die Klonierung in Gateway-kompatiblen Vektoren . Zu benutzen mit LS371. Produktgröße = 3703 bp	59,70 °C
	LS371	5'- ggggaccactttgtacaagaagctgggt ATTAATATAACCCCTCATCAAAGACTTG -3'	<i>Reverse</i> primer (mit Gateway attB1-Adapter) zur Amplifikation der Promotorregion und der codierenden Sequenz des Gens At5g23190 (CYP86B1/RALPH) für die Klonierung in Gateway-kompatiblen Vektoren . Zu benutzen mit LS356. Produktgröße = 3703 bp	57,80 °C

7.3 Berechnung der Hybridisierungstemperatur verwendeter Primer

Formel 2: Berechnung der Schmelztemperatur von Primern

$$T_M [^{\circ}C] = 69,3 + 41 \left(\frac{\sum G + \sum C}{\sum \text{Basen}} \right) - \left(\frac{650}{\sum \text{Basen}} \right)$$

Mit: T_M = Schmelztemperatur; $\sum G$ = Gesamtzahl der Guaninnukleotide in der Nukleotidsequenz des Primers; $\sum C$ = Gesamtzahl der Cytosinnukleotide in der Nukleotidsequenz des Primers; $\sum \text{Basen}$ = Gesamtzahl der Basen des Primers

Formel 3: Berechnung der Hybridisierungstemperatur von Primern

$$T_A [^{\circ}C] = T_M - 2$$

Mit T_A = Hybridisierungstemperatur; T_M = Schmelztemperatur

7.4 Analytische Daten

Tabelle 9: Absolute Verteilung der kutikulären Wachsmomere der Antheren der *cyp704B2* Mutante und des korrespondierenden Wildtyps in *Oryza sativa* bezogen auf die Antherenoberfläche

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

	Wildtyp		<i>cyp704B2</i>		t-Test $\alpha=0,05$
	MW	STABW	MW	STABW	
	$\mu\text{g}/\text{mm}^2$		$\mu\text{g}/\text{mm}^2$		
Monocarbonsäuren	0,0041	0,0013	0,0022	0,0007	<u>0,0146</u>
Eicosansäure	0,0009	0,0002	0,0013	0,0004	0,0592
Docosansäure	0,0004	0,0001	0,0003	0,0001	0,0801
Tetracosansäure	0,0003	0,0001	0,0001	0,0001	<u>0,0268</u>
Hexacosansäure	0,0026	0,0010	0,0006	0,0002	<u>0,0049</u>
Alkohole	0,0020	0,0002	0,0012	0,0002	<u>0,0004</u>
Hexacosanol	0,0009	0,0001	0,0008	0,0002	0,2858
Octacosanol	0,0011	0,0001	0,0004	0,0000	<u>0,0000</u>
Alkane	0,0679	0,0013	0,0643	0,0026	<u>0,0166</u>
Tricosan	0,0049	0,0004	0,0124	0,0013	<u>0,0000</u>
Pentacosan	0,0165	0,0014	0,0238	0,0018	<u>0,0001</u>
Heptacosan	0,0137	0,0009	0,0111	0,0008	<u>0,0007</u>
Nonacosan	0,0174	0,0007	0,0094	0,0005	<u>0,0000</u>
Hentriacontan	0,0084	0,0005	0,0047	0,0005	<u>0,0000</u>
Tritriacontan	0,0061	0,0006	0,0026	0,0003	<u>0,0000</u>
Pentatriacontan	0,0008	0,0001	0,0004	0,0001	0,0001
Alkene	0,1049	0,0156	0,0649	0,0065	<u>0,0013</u>
Heptacosen	0,0032	0,0005	0,0056	0,0041	0,1249
Nonacosen	0,0564	0,0099	0,0304	0,0054	<u>0,0009</u>
Hentriaconten	0,0340	0,0042	0,0174	0,0018	<u>0,0001</u>
Tritriaconten	0,0039	0,0018	0,0071	0,0008	<u>0,0067</u>
Pentatriaconten	0,0075	0,0006	0,0043	0,0009	<u>0,0002</u>
Gesamtwachs	0,1789	0,0178	0,1326	0,0094	<u>0,0010</u>

Tabelle 10: Relative Verteilung der kutikulären Wachsmomere der Antheren der *cyp704B2* Mutante und des korrespondierenden Wildtyps in *Oryza sativa* bezogen auf die Antherenoberfläche

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

	Wildtyp		<i>cyp704B2</i>		t-Test $\alpha=0,05$
	MW	STABW %	MW	STABW %	
Monocarbonsäuren	2,2810	0,5559	1,6682	0,4237	<u>0,0441</u>
Eicosansäure	0,4789	0,0517	0,9419	0,2882	<u>0,0109</u>
Docosansäure	0,2110	0,0728	0,1990	0,0527	0,3870
Tetracosansäure	0,1423	0,0549	0,0874	0,0370	0,0531
Hexacosansäure	1,4489	0,4524	0,4399	0,0958	<u>0,0033</u>
Alkohole	1,0972	0,0635	0,9004	0,1373	<u>0,0145</u>
Hexacosanol	0,4928	0,0332	0,6160	0,1435	0,0640
Octacosanol	0,6044	0,0401	0,2844	0,0265	<u>0,0000</u>
Alkane	38,1905	3,1771	48,5740	2,0441	<u>0,0003</u>
Tricosan	2,7376	0,2650	9,3305	0,3756	<u>0,0000</u>
Pentacosan	9,2565	0,5217	17,9308	0,9827	<u>0,0000</u>
Heptacosan	7,7026	0,4557	8,3860	0,4709	<u>0,0240</u>
Nonacosan	9,8393	1,1642	7,1427	0,7909	<u>0,0018</u>
Hentriacontan	4,7677	0,7003	3,5480	0,6087	<u>0,0096</u>
Tritriacontan	3,4618	0,6025	1,9548	0,3052	<u>0,0013</u>
Pentatriacontan	0,4251	0,0840	0,2812	0,0979	<u>0,0190</u>
Alkene	58,4312	2,8872	48,8574	1,7132	<u>0,0003</u>
Heptacosen	1,7629	0,1624	4,2113	2,9968	0,0709
Nonacosen	31,3369	2,3794	22,8479	3,1413	<u>0,0008</u>
Hentriaconten	18,9884	0,5784	13,1271	0,5526	<u>0,0000</u>
Tritriaconten	2,1272	0,7970	5,3792	0,6819	<u>0,0001</u>
Pentatriaconten	4,2158	0,6210	3,2920	0,8601	<u>0,0455</u>

Tabelle 11: Absolute Verteilung der Kutinmonomere der Antheren der *cyp704B2* Mutante und des korrespondierenden Wildtyps in *Oryza sativa* bezogen auf die Antherenoberfläche

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

	Wildtyp		<i>cyp704B2</i>		t-Test $\alpha=0,05$
	MW $\mu\text{g}/\text{mm}^2$	STABW $\mu\text{g}/\text{mm}^2$	MW $\mu\text{g}/\text{mm}^2$	STABW $\mu\text{g}/\text{mm}^2$	
Monocarbonsäuren	0,153	0,019	0,027	0,007	<u>1,46E-05</u>
Hexdecansäure	0,097	0,013	0,015	0,003	<u>4,29E-05</u>
Octadecen-/Octadecatriensäure	0,019	0,003	0,003	0,001	<u>2,04E-05</u>
Octadecadiensäure	0,020	0,004	0,008	0,002	<u>5,40E-04</u>
Octadecansäure	0,009	0,001	0,000	0,000	<u>2,39E-05</u>
Docosansäure	0,003	0,001	0,000	0,000	<u>3,73E-05</u>
Tetracosansäure	0,004	0,002	0,001	0,000	<u>6,45E-03</u>
ω-Hydroxysäuren	0,219	0,012	0,010	0,002	<u>7,77E-07</u>
ω -Hydroxyhexadecansäure	0,033	0,002	0,002	0,001	<u>1,23E-06</u>
ω -Hydroxyoctadecansäure	0,185	0,010	0,008	0,002	<u>7,18E-07</u>
α,ω-Dicarbonsäuren	0,008	0,001	0,000	0,000	<u>2,15E-08</u>
Hexadecandicarbonsäure	0,001	0,000	0,000	0,000	<u>7,17E-04</u>
Octadecendicarbonsäure	0,007	0,000	0,000	0,000	<u>1,00E-09</u>
Poly-Hydroxy-/Epoxy-Hydroxysäuren	0,100	0,016	0,006	0,001	<u>1,04E-04</u>
10,16-Dihydroxyhexadecansäure	0,027	0,012	0,004	0,002	<u>6,43E-03</u>
9/10,18-Dihydroxyoctadecansäure	0,009	0,001	0,000	0,000	<u>5,55E-05</u>
9,10-epoxy-18-hydroxyoctadecansäure	0,064	0,019	0,002	0,001	<u>8,54E-04</u>
Unidentifizierte Reis Kutin Monomere	0,344	0,013	0,015	0,003	<u>6,11E-08</u>
URCM-1	0,103	0,005	0,004	0,002	<u>1,80E-08</u>
URCM-2	0,145	0,009	0,008	0,001	<u>1,03E-06</u>
URCM-3	0,096	0,003	0,004	0,001	<u>1,73E-08</u>
Gesamtkutin	0,823	0,020	0,059	0,012	<u>4,57E-11</u>

Tabelle 12: Relative Verteilung der Kutinmonomere der Antheren der *cyp704B2* Mutante und des korrespondierenden Wildtyps in *Oryza sativa* bezogen auf die Antherenoberfläche

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

	Wildtyp		<i>cyp704B2</i>		t-Test $\alpha=0,05$
	MW	STABW %	MW	STABW %	
Monocarbonsäuren	18,608	2,672	46,481	3,615	<u>7,61E-07</u>
Hexdecansäure	11,767	1,810	25,326	1,037	<u>2,01E-06</u>
Octadecen-/Octadecatriensäure	2,370	0,393	5,276	1,145	<u>1,58E-03</u>
Octadecadiensäure	2,459	0,536	13,912	2,429	<u>1,54E-04</u>
Octadecansäure	1,149	0,183	0,795	0,534	1,10E-01
Docosansäure	0,380	0,077	0,212	0,473	2,37E-01
Tetracosansäure	0,483	0,222	0,961	0,160	<u>2,74E-03</u>
ω-Hydroxysäuren	26,544	1,096	16,469	1,393	<u>1,10E-06</u>
ω -Hydroxyhexadecansäure	4,053	0,225	2,535	0,521	<u>6,99E-04</u>
ω -Hydroxyoctadecensäure	22,491	0,898	13,933	1,403	<u>5,25E-06</u>
α,ω-Dicarbonsäuren	0,992	0,079	0,462	0,430	<u>2,50E-02</u>
Hexadecandicarbonsäure	0,145	0,048	0,242	0,336	2,79E-01
Octadecendicarbonsäure	0,847	0,045	0,220	0,262	<u>2,66E-03</u>
Poly-Hydroxy-/Epoxy-Hydroxysäuren	12,109	1,687	10,556	2,650	<u>1,53E-01</u>
10,16-Dihydroxyhexadecansäure	3,264	1,460	7,232	3,268	<u>2,56E-02</u>
9/10,18-Dihydroxyoctadecansäure	1,051	0,145	0,478	0,441	<u>2,06E-02</u>
9,10-epoxy-18-hydroxyoctadecensäure	7,793	2,183	2,845	1,480	<u>2,01E-03</u>
Unidentifizierte Reis Kutin Monomere	41,747	0,937	26,033	2,913	<u>5,52E-05</u>
URCM-1	12,474	0,339	6,898	3,474	<u>1,13E-02</u>
URCM-2	17,643	0,683	13,036	1,259	<u>1,61E-04</u>
URCM-3	11,630	0,560	6,099	0,856	<u>3,42E-06</u>

Tabelle 13: Absolute Verteilung der Wurzelsuberinmonomere der Linien *cyp86B1-2/ralph-2*, *cyp86B1-3/ralph-3* und *cyp86B1-4/ralph-4* und des korrespondierenden Wildtyps in *Arabidopsis thaliana* bezogen auf das Trockengewicht der Wurzel

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen.

	Wildtyp		<i>ralph-2</i>		t-Test $\alpha=0,05$	<i>ralph-3</i>		t-Test $\alpha=0,05$	<i>ralph-4</i>		t-Test $\alpha=0,05$
	MW	STABW	MW	STABW		MW	STABW		MW	STABW	
	$\mu\text{g}/\text{mg}$		$\mu\text{g}/\text{mg}$			$\mu\text{g}/\text{mg}$			$\mu\text{g}/\text{mg}$		
Monocarbonsäuren	1,533	0,131	2,876	0,210	<u>0,001</u>	1,733	0,446	0,262	1,913	0,356	0,098
Hexadecansäure	0,172	0,047	0,207	0,018	0,166	0,091	0,042	<u>0,047</u>	0,149	0,045	0,285
Eiscosansäure	0,314	0,043	0,567	0,023	<u>0,001</u>	0,362	0,088	0,230	0,382	0,063	0,101
Docosansäure	0,962	0,105	1,982	0,198	<u>0,002</u>	1,187	0,291	0,156	1,198	0,214	0,094
Tetracosansäure	0,085	0,016	0,121	0,022	<u>0,045</u>	0,093	0,028	0,350	0,184	0,040	<u>0,018</u>
primäre Alkohole	0,614	0,050	0,773	0,080	<u>0,027</u>	0,577	0,061	0,234	0,752	0,152	0,126
Octacosanol	0,329	0,027	0,466	0,062	<u>0,023</u>	0,214	0,138	0,142	0,348	0,047	0,298
Eicosanol	0,097	0,014	0,124	0,011	<u>0,032</u>	0,124	0,030	0,130	0,110	0,018	0,193
Docosanol	0,187	0,011	0,183	0,022	0,394	0,239	0,055	0,121	0,294	0,088	0,084
ω-Hydroxysäuren	6,073	0,696	6,718	0,522	0,137	5,996	0,807	0,454	5,005	0,779	0,076
ω -Hydroxyhexadecansäure	0,908	0,091	1,099	0,080	<u>0,027</u>	0,892	0,127	0,435	0,724	0,089	<u>0,034</u>
ω -Hydroxyoctadecansäure	3,612	0,423	4,757	0,357	<u>0,012</u>	3,859	0,554	0,287	3,154	0,366	0,115
ω -Hydroxyoctadecansäure	0,215	0,013	0,114	0,143	<u>0,001</u>	0,203	0,045	0,341	0,171	0,041	0,098
ω -Hydroxyeicosansäure	0,366	0,042	0,204	0,229	<u>0,031</u>	0,348	0,042	0,315	0,336	0,119	0,356
ω -Hydroxydocosansäure	0,923	0,133	0,528	0,559	<u>0,002</u>	0,664	0,235	0,095	0,563	0,108	<u>0,012</u>
ω -Hydroxytetracosansäure	0,049	0,006	0,028	0,030	<u>0,003</u>	0,031	0,008	<u>0,018</u>	0,058	0,071	0,427
α,ω-Dicarbonsäuren	2,768	0,367	3,962	0,158	<u>0,009</u>	2,809	0,473	0,456	2,415	0,417	0,167
Hexadecandicarbonsäure	0,816	0,078	1,176	0,054	<u>0,002</u>	0,776	0,150	0,355	0,633	0,087	<u>0,027</u>
Octadecendicarbonsäure	1,420	0,180	2,077	0,084	<u>0,006</u>	1,477	0,249	0,382	1,258	0,185	0,168
Octadecandicarbonsäure	0,299	0,042	0,606	0,045	<u>0,001</u>	0,363	0,092	0,181	0,314	0,085	0,404
Eicosandicarbonsäure	0,109	0,057	0,085	0,011	0,274	0,111	0,034	0,475	0,127	0,031	0,325
Docosandicarbonsäure	0,124	0,017	0,019	0,031	<u>0,007</u>	0,081	0,035	0,081	0,083	0,034	0,085
Gesamtsuberin	10,987	1,234	14,329	0,942	<u>0,011</u>	11,115	1,560	0,458	10,086	1,667	0,248

Tabelle 14: Relative Verteilung der Wurzelsuberinmonomere der Linien *cyp86B1-2/ralph-2*, *cyp86B1-3/ralph-3* und *cyp86B1-4/ralph-4* und des korrespondierenden Wildtyps in *Arabidopsis thaliana*

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen

	Wildtyp		<i>ralph-2</i>			<i>ralph-3</i>			<i>ralph-4</i>		
	MW	STABW %	MW	STABW %	t-Test $\alpha=0,05$	MW	STABW %	t-Test $\alpha=0,05$	MW	STABW %	t-Test $\alpha=0,05$
Monocarbonsäuren	13,981	0,520	20,066	0,168	<u>0,001</u>	15,502	2,441	0,197	18,930	0,406	<u>0,000</u>
Hexadecansäure	1,584	0,521	1,444	0,096	0,344	0,799	0,274	0,051	1,455	0,211	0,360
Eiscosansäure	2,849	0,089	3,961	0,136	<u>0,000</u>	3,240	0,493	0,151	3,796	0,225	<u>0,005</u>
Docosansäure	8,759	0,030	13,812	0,477	<u>0,001</u>	10,636	1,626	0,092	11,865	0,259	<u>0,001</u>
Tetracosansäure	0,789	0,217	0,849	0,198	0,370	0,827	0,155	0,409	1,814	0,093	<u>0,003</u>
primäre Alkohole	5,601	0,234	5,389	0,289	0,191	5,292	1,121	0,342	7,445	0,640	<u>0,013</u>
Octacosanol	3,004	0,111	3,244	0,271	0,131	2,047	1,445	0,185	3,467	0,277	<u>0,043</u>
Eicosanol	0,880	0,031	0,868	0,084	0,415	1,104	0,123	<u>0,040</u>	1,090	0,019	<u>0,001</u>
Docosanol	1,716	0,149	1,278	0,105	<u>0,009</u>	2,141	0,260	<u>0,043</u>	2,888	0,467	<u>0,019</u>
ω-Hydroxysäuren	55,260	0,482	46,860	0,578	<u>0,000</u>	54,003	2,229	0,216	49,686	0,747	<u>0,000</u>
ω -Hydroxyhexadecansäure	8,271	0,104	7,670	0,127	<u>0,002</u>	8,025	0,028	<u>0,023</u>	7,215	0,343	<u>0,013</u>
ω -Hydroxyoctadecansäure	32,864	0,289	33,184	0,334	0,139	34,708	0,356	<u>0,001</u>	31,446	1,697	0,142
ω -Hydroxyoctadecansäure	1,967	0,144	2,516	0,149	<u>0,005</u>	1,812	0,186	0,160	1,694	0,284	0,117
ω -Hydroxyeicosansäure	3,328	0,079	3,181	0,104	0,064	3,135	0,063	<u>0,016</u>	3,263	0,609	0,436
ω -Hydroxydocosansäure	8,380	0,277	0,309	0,287	<u>0,000</u>	6,050	2,122	0,098	5,562	0,222	<u>0,000</u>
ω -Hydroxytetracosansäure	0,450	0,086	0,000	0,000	<u>0,006</u>	0,273	0,034	<u>0,027</u>	0,506	0,592	0,443
α,ω-Dicarbonsäuren	25,158	0,548	27,568	1,173	<u>0,026</u>	25,203	0,776	0,469	23,938	1,342	<u>0,126</u>
Hexadecandicarbonsäure	7,440	0,165	8,225	0,587	0,069	6,953	0,440	0,093	6,303	0,426	<u>0,015</u>
Octadecandicarbonsäure	12,914	0,255	14,510	0,369	<u>0,003</u>	13,257	0,414	0,151	12,504	0,795	0,235
Octadecandicarbonsäure	2,718	0,087	4,230	0,243	<u>0,002</u>	3,239	0,457	0,092	3,075	0,346	0,106
Eicosandicarbonsäure	0,962	0,395	0,597	0,116	0,123	1,020	0,345	0,429	1,251	0,103	0,166
Docosandicarbonsäure	1,124	0,056	0,005	0,005	<u>0,000</u>	0,735	0,293	0,072	0,806	0,227	0,064

Tabelle 15: Absolute Verteilung der Monomere des Samenschalenpolyesters der Linien *cyp86B1-1/ralph-1*, *cyp86B1-2/ralph-2*, *cyp86B1-3/ralph-3*, *cyp86B1-4/ralph-4* und des korrespondierenden Wildtyps in *Arabidopsis thaliana* bezogen auf das Trockengewicht der Samenschalen

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen

	Wildtyp		<i>ralph-1</i>		t-Test $\alpha=0,05$	<i>ralph-2</i>		t-Test $\alpha=0,05$	<i>ralph-3</i>		t-Test $\alpha=0,05$	<i>ralph-4</i>		t-Test $\alpha=0,05$
	MW $\mu\text{g}/\text{mg}$	STABW $\mu\text{g}/\text{mg}$	MW $\mu\text{g}/\text{mg}$	STABW $\mu\text{g}/\text{mg}$										
Monocarbonsäuren	0,292	0,085	1,484	0,119	<u>0,000</u>	1,294	0,192	<u>0,000</u>	0,589	0,061	<u>0,001</u>	0,754	0,103	<u>0,000</u>
Eiscosansäure	0,091	0,037	0,110	0,012	0,188	0,135	0,056	0,123	0,070	0,021	0,187	0,098	0,050	0,412
Docosansäure	0,059	0,014	0,230	0,012	<u>0,000</u>	0,241	0,028	<u>0,000</u>	0,110	0,010	<u>0,001</u>	0,131	0,019	<u>0,001</u>
Tetracosansäure	0,142	0,035	1,144	0,097	<u>0,000</u>	0,919	0,108	<u>0,000</u>	0,410	0,045	<u>0,000</u>	0,524	0,036	<u>0,000</u>
primäre Alkohole	0,353	0,174	0,472	0,047	0,133	0,527	0,056	0,068	0,583	0,049	<u>0,036</u>	0,663	0,045	<u>0,017</u>
Octacosanol	0,042	0,014	0,051	0,013	0,186	0,059	0,005	<u>0,046</u>	0,064	0,013	<u>0,035</u>	0,061	0,007	<u>0,035</u>
Eicosanol	0,214	0,101	0,260	0,017	0,215	0,289	0,047	0,123	0,326	0,023	0,055	0,371	0,040	<u>0,023</u>
Docosanol	0,097	0,068	0,161	0,020	0,079	0,179	0,022	<u>0,045</u>	0,193	0,033	<u>0,030</u>	0,231	0,023	<u>0,012</u>
ω-Hydroxysäuren	0,808	0,359	0,294	0,064	<u>0,031</u>	0,375	0,164	<u>0,045</u>	0,690	0,173	<u>0,291</u>	0,835	0,268	<u>0,456</u>
ω -Hydroxyhexadecansäure	0,211	0,112	0,184	0,067	0,348	0,273	0,156	0,274	0,170	0,104	0,302	0,286	0,229	0,293
ω -Hydroxyeicosansäure	0,024	0,009	0,044	0,012	<u>0,020</u>	0,038	0,011	<u>0,041</u>	0,026	0,006	0,334	0,028	0,004	0,212
ω -Hydroxydocosansäure	0,116	0,048	0,018	0,008	<u>0,012</u>	0,023	0,011	<u>0,013</u>	0,139	0,037	0,237	0,142	0,012	0,180
ω -Hydroxytetracosansäure	0,457	0,195	0,047	0,011	<u>0,012</u>	0,041	0,006	<u>0,012</u>	0,355	0,151	0,221	0,378	0,045	0,242
α,ω-Dicarbonsäuren	0,727	0,258	0,148	0,039	<u>0,010</u>	0,167	0,038	<u>0,011</u>	0,498	0,084	<u>0,087</u>	0,383	0,045	<u>0,037</u>
Octadecandicarbonsäure	0,039	0,017	0,086	0,037	<u>0,042</u>	0,103	0,023	<u>0,003</u>	0,078	0,016	<u>0,008</u>	0,096	0,023	<u>0,005</u>
Eicosandicarbonsäure	0,018	0,006	0,013	0,004	0,124	0,025	0,013	0,183	0,020	0,005	0,297	0,020	0,003	0,246
Docosandicarbonsäure	0,110	0,047	0,018	0,004	<u>0,014</u>	0,015	0,003	<u>0,013</u>	0,090	0,014	0,235	0,061	0,004	0,065
Tetracosandicarbonsäure	0,560	0,198	0,031	0,004	<u>0,006</u>	0,024	0,002	<u>0,006</u>	0,310	0,060	<u>0,040</u>	0,206	0,020	<u>0,018</u>
Gesamtsuberin	2,181	0,869	2,397	0,223	0,329	2,364	0,435	0,362	2,361	0,357	0,361	2,634	0,450	0,201

Tabelle 16: Relative Verteilung der Monomere des Samenschalenpolyesters der Linien cyp86B1-1/ralph-1, cyp86B1-2/ralph-2, cyp86B1-3/ralph-3, cyp86B1-4/ralph-4 und des korrespondierenden Wildtyps in Arabidopsis thaliana

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen

	Wildtyp		ralph-1		t-Test $\alpha=0,05$	ralph-2		t-Test $\alpha=0,05$	ralph-3		t-Test $\alpha=0,05$	ralph-4		t-Test $\alpha=0,05$
	MW %	STABW	MW %	STABW										
Monocarbonsäuren	13,945	2,007	61,986	2,298	0,000	55,008	2,180	0,000	25,105	1,321	0,000	28,744	1,052	0,000
Eiscosansäure	4,163	0,314	4,597	0,126	<u>0,032</u>	5,528	1,311	0,063	2,972	0,871	<u>0,033</u>	3,561	1,306	0,215
Docosansäure	2,890	0,672	9,611	0,457	<u>0,000</u>	10,290	0,740	<u>0,000</u>	4,679	0,359	<u>0,003</u>	5,009	0,152	<u>0,003</u>
Tetracosansäure	6,891	1,397	47,778	2,097	<u>0,000</u>	39,190	2,450	<u>0,000</u>	17,454	0,858	<u>0,000</u>	20,173	2,181	<u>0,000</u>
primäre Alkohole	15,691	1,804	19,702	0,941	0,007	22,581	2,329	0,002	24,889	1,813	0,000	25,550	3,212	0,002
Octacosanol	1,976	0,315	2,124	0,400	0,292	2,558	0,435	<u>0,039</u>	2,685	0,268	<u>0,007</u>	2,351	0,327	0,075
Eicosanol	9,591	1,296	10,876	0,466	0,070	12,361	1,979	<u>0,032</u>	14,011	1,835	<u>0,005</u>	14,339	2,482	<u>0,011</u>
Docosanol	4,123	1,928	6,703	0,464	<u>0,036</u>	7,663	0,688	<u>0,014</u>	8,193	0,721	<u>0,009</u>	8,859	0,766	<u>0,005</u>
ω-Hydroxysäuren	36,453	3,781	12,179	1,871	0,000	15,335	3,949	0,000	28,909	3,196	0,012	31,068	4,911	0,068
ω -Hydroxyhexadecansäure	9,268	2,490	7,629	2,458	0,192	10,963	4,354	0,265	7,231	4,428	0,231	9,995	6,958	0,427
ω -Hydroxyeicosansäure	1,127	0,359	1,834	0,395	<u>0,019</u>	1,608	0,139	<u>0,034</u>	1,121	0,204	0,489	1,101	0,271	0,456
ω -Hydroxydocosansäure	5,283	0,381	0,751	0,272	<u>0,000</u>	0,997	0,532	<u>0,000</u>	5,846	0,794	0,133	5,453	0,503	0,306
ω -Hydroxytetracosansäure	20,775	0,940	1,965	0,395	<u>0,000</u>	1,766	0,387	<u>0,000</u>	14,711	4,055	<u>0,027</u>	14,519	1,846	<u>0,001</u>
α,ω-Dicarbonsäuren	33,912	2,609	6,133	1,407	0,000	7,076	0,992	0,000	21,096	1,311	0,000	14,639	0,840	0,000
Octadecandicarbonsäure	1,853	0,634	3,561	1,418	<u>0,045</u>	4,354	0,393	<u>0,001</u>	3,313	0,414	<u>0,006</u>	3,594	0,276	<u>0,003</u>
Eicosandicarbonsäure	0,833	0,154	0,533	0,112	<u>0,011</u>	1,027	0,478	0,243	0,843	0,199	0,470	0,779	0,177	0,332
Docosandicarbonsäure	4,999	0,642	0,758	0,191	<u>0,000</u>	0,631	0,084	<u>0,000</u>	3,849	0,524	<u>0,017</u>	2,371	0,296	<u>0,001</u>
Tetracosandicarbonsäure	26,227	3,086	1,281	0,171	<u>0,000</u>	1,064	0,239	<u>0,000</u>	13,092	1,106	<u>0,001</u>	7,895	0,729	<u>0,000</u>

Tabelle 17: Absolute Verteilung der Wurzelsuberinmonomere der Linie *pox* und des korrespondierenden Wildtyps in *Arabidopsis thaliana* bezogen auf das Trockengewicht der Wurzel

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen

	Wildtyp		<i>pox</i>		t-Test $\alpha=0,05$
	MW	STABW	MW	STABW	
	$\mu\text{g}/\text{mg}$		$\mu\text{g}/\text{mg}$		
Aromaten	0,888	0,080	1,258	0,064	<u>0,002</u>
<i>cis</i> -Ferulasäure	0,136	0,038	0,345	0,043	<u>0,002</u>
<i>trans</i> -Ferulasäure	0,752	0,043	0,913	0,022	<u>0,005</u>
Monocarbonsäuren	2,237	0,007	2,112	0,094	0,073
Hexadecansäure	0,115	0,035	0,165	0,017	0,058
Octadecadiensäure	0,175	0,013	0,192	0,024	0,189
Octadecansäure	0,064	0,002	0,067	0,006	0,218
Eiscosansäure	0,326	0,011	0,300	0,033	0,152
Docosansäure	1,210	0,035	1,066	0,079	<u>0,034</u>
Tricosansäure	0,061	0,003	0,056	0,001	<u>0,037</u>
Tetracosansäure	0,286	0,003	0,266	0,004	<u>0,001</u>
primäre Alkohole	0,955	0,042	0,779	0,105	<u>0,042</u>
Octacosanol	0,367	0,010	0,297	0,038	<u>0,038</u>
Eicosanol	0,303	0,019	0,252	0,039	0,067
Docosanol	0,285	0,016	0,230	0,029	<u>0,030</u>
ω-Hydroxysäuren	6,219	0,095	6,429	0,472	0,262
ω -Hydroxyhexadecansäure	0,829	0,035	0,825	0,093	0,477
ω -Hydroxyoctadecensäure	2,819	0,061	3,032	0,219	0,114
ω -Hydroxyoctadecadiensäure	0,270	0,011	0,382	0,019	<u>0,001</u>
ω -Hydroxyoctadecatriensäure	0,056	0,008	0,094	0,001	<u>0,006</u>
ω -Hydroxyoctadecansäure	0,274	0,009	0,301	0,018	<u>0,050</u>
ω -Hydroxyeicosansäure	0,412	0,001	0,403	0,041	0,371
ω -Hydroxydocosansäure	1,394	0,015	1,254	0,091	0,056
ω -Hydroxytetracosansäure	0,165	0,012	0,137	0,016	<u>0,035</u>
α,ω-Dicarbonsäuren	3,026	0,054	3,027	0,211	0,498
Hexadecandicarbonsäure	0,803	0,031	0,786	0,082	0,381
Octadecendicarbonsäure	1,469	0,015	1,544	0,070	0,100
Octadecandicarbonsäure	0,374	0,007	0,357	0,033	0,233
Eicosandicarbonsäure	0,164	0,002	0,151	0,018	0,171
Docosandicarbonsäure	0,215	0,004	0,188	0,013	0,031
Gesamtsuberin	13,326	0,154	13,604	0,837	0,313

Tabelle 18: Relative Verteilung der Wurzelsuberinmonomere der Linie *pox* und des korrespondierenden Wildtyps in *Arabidopsis thaliana*

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen

	Wildtyp		<i>pox</i>		t-Test $\alpha=0,05$
	MW	STABW %	MW	STABW %	
Aromaten	6,667	0,604	9,281	0,928	0,010
<i>cis</i> -Ferulasäure	1,021	0,283	2,548	0,425	<u>0,005</u>
<i>trans</i> -Ferulasäure	5,646	0,323	6,733	0,541	<u>0,026</u>
Monocarbonsäuren	16,792	0,230	15,532	0,284	0,002
Hexadecansäure	0,866	0,273	1,214	0,074	0,075
Octadecadiensäure	1,318	0,112	1,419	0,255	0,289
Octadecansäure	0,477	0,016	0,493	0,069	0,362
Eiscosansäure	2,446	0,067	2,199	0,107	<u>0,018</u>
Docosansäure	9,082	0,162	7,831	0,139	<u>0,000</u>
Tricosansäure	0,458	0,020	0,416	0,028	0,054
Tetracosansäure	2,146	0,040	1,960	0,142	0,072
primäre Alkohole	7,167	0,239	5,710	0,407	0,005
Octacosanol	2,753	0,045	2,177	0,140	<u>0,006</u>
Eicosanol	2,276	0,120	1,849	0,167	<u>0,013</u>
Docosanol	2,138	0,101	1,684	0,109	<u>0,003</u>
ω-Hydroxysäuren	46,666	0,418	47,235	0,607	0,130
ω -Hydroxyhexadecansäure	6,220	0,196	6,056	0,339	0,259
ω -Hydroxyoctadecensäure	21,155	0,374	22,279	0,255	<u>0,008</u>
ω -Hydroxyoctadecadiensäure	2,025	0,105	2,812	0,041	<u>0,001</u>
ω -Hydroxyoctadecatriensäure	0,417	0,065	0,696	0,042	<u>0,003</u>
ω -Hydroxyoctadecansäure	2,054	0,048	2,213	0,152	0,102
ω -Hydroxyeicosansäure	3,094	0,042	2,959	0,128	0,101
ω -Hydroxydocosansäure	10,464	0,013	9,217	0,281	<u>0,008</u>
ω -Hydroxytetracosansäure	1,238	0,084	1,002	0,057	<u>0,010</u>
α,ω-Dicarbonsäuren	22,708	0,281	22,242	0,332	0,069
Hexadecandicarbonsäure	6,026	0,185	5,769	0,238	0,109
Octadecandicarbonsäure	11,028	0,129	11,360	0,215	<u>0,049</u>
Octadecandicarbonsäure	2,804	0,043	2,618	0,097	<u>0,032</u>
Eicosandicarbonsäure	1,233	0,011	1,111	0,079	0,056
Docosandicarbonsäure	1,617	0,022	1,383	0,075	<u>0,013</u>

Tabelle 19: Absolute Verteilung der Monomere des Samenschalenpolyesters der Linie *pox* und des korrespondierenden Wildtyps in *Arabidopsis thaliana* bezogen auf das Trockengewicht der Samenschale

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen

	Wildtyp		<i>pox</i>		t-Test $\alpha=0,05$
	MW $\mu\text{g}/\text{mg}$	STABW $\mu\text{g}/\text{mg}$	MW $\mu\text{g}/\text{mg}$	STABW $\mu\text{g}/\text{mg}$	
Aromaten	0,650	0,083	1,243	0,063	<u>0,000</u>
<i>cis</i> -Ferulasäure	0,113	0,034	0,268	0,017	<u>0,000</u>
<i>trans</i> -Ferulasäure	0,537	0,070	0,975	0,064	<u>0,000</u>
Monocarbonsäuren	0,955	0,211	1,333	0,229	<u>0,026</u>
Octadecansäure	0,079	0,024	0,150	0,049	<u>0,027</u>
Octadecensäure	0,372	0,131	0,425	0,086	0,260
Eiscosansäure	0,081	0,011	0,153	0,034	<u>0,010</u>
Eiscosensäure	0,037	0,013	0,080	0,040	0,057
Eicosadiensäure	0,127	0,033	0,238	0,061	<u>0,014</u>
Docosansäure	0,090	0,015	0,090	0,020	0,484
Tetracosansäure	0,169	0,021	0,197	0,023	0,061
primäre Alkohole	0,548	0,049	0,689	0,120	<u>0,048</u>
Octacosanol	0,075	0,008	0,099	0,015	<u>0,020</u>
Eicosanol	0,276	0,052	0,374	0,097	0,070
Docosanol	0,197	0,019	0,216	0,028	0,151
ω-Hydroxysäuren	1,562	0,190	2,410	0,489	<u>0,017</u>
ω -Hydroxyhexadecansäure	0,176	0,058	0,705	0,029	<u>0,000</u>
ω -Hydroxyoctadecensäure	0,113	0,018	0,193	0,039	<u>0,009</u>
ω -Hydroxyeicosansäure	0,038	0,008	0,062	0,016	<u>0,025</u>
ω -Hydroxyeicosensäure	0,030	0,018	0,022	0,007	0,237
ω -Hydroxydocosansäure	0,222	0,029	0,310	0,049	<u>0,014</u>
ω -Hydroxytetracosansäure	0,984	0,119	1,294	0,231	<u>0,034</u>
α,ω-Dicarbonsäuren	1,180	0,091	1,362	0,288	<u>0,150</u>
Hexadecandicarbonsäure	0,059	0,013	0,073	0,014	0,105
Octadecendicarbonsäure	0,201	0,006	0,271	0,052	<u>0,037</u>
Docosandicarbonsäure	0,158	0,019	0,169	0,056	0,367
Tetracosandicarbonsäure	0,761	0,083	0,850	0,176	0,205
Poly-Hydroxysäuren	0,469	0,222	0,390	0,144	<u>0,287</u>
10,16-Dihydroxyhexadecansäure	0,105	0,026	0,073	0,022	0,061
9,10,18-Trihydroxyoctadecansäure	0,365	0,209	0,317	0,151	0,362
Gesamtsuberin	5,364	0,631	7,426	1,125	<u>0,013</u>

Tabelle 20: Relative Verteilung der Monomere des Samenschalenpolyesters der Linie *pox* und des korrespondierenden Wildtyps in *Arabidopsis thaliana*

Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen

	Wildtyp		<i>pox</i>		t-Test $\alpha=0,05$
	MW	STABW %	MW	STABW %	
Aromaten	12,127	0,935	16,914	1,613	0,002
<i>cis</i> -Ferulasäure	2,111	0,585	3,665	0,603	<u>0,005</u>
<i>trans</i> -Ferulasäure	10,016	0,727	13,249	1,036	<u>0,002</u>
Monocarbonsäuren	17,658	2,200	17,965	2,054	0,423
Octadecansäure	1,458	0,343	2,005	0,588	0,086
Octadecensäure	6,794	1,839	5,751	1,084	0,187
Eicosansäure	1,517	0,063	2,052	0,339	<u>0,024</u>
Eicosensäure	0,678	0,163	1,085	0,572	0,126
Eicosadiensäure	2,345	0,487	3,203	0,695	<u>0,048</u>
Docosansäure	1,697	0,311	1,205	0,165	<u>0,021</u>
Tetracosansäure	3,169	0,389	2,664	0,133	<u>0,038</u>
primäre Alkohole	10,290	1,112	9,314	1,401	0,160
Octacosanol	1,406	0,123	1,331	0,116	0,206
Eicosanol	5,196	1,065	5,065	1,344	0,442
Docosanol	3,688	0,320	2,918	0,094	<u>0,007</u>
ω-Hydroxysäuren	29,206	2,874	32,318	2,998	0,092
ω -Hydroxyhexadecansäure	3,220	0,701	6,996	4,830	0,108
ω -Hydroxyoctadecensäure	2,120	0,396	2,593	0,323	0,058
ω -Hydroxyeicosansäure	0,711	0,125	0,840	0,192	0,155
ω -Hydroxyeicosensäure	0,567	0,356	0,309	0,121	0,125
ω -Hydroxydocosansäure	4,166	0,694	4,173	0,247	0,493
ω -Hydroxytetracosansäure	18,423	2,230	17,407	1,174	0,230
α,ω-Dicarbonsäuren	22,097	1,544	18,340	2,724	0,032
Hexadecandicarbonsäure	1,110	0,228	0,982	0,089	0,177
Octadecendicarbonsäure	3,777	0,357	3,636	0,298	0,284
Docosandicarbonsäure	2,970	0,420	2,245	0,458	<u>0,029</u>
Tetracosandicarbonsäure	14,239	1,305	11,478	2,056	<u>0,036</u>
Poly-Hydroxysäuren	8,622	3,970	5,148	1,175	0,089
10,16-Dihydroxyhexadecansäure	1,930	0,323	0,998	0,341	<u>0,004</u>
9,10,18-Trihydroxyoctadecansäure	6,692	3,851	4,150	1,438	0,143

Tabelle 21: Absolute Verteilung der Monomere des Samenschalenpolyesters der Doppelmutante *ralph/pox* und des korrespondierenden Wildtyps in *Arabidopsis thaliana* bezogen auf das Trockengewicht der Samenschale

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen

	Wildtyp		<i>ralph/pox</i>		t-Test $\alpha=0,05$
	MW	STABW	MW	STABW	
	$\mu\text{g}/\text{mg}$		$\mu\text{g}/\text{mg}$		
Aromaten	0,611	0,156	1,002	0,262	0,052
<i>cis</i> -Ferulasäure	0,067	0,017	0,029	0,011	<u>0,009</u>
<i>trans</i> -Ferulasäure	0,544	0,142	0,973	0,262	<u>0,043</u>
Monocarbonsäuren	0,471	0,112	1,484	0,421	0,023
Octadecansäure	0,095	0,029	0,233	0,102	0,068
Octadecensäure	0,090	0,044	0,139	0,055	0,139
Eiscosansäure	0,077	0,039	0,233	0,088	<u>0,038</u>
Docosansäure	0,087	0,019	0,171	0,112	0,162
Tetracosansäure	0,121	0,053	0,708	0,072	<u>0,000</u>
primäre Alkohole	0,287	0,048	0,219	0,017	0,030
Octacosanol	0,072	0,008	0,049	0,004	<u>0,003</u>
Docosanol	0,216	0,041	0,169	0,020	0,057
ω-Hydroxysäuren	1,678	0,474	1,487	0,463	0,308
ω -Hydroxyhexadecansäure	0,208	0,180	0,858	0,359	<u>0,035</u>
ω -Hydroxyoctadecensäure	0,146	0,038	0,144	0,035	0,469
ω -Hydroxyoctadecadiensäure	0,192	0,035	0,350	0,046	<u>0,005</u>
ω -Hydroxyeicosansäure	0,043	0,013	0,019	0,009	<u>0,016</u>
ω -Hydroxydocosansäure	0,346	0,104	0,050	0,019	<u>0,005</u>
ω -Hydroxytetracosansäure	0,743	0,224	0,066	0,015	<u>0,004</u>
α,ω-Dicarbonsäuren	1,079	0,254	0,517	0,059	0,009
Hexadecandicarbonsäure	0,074	0,022	0,060	0,020	0,207
Octadecendicarbonsäure	0,258	0,063	0,266	0,019	0,413
Docosandicarbonsäure	0,201	0,044	0,086	0,030	<u>0,005</u>
Tetracosandicarbonsäure	0,546	0,127	0,105	0,010	<u>0,003</u>
Poly-Hydroxysäuren	0,383	0,066	0,602	0,204	0,099
10,16-Dihydroxyhexadecansäure	0,229	0,049	0,486	0,219	0,087
9,10,18-Trihydroxyoctadecensäure	0,154	0,030	0,116	0,015	<u>0,040</u>
Gesamtsuberin	4,510	1,007	5,310	1,387	0,225

Tabelle 22: Relative Verteilung der Monomere des Samenschalenpolyesters der Doppelmutante *ralph/pox* und des korrespondierenden Wildtyps in *Arabidopsis thaliana*

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen

	Wildtyp		<i>ralph/pox</i>		t-Test $\alpha=0,05$
	MW	STABW %	MW	STABW %	
Aromaten	13,70	2,48	18,87	0,02	<u>0,013</u>
<i>cis</i> -Ferulasäure	1,48	0,07	0,59	0,27	<u>0,012</u>
<i>trans</i> -Ferulasäure	12,22	2,43	18,28	0,29	<u>0,007</u>
Monocarbonsäuren	10,55	1,65	27,81	0,93	<u>0,000</u>
Octadecansäure	2,11	0,32	4,23	0,92	<u>0,024</u>
Octadecensäure	2,23	1,67	2,56	0,54	0,367
Eiscosansäure	1,66	0,53	4,28	0,62	<u>0,002</u>
Docosansäure	1,96	0,38	2,95	1,60	0,199
Tetracosansäure	2,58	0,83	13,79	2,64	<u>0,007</u>
primäre Alkohole	6,44	0,61	4,29	0,97	<u>0,020</u>
Octacosanol	1,62	0,21	1,00	0,38	<u>0,043</u>
Docosanol	4,82	0,49	3,29	0,59	<u>0,011</u>
ω-Hydroxysäuren	36,77	3,47	27,69	2,01	<u>0,004</u>
ω -Hydroxyhexadecansäure	4,41	2,92	15,65	3,45	<u>0,005</u>
ω -Hydroxyoctadecensäure	3,22	0,38	2,72	0,18	<u>0,038</u>
ω -Hydroxyoctadecadiensäure	4,32	0,56	6,80	1,31	<u>0,034</u>
ω -Hydroxyeicosansäure	0,94	0,15	0,34	0,08	<u>0,001</u>
ω -Hydroxydocosansäure	7,61	1,52	0,91	0,13	<u>0,001</u>
ω -Hydroxytetracosansäure	16,27	2,89	1,27	0,13	<u>0,001</u>
α,ω-Dicarbonsäuren	23,89	2,25	10,17	2,67	<u>0,001</u>
Hexadecandicarbonsäure	1,61	0,27	1,11	0,13	<u>0,013</u>
Octadecendicarbonsäure	5,71	0,54	5,22	1,20	0,283
Docosandicarbonsäure	4,45	0,24	1,75	0,93	<u>0,016</u>
Tetracosandicarbonsäure	12,12	1,34	2,08	0,59	<u>0,000</u>
Poly-Hydroxysäuren	8,65	1,39	11,17	1,13	<u>0,023</u>
10,16-Dihydroxyhexadecansäure	5,12	0,70	8,81	2,04	<u>0,039</u>
9,10,18-Trihydroxyoctadecansäure	3,53	0,95	2,36	1,03	0,097

Tabelle 23: Absolute Verteilung der Monomere des Samenschalenpolyesters der Doppelmutante *kcs17/ralph* und des korrespondierenden Wildtyps in *Arabidopsis thaliana* bezogen auf das Trockengewicht der Samenschale

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen

	Wildtyp		<i>kcs17/ralph</i>		t-Test $\alpha=0,05$
	MW	STABW	MW	STABW	
	$\mu\text{g}/\text{mg}$		$\mu\text{g}/\text{mg}$		
Aromaten	0,611	0,156	0,505	0,055	0,140
<i>cis</i> -Ferulasäure	0,067	0,017	0,028	0,005	<u>0,007</u>
<i>trans</i> -Ferulasäure	0,544	0,142	0,477	0,050	0,216
Monocarbonsäuren	0,471	0,112	1,296	0,109	0,000
Octadecansäure	0,095	0,029	0,085	0,029	0,331
Octadecensäure	0,090	0,044	0,082	0,071	0,437
Eiscosansäure	0,077	0,039	0,078	0,012	0,484
Docosansäure	0,087	0,019	0,269	0,049	<u>0,008</u>
Tetracosansäure	0,121	0,053	0,782	0,030	<u>0,000</u>
primäre Alkohole	0,287	0,048	0,375	0,053	0,043
Octacosanol	0,072	0,008	0,069	0,008	0,346
Docosanol	0,216	0,041	0,306	0,045	<u>0,026</u>
ω-Hydroxysäuren	1,678	0,474	0,638	0,182	0,008
ω -Hydroxyhexadecansäure	0,208	0,180	0,167	0,065	0,348
ω -Hydroxyoctadecensäure	0,146	0,038	0,128	0,069	0,358
ω -Hydroxyoctadecadiensäure	0,192	0,035	0,193	0,108	0,497
ω -Hydroxyeicosansäure	0,043	0,013	0,022	0,011	<u>0,034</u>
ω -Hydroxydocosansäure	0,346	0,104	0,060	0,015	<u>0,005</u>
ω -Hydroxytetracosansäure	0,743	0,224	0,067	0,007	<u>0,005</u>
α,ω-Dicarbonsäuren	1,079	0,254	0,536	0,070	0,009
Hexadecandicarbonsäure	0,074	0,022	0,074	0,015	0,488
Octadecendicarbonsäure	0,258	0,063	0,292	0,026	0,192
Docosandicarbonsäure	0,201	0,044	0,074	0,035	<u>0,004</u>
Tetracosandicarbonsäure	0,546	0,127	0,095	0,021	<u>0,002</u>
Poly-Hydroxysäuren	0,383	0,066	0,501	0,056	0,026
10,16-Dihydroxyhexadecansäure	0,229	0,049	0,351	0,051	<u>0,015</u>
9,10,18-Trihydroxyoctadecansäure	0,154	0,030	0,151	0,033	0,442
Gesamtsuberin	4,510	1,007	3,851	0,470	0,154

Tabelle 24: Relative Verteilung der Monomere des Samenschalenpolyesters der Doppelmutante *kcs17/ralph* und des korrespondierenden Wildtyps in *Arabidopsis thaliana* bezogen auf das Trockengewicht der Samenschale

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen

	Wildtyp		<i>kcs17/ralph</i>		t-Test $\alpha=0,05$
	MW	STABW %	MW	STABW %	
Aromaten	13,696	2,484	13,135	0,512	0,344
<i>cis</i> -Ferulasäure	1,480	0,075	0,720	0,047	<u>0,000</u>
<i>trans</i> -Ferulasäure	12,216	2,430	12,415	0,542	0,441
Monocarbonsäuren	10,550	1,648	33,806	2,280	0,000
Octadecansäure	2,108	0,324	2,173	0,502	0,428
Octadecensäure	2,231	1,672	2,032	1,559	0,439
Eiscosansäure	1,662	0,532	2,052	0,483	0,180
Docosansäure	1,965	0,380	6,990	0,870	<u>0,002</u>
Tetracosansäure	2,584	0,827	20,559	3,063	<u>0,004</u>
primäre Alkohole	6,443	0,605	9,750	0,960	0,006
Octacosanol	1,622	0,206	1,802	0,205	0,154
Docosanol	4,821	0,485	7,947	0,769	<u>0,004</u>
ω-Hydroxysäuren	36,769	3,472	16,372	3,342	0,000
ω -Hydroxyhexadecansäure	4,405	2,925	4,461	1,954	0,489
ω -Hydroxyoctadecensäure	3,219	0,378	3,215	1,487	0,498
ω -Hydroxyoctadecadiensäure	4,322	0,562	4,837	2,422	0,375
ω -Hydroxyeicosansäure	0,939	0,154	0,561	0,206	<u>0,031</u>
ω -Hydroxydocosansäure	7,610	1,520	1,550	0,205	<u>0,002</u>
ω -Hydroxytetracosansäure	16,274	2,895	1,748	0,179	<u>0,001</u>
α,ω-Dicarbonsäuren	23,890	2,247	13,904	0,284	0,001
Hexadecandicarbonsäure	1,612	0,266	1,929	0,320	0,119
Octadecendicarbonsäure	5,709	0,544	7,646	0,939	<u>0,025</u>
Docosandicarbonsäure	4,454	0,240	1,870	0,756	<u>0,011</u>
Tetracosandicarbonsäure	12,115	1,336	2,458	0,380	<u>0,000</u>
Poly-Hydroxysäuren	8,651	1,392	13,034	0,270	0,003
10,16-Dihydroxyhexadecansäure	5,119	0,699	9,127	0,930	<u>0,002</u>
9,10,18-Trihydroxyoctadecansäure	3,532	0,955	3,908	0,704	0,287

Tabelle 25: Absolute Verteilung der Wurzelsuberinmonomere der Linie *cyp86A1-1/horst-1*, der Doppelmutante *horst/cyp86B2* und des korrespondierenden Wildtyps in *Arabidopsis thaliana* bezogen auf das Trockengewicht des Wurzelmaterials

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen

	Wildtyp		<i>horst-1</i>		t-Test $\alpha=0,05$	<i>horst/cyp86b2</i>		t-Test $\alpha=0,05$
	MW $\mu\text{g}/\text{mg}$	STABW	MW $\mu\text{g}/\text{mg}$	STABW		MW $\mu\text{g}/\text{mg}$	STABW	
Aromaten	0,311	0,013	0,238	0,024	<u>0,009</u>	0,263	0,034	<u>0,030</u>
<i>cis</i> -Ferulasäure	0,051	0,013	0,059	0,008	0,222	0,048	0,014	0,370
<i>trans</i> -Ferulasäure	0,260	0,025	0,178	0,016	<u>0,007</u>	0,215	0,021	<u>0,036</u>
Monocarbonsäuren	1,348	0,080	0,828	0,152	<u>0,007</u>	0,834	0,048	<u>0,001</u>
Octadecensäure	0,051	0,011	0,047	0,007	0,297	0,047	0,013	0,342
Octadecadiensäure	0,154	0,030	0,063	0,012	<u>0,011</u>	0,132	0,017	0,165
Octadecansäure	0,022	0,004	0,018	0,001	0,115	0,024	0,001	0,334
Eiscosansäure	0,081	0,010	0,066	0,013	0,106	0,062	0,004	<u>0,033</u>
Docosansäure	0,776	0,079	0,471	0,097	<u>0,007</u>	0,413	0,018	<u>0,006</u>
Tetracosansäure	0,264	0,007	0,163	0,027	<u>0,009</u>	0,156	0,015	<u>0,000</u>
primäre Alkohole	0,445	0,113	0,388	0,061	<u>0,247</u>	0,351	0,021	<u>0,141</u>
Octacosanol	0,111	0,024	0,093	0,018	0,184	0,083	0,008	<u>0,088</u>
Eicosanol	0,148	0,058	0,134	0,021	0,356	0,119	0,017	0,237
Docosanol	0,186	0,032	0,161	0,028	0,183	0,148	0,011	<u>0,085</u>
ω-Hydroxysäuren	2,011	0,082	1,275	0,242	<u>0,012</u>	1,125	0,093	<u>0,000</u>
ω -Hydroxyhexadecansäure	0,218	0,027	0,114	0,027	<u>0,005</u>	0,100	0,008	<u>0,006</u>
ω -Hydroxyoctadecensäure	0,959	0,081	0,471	0,080	<u>0,001</u>	0,436	0,014	<u>0,003</u>
ω -Hydroxyoctadecadiensäure	0,092	0,010	0,052	0,006	<u>0,003</u>	0,046	0,003	<u>0,006</u>
ω -Hydroxyoctadecansäure	0,040	0,005	0,019	0,004	<u>0,003</u>	0,011	0,001	<u>0,003</u>
ω -Hydroxyeicosansäure	0,073	0,005	0,029	0,004	<u>0,000</u>	0,025	0,004	<u>0,000</u>
ω -Hydroxydocosansäure	0,505	0,016	0,479	0,106	0,357	0,414	0,052	<u>0,017</u>
ω -Hydroxytetracosansäure	0,126	0,012	0,112	0,023	0,204	0,092	0,020	<u>0,020</u>
α,ω-Dicarbonsäuren	1,223	0,037	0,422	0,080	<u>0,000</u>	0,377	0,035	<u>0,000</u>
Hexadecandicarbonsäure	0,264	0,022	0,041	0,009	<u>0,000</u>	0,033	0,008	<u>0,001</u>
Octadecendicarbonsäure	0,793	0,025	0,303	0,057	<u>0,001</u>	0,264	0,037	<u>0,000</u>
Octadecandicarbonsäure	0,100	0,003	0,016	0,001	<u>0,000</u>	0,012	0,003	<u>0,000</u>
Docosandicarbonsäure	0,066	0,015	0,062	0,015	0,395	0,067	0,041	0,473
Gesamtsuberin	5,339	0,307	3,151	0,550	<u>0,004</u>	2,949	0,182	<u>0,001</u>

Tabelle 26: Relative Verteilung der Wurzelsuberinmonomere der Linie *cyp86A1-1/horst-1*, der Doppelmutante *horst/cyp86B2* und des korrespondierenden Wildtyps in *Arabidopsis thaliana*
 MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen

	Wildtyp		<i>horst-1</i>		t-Test $\alpha=0,05$	<i>horst/cyp86b2</i>		t-Test $\alpha=0,05$
	MW %	STABW	MW %	STABW		MW %	STABW	
Aromaten	5,835	0,129	7,623	0,735	<u>0,024</u>	8,916	0,942	<u>0,003</u>
<i>cis</i> -Ferulasäure	0,970	0,294	1,890	0,121	<u>0,010</u>	1,608	0,410	<u>0,031</u>
<i>trans</i> -Ferulasäure	4,864	0,296	5,733	0,619	0,060	7,308	0,582	<u>0,001</u>
Monocarbonsäuren	25,255	0,613	26,238	0,603	<u>0,059</u>	28,281	0,661	<u>0,001</u>
Octadecensäure	0,968	0,244	1,506	0,256	<u>0,029</u>	1,596	0,371	<u>0,022</u>
Octadecadiensäure	2,894	0,612	1,996	0,194	0,058	4,463	0,513	<u>0,012</u>
Octadecansäure	0,419	0,063	0,592	0,090	<u>0,030</u>	0,808	0,082	<u>0,000</u>
Eicosensäure	1,506	0,092	2,089	0,072	<u>0,001</u>	2,116	0,150	<u>0,001</u>
Docosensäure	14,512	0,632	14,879	0,543	0,245	14,017	0,435	0,159
Tetracosensäure	4,955	0,380	5,175	0,234	0,225	5,281	0,305	0,146
primäre Alkohole	8,282	1,588	12,366	0,832	<u>0,014</u>	11,937	1,026	<u>0,018</u>
Octacosanol	2,065	0,321	2,947	0,068	<u>0,018</u>	2,828	0,272	<u>0,015</u>
Eicosanol	2,747	0,900	4,306	0,718	<u>0,041</u>	4,066	0,709	0,054
Docosanol	3,469	0,385	5,113	0,173	<u>0,004</u>	5,043	0,371	<u>0,002</u>
ω-Hydroxysäuren	37,697	0,768	40,392	0,690	<u>0,005</u>	38,111	1,217	<u>0,303</u>
ω -Hydroxyhexadecensäure	4,074	0,263	3,591	0,259	<u>0,043</u>	3,412	0,311	<u>0,015</u>
ω -Hydroxyoctadecensäure	17,937	0,556	14,963	0,094	<u>0,005</u>	14,821	0,604	<u>0,001</u>
ω -Hydroxyoctadecadiensäure	1,726	0,081	1,672	0,224	0,363	1,561	0,081	<u>0,025</u>
ω -Hydroxyoctadecansäure	0,745	0,118	0,626	0,191	0,209	0,379	0,029	<u>0,014</u>
ω -Hydroxyeicosensäure	1,365	0,164	0,911	0,045	<u>0,017</u>	0,834	0,099	<u>0,007</u>
ω -Hydroxydocosensäure	9,484	0,822	15,101	0,790	<u>0,001</u>	13,997	0,962	<u>0,001</u>
ω -Hydroxytetracosensäure	2,367	0,344	3,528	0,144	<u>0,008</u>	3,108	0,489	<u>0,033</u>
α,ω-Dicarbonsäuren	22,931	0,877	13,381	0,423	<u>0,000</u>	12,755	0,538	<u>0,000</u>
Hexadecandicarbonsäure	4,936	0,211	1,283	0,087	<u>0,000</u>	1,136	0,289	<u>0,000</u>
Octadecandicarbonsäure	14,877	0,494	9,606	0,188	<u>0,000</u>	8,942	0,973	<u>0,000</u>
Octadecandicarbonsäure	1,879	0,094	0,529	0,083	<u>0,000</u>	0,404	0,077	<u>0,000</u>
Docosandicarbonsäure	1,240	0,331	1,964	0,224	<u>0,021</u>	2,272	1,398	0,119

Tabelle 27: Absolute Verteilung der Wurzelsuberinmonomere der Linie *cyp86A1-1/horst-1*, *cyp86B1-1/ralph-1*, der Doppelmutante *ralph/horst* und des korrespondierenden Wildtyps in *Arabidopsis thaliana* bezogen auf das Trockengewicht des Wurzelmaterials

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen

	Wildtyp		<i>horst-1</i>			<i>ralph-1</i>			<i>ralph/horst</i>		
	MW	STABW	MW	STABW	t-Test	MW	STABW	t-Test	MW	STABW	t-Test
	$\mu\text{g}/\text{mg}$	$\mu\text{g}/\text{mg}$	$\mu\text{g}/\text{mg}$	$\mu\text{g}/\text{mg}$	$\alpha=0,05$	$\mu\text{g}/\text{mg}$	$\mu\text{g}/\text{mg}$	$\alpha=0,05$	$\mu\text{g}/\text{mg}$	$\mu\text{g}/\text{mg}$	$\alpha=0,05$
Aromaten	0,311	0,013	0,238	0,024	<u>0,009</u>	0,262	0,041	0,084	0,279	0,040	0,055
<i>cis</i> -Ferulasäure	0,051	0,013	0,059	0,008	0,222	0,064	0,034	0,304	0,049	0,016	0,426
<i>trans</i> -Ferulasäure	0,260	0,025	0,178	0,016	<u>0,007</u>	0,199	0,027	<u>0,023</u>	0,220	0,032	0,061
Monocarbonsäuren	1,348	0,080	0,828	0,152	<u>0,007</u>	1,857	0,207	<u>0,019</u>	1,126	0,098	<u>0,013</u>
Octadecensäure	0,051	0,011	0,047	0,007	0,297	0,040	0,012	0,149	0,060	0,010	0,160
Octadecadiensäure	0,154	0,030	0,063	0,012	<u>0,011</u>	0,102	0,004	<u>0,047</u>	0,133	0,023	0,191
Octadecansäure	0,022	0,004	0,018	0,001	0,115	0,019	0,001	0,145	0,022	0,005	0,417
Eiscosansäure	0,081	0,010	0,066	0,013	0,106	0,100	0,014	0,062	0,072	0,010	0,140
Docosansäure	0,776	0,079	0,471	0,097	<u>0,007</u>	1,235	0,139	<u>0,007</u>	0,638	0,056	<u>0,035</u>
Tetracosansäure	0,264	0,007	0,163	0,027	<u>0,009</u>	0,361	0,050	<u>0,037</u>	0,218	0,028	<u>0,020</u>
primäre Alkohole	0,445	0,113	0,388	0,061	<u>0,247</u>	0,550	0,095	0,144	0,474	0,124	0,468
Octacosanol	0,111	0,024	0,093	0,018	0,184	0,126	0,025	0,240	0,115	0,027	0,419
Eicosanol	0,148	0,058	0,134	0,021	0,356	0,204	0,068	0,171	0,152	0,052	0,467
Docosanol	0,186	0,032	0,161	0,028	0,183	0,219	0,022	0,108	0,185	0,034	0,490
ω-Hydroxysäuren	2,011	0,082	1,275	0,242	<u>0,012</u>	1,656	0,264	0,068	0,710	0,022	<u>0,000</u>
ω -Hydroxyhexadecansäure	0,218	0,027	0,114	0,027	<u>0,005</u>	0,241	0,035	0,210	0,110	0,008	<u>0,008</u>
ω -Hydroxyoctadecansäure	0,959	0,081	0,471	0,080	<u>0,001</u>	1,120	0,162	0,111	0,511	0,030	<u>0,003</u>
ω -Hydroxyoctadecadiensäure	0,092	0,010	0,052	0,006	<u>0,003</u>	0,115	0,022	0,098	0,056	0,005	<u>0,006</u>
ω -Hydroxyoctadecansäure	0,040	0,005	0,019	0,004	<u>0,003</u>	0,070	0,024	0,076	0,018	0,008	<u>0,003</u>
ω -Hydroxyeicosansäure	0,073	0,005	0,029	0,004	<u>0,000</u>	0,082	0,022	0,264	0,020	0,005	<u>0,000</u>
ω -Hydroxydocosansäure	0,505	0,016	0,479	0,106	0,357	0,025	0,004	<u>0,000</u>	0,005	0,004	<u>0,000</u>
ω -Hydroxytetracosansäure	0,126	0,012	0,112	0,023	0,204	0,002	0,002	<u>0,001</u>	0,003	0,002	<u>0,001</u>
α,ω-Dicarbonsäuren	1,223	0,037	0,422	0,080	<u>0,000</u>	1,448	0,214	0,104	0,322	0,029	<u>0,000</u>
Hexadecandicarbonsäure	0,264	0,022	0,041	0,009	<u>0,000</u>	0,326	0,046	0,064	0,034	0,004	<u>0,001</u>
Octadecendicarbonsäure	0,793	0,025	0,303	0,057	<u>0,001</u>	0,997	0,140	0,062	0,283	0,039	<u>0,000</u>
Octadecandicarbonsäure	0,100	0,003	0,016	0,001	<u>0,000</u>	0,122	0,026	0,140	0,013	0,002	<u>0,000</u>
Docosandicarbonsäure	0,066	0,015	0,062	0,015	0,395	0,003	0,004	<u>0,006</u>	0,006	0,008	<u>0,004</u>
Gesamtsuberin	5,339	0,307	3,151	0,550	<u>0,004</u>	5,774	0,803	0,228	2,910	0,231	<u>0,000</u>

Tabelle 28: Relative Verteilung der Wurzelsuberinmonomere der Linie *cyp86A1-1/horst-1*, *cyp86B1-1/ralph-1*, der Doppelmutante *ralph/horst* und des korrespondierenden Wildtyps in *Arabidopsis thaliana*

MW entspricht dem arithmetischen Mittel der jeweiligen Datenreihen; STABW gibt die Standardabweichung vom Mittelwert an. Fett markiert sind die Summen der Substanzklassen. Der t-Test wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ durchgeführt, signifikante Unterschiede sind unterstrichen

	Wildtyp		<i>horst-1</i>		t-Test $\alpha=0,05$	<i>ralph-1</i>		t-Test $\alpha=0,05$	<i>ralph/horst</i>		t-Test $\alpha=0,05$
	MW	STABW %	MW	STABW %		MW	STABW %		MW	STABW %	
Aromaten	5,835	0,129	7,623	0,735	<u>0,024</u>	4,538	0,154	<u>0,000</u>	9,571	1,066	<u>0,005</u>
<i>cis</i> -Ferulasäure	0,970	0,294	1,890	0,121	<u>0,010</u>	1,081	0,484	0,377	1,718	0,701	<u>0,044</u>
<i>trans</i> -Ferulasäure	4,864	0,296	5,733	0,619	0,060	3,457	0,330	<u>0,003</u>	7,853	0,544	<u>0,002</u>
Monocarbonsäuren	25,255	0,613	26,238	0,603	0,059	32,258	1,010	<u>0,001</u>	38,671	0,870	<u>0,000</u>
Octadecensäure	0,968	0,244	1,506	0,256	<u>0,029</u>	0,683	0,127	0,085	2,020	0,444	<u>0,003</u>
Octadecadiensäure	2,894	0,612	1,996	0,194	0,058	1,792	0,287	<u>0,035</u>	4,679	0,591	<u>0,010</u>
Octadecansäure	0,419	0,063	0,592	0,090	<u>0,030</u>	0,336	0,077	0,111	0,769	0,152	<u>0,007</u>
Eiscosansäure	1,506	0,092	2,089	0,072	<u>0,001</u>	1,738	0,024	<u>0,021</u>	2,479	0,236	<u>0,000</u>
Docosansäure	14,512	0,632	14,879	0,543	0,245	21,444	0,641	<u>0,000</u>	21,460	0,607	<u>0,000</u>
Tetracosansäure	4,955	0,380	5,175	0,234	0,225	6,265	0,394	<u>0,007</u>	7,263	1,144	<u>0,005</u>
primäre Alkohole	8,282	1,588	12,366	0,832	<u>0,014</u>	9,516	0,806	<u>0,158</u>	16,164	3,177	<u>0,006</u>
Octacosanol	2,065	0,321	2,947	0,068	<u>0,018</u>	2,176	0,147	0,312	4,095	0,766	<u>0,004</u>
Eicosanol	2,747	0,900	4,306	0,718	<u>0,041</u>	3,523	0,946	0,181	5,668	1,487	<u>0,025</u>
Docosanol	3,469	0,385	5,113	0,173	<u>0,004</u>	3,817	0,185	0,129	6,401	0,950	<u>0,001</u>
ω-Hydroxysäuren	37,697	0,768	40,392	0,690	<u>0,005</u>	28,629	0,642	<u>0,000</u>	24,449	1,280	<u>0,000</u>
ω -Hydroxyhexadecansäure	4,074	0,263	3,591	0,259	<u>0,043</u>	4,174	0,035	0,290	3,784	0,228	0,083
ω -Hydroxyoctadecansäure	17,937	0,556	14,963	0,094	<u>0,005</u>	19,391	0,155	<u>0,019</u>	17,285	0,409	0,179
ω -Hydroxyoctadecadiensäure	1,726	0,081	1,672	0,224	0,363	1,988	0,108	<u>0,016</u>	1,875	0,287	0,114
ω -Hydroxyoctadecansäure	0,745	0,118	0,626	0,191	0,209	1,194	0,274	<u>0,044</u>	0,629	0,384	0,257
ω -Hydroxyeicosansäure	1,365	0,164	0,911	0,045	<u>0,017</u>	1,414	0,237	0,392	0,608	0,041	<u>0,002</u>
ω -Hydroxydocosansäure	9,484	0,822	15,101	0,790	<u>0,001</u>	0,433	0,035	<u>0,001</u>	0,152	0,190	<u>0,001</u>
ω -Hydroxytetracosansäure	2,367	0,344	3,528	0,144	<u>0,008</u>	0,034	0,038	<u>0,003</u>	0,117	0,101	<u>0,003</u>
α,ω-Dicarbonsäuren	22,931	0,877	13,381	0,423	<u>0,000</u>	25,058	0,526	<u>0,016</u>	11,145	1,522	<u>0,000</u>
Hexadecandicarbonsäure	4,936	0,211	1,283	0,087	<u>0,000</u>	5,639	0,091	<u>0,008</u>	1,129	0,166	<u>0,000</u>
Octadecandicarbonsäure	14,877	0,494	9,606	0,188	<u>0,000</u>	17,269	0,301	<u>0,002</u>	9,318	1,626	<u>0,002</u>
Octadecandicarbonsäure	1,879	0,094	0,529	0,083	<u>0,000</u>	2,099	0,173	0,073	0,437	0,005	<u>0,000</u>
Docosandicarbonsäure	1,240	0,331	1,964	0,224	<u>0,021</u>	0,051	0,065	<u>0,011</u>	0,261	0,279	<u>0,006</u>

7.5 Microarray Daten

7.5.1 Qualitätsanalyse der Microarray-Datensätze bei Erfassung der differentiellen Genexpression in *horst-1*

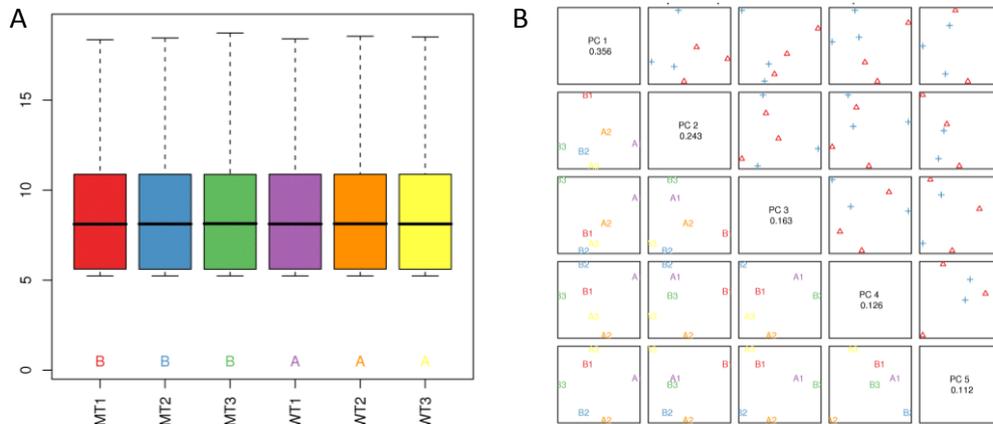


Abbildung 57: Box-Whisker-Plot der \log_2 transformierten Expressionswerte der Versuchsp parallelen nach Normalisierung der Datensätze (A) und Hauptkomponentenanalyse der normalisierten Expressionsdaten (B)

(A): Gezeigt ist die numerische Verteilung der \log_2 transformierten Daten der einzelnen Parallelen des Wildtyps (WT) und der Linie *horst-1* (MT). Die Linie im Zentrum der Box markiert den Median, die Grenzen der Box markieren das obere und untere Quartil, der Abstand zwischen oberer und unterer Quartile entspricht dem Interquartilsabstand. Die Antennen in diesem Diagramm entsprechen dem Minimum, beziehungsweise Maximum. (B): Hauptkomponentenanalyse der normalisierten und gefilterten Expressionswerte beider Linien (35204 Gene). Die ersten 5 Hauptkomponenten wurden hier gegeneinander Aufgetragen. Die Zahlenwerte der Diagonale geben den relativen Anteil der einzelnen Hauptkomponenten an den Gesamtunterschieden zwischen den Microarrays an.

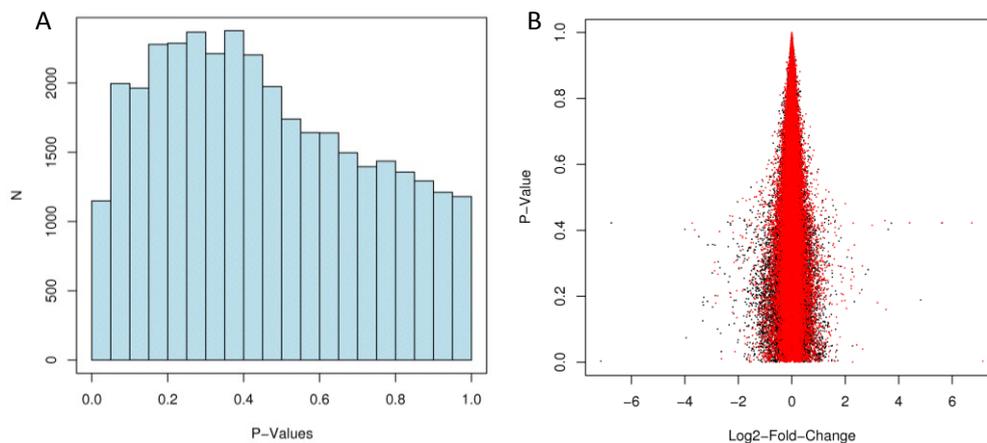


Abbildung 58: Histogramm der Signifikanzwerte der erfassten Datensätze nach Normalisierung (A) und grafische Darstellung der statistischen Signifikanz der \log_2 transformierten Expressionsänderungen in *horst-1*

(A): Die y-Achse zeigt die Frequenz (N) der auf der x-Achse genannten Signifikanzwerte (p-Values). Eine hohe Frequenz von Signifikanzwerten nahe Null kennzeichnet eine hohe Anzahl differenziell exprimierter Gene. (B): Die horizontale Dimension zeigt die logarithmisch transformierte Änderung der Genexpression zwischen den beiden Gruppen WT und *horst-1* (\log_2 -Fold-Change), die vertikale Dimension repräsentiert die zugehörigen Signifikanzwerte (p-values) eines T-Tests zwischen den Gruppen. Rote Punkte repräsentieren zufallsverteilte Daten, schwarze Punkte Daten des Microarrays.

7.5.2 Zusammengefasste Ergebnisse der Analyse der differentiellen Genexpression in *horst-1*

Tabelle 29: Auswahl differentiell exprimierter Gene des Lipidmetabolismus, der Cytochrom-P450-Monooxygenasen, der Peroxidasen und der Gene des Phenylpropanstoffwechsels in *cyp86A1-1/horst-1*

Gezeigt ist hier die relative Änderung der Genexpression (Ratio) in *horst-1* im Vergleich zum Wildtyp, die Beschreibung der jeweiligen Gene nach den Annotationen des *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und eine Klassifizierung der Gene

Ratio	Beschreibung	Klassifizierung
Acyl-Lipide		
1,051	KCS7 (3-KETOACYL-COA SYNTHASE 7)	Lipidelongation
1,768	KCS3 (3-KETOACYL-COA SYNTHASE 3)	Lipidelongation
1,255	GPAT1 (GLYCEROL-3-PHOSPHATE ACYLTRANSFERASE 1)	Lipidmetabolismus
0,910	LACS6 (long-chain acyl-CoA synthetase 6)	Lipidmetabolismus
0,553	esterase/lipase/thioesterase family protein (AT3G26840)	Lipidmetabolismus
0,846	ATLIP1 (Arabidopsis thaliana lipase 1) ;	Lipidmetabolismus
1,576	GLIP2 (GDSSL-motif lipase 2) ; carboxylic ester hydrolase	Lipidmetabolismus
2,321	esterase/lipase/thioesterase family protein (AT1G34340)	Lipidmetabolismus
0,703	EPS1 (ENHANCED PSEUDOMONAS SUSCEPTIBILITY 1)	Lipidtransport
2,267	lipid transfer protein (LTP) family protein (AT4G12360)	Lipidtransport
1,318	lipid transfer protein (LTP) family protein (AT4G30880)	Lipidtransport
1,354	lipid transfer protein (LTP) family protein (AT4G22470)	Lipidtransport
1,518	lipid transfer protein (LTP) family protein (AT3G22570)	Lipidtransport
1,544	ATM1 (ABC TRANSPORTER OF THE MITOCHONDRION)	Lipidtransport
1,617	ABC transporter family protein (AT3G21090)	Lipidtransport
1,759	CER2 (ECERIFERUM 2) ; transferase/ transferase	Lipidtransport
Cytochrom-P450-Monooxygenasen		
0,510	CYP71A28	Monooxygenase
0,566	CYP706A3	Monooxygenase
0,575	CYP79B2	Monooxygenase
1,494	CYP94B3	Monooxygenase
1,871	CYP705A15	Monooxygenase
2,115	CYP77B1	Monooxygenase
Peroxidasen		
0,510	peroxidase, putative (AT5G06730)	Peroxidase
0,694	peroxidase 12 (PER12) (P12) (PRXR6) (AT1G71695)	Peroxidase
0,722	peroxidase, putative (AT4G08770)	Peroxidase
1,309	peroxidase, putative (AT5G64100)	Peroxidase
1,416	peroxidase, putative (AT5G15180)]	Peroxidase
Phenylpropan-Stoffwechsel		
0,670	CAD2 (CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE HOMOLOG 2)	
0,780	ATCAD5 (CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE 5)	
0,968	cinnamyl-alcohol dehydrogenase, putative (CAD) (AT1G51410)	
1,168	cinnamyl-alcohol dehydrogenase family/CAD family (AT1G09490)	
1,169	cinnamoyl-CoA reductase family (AT2G02400)	

Tabelle 30: Auswahl differenziell exprimierter Transkriptionsfaktoren und Wasserkanäle in *cyp86A1-1/horst-1*

Gezeigt ist hier die relative Änderung der Genexpression (Ratio) in *horst-1* im Vergleich zum Wildtyp, die Beschreibung der jeweiligen Gene nach den Annotationen des *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und eine Klassifizierung der Gene. Mit PM = Plasmamembran, VM = Vakuolenmembran

Ratio	Beschreibung	Klassifizierung
Transkriptionsfaktoren		
0,431	MYB122 (MYB DOMAIN PROTEIN 122)	MYB
0,483	MYB112 (myb domain protein 112)	MYB
0,801	MYB family transcription factor (AT2G20400)	MYB
0,817	MYB family transcription factor (AT2G40260)	MYB
0,867	AtMYB18 (myb domain protein 18)	MYB
0,880	MYB family transcription factor (AT5G52660)	MYB
1,304	MYB family transcription factor (AT1G74840)	MYB
1,310	MYB family transcription factor (AT5G05090)	MYB
1,398	MYB3R-3 (myb domain protein 3R-3)	MYB
1,977	MYB3R-4 (myb domain protein 3R-4)	MYB
0,479	ANAC015 (Arabidopsis NAC domain containing protein 15)	NAC
0,568	ANAC032 (Arabidopsis NAC domain containing protein 32)	NAC
0,663	ANAC070 (Arabidopsis NAC domain containing protein 70)	NAC
0,715	ANAC003 (Arabidopsis NAC domain containing protein 3)	NAC
0,724	ANAC013 (Arabidopsis NAC domain containing protein 13)	NAC
1,427	ANAC020 (Arabidopsis NAC domain containing protein 20)	NAC
0,576	WRKY50 ; transcription factor (WRKY50)	WRKY
1,084	WRKY4 ; transcription factor (WRKY4)	WRKY
1,134	WRKY14 ; transcription factor (WRKY14)	WRKY
1,245	WRKY17 ; transcription factor (WRKY17)	WRKY
0,463	AP2 domain-containing transcription factor, putative (AT2G40340)	AP2-Domain
1,390	AP2 domain-containing transcription factor, putative (AT4G39780)	AP2-Domain
1,437	AP2 domain-containing protein (AT5G52020)	AP2-Domain
1,644	AP2 domain-containing transcription factor, putative (AT1G19210)	AP2-Domain
2,003	ERF9 (ERF DOMAIN PROTEIN 9) transcription factor	AP2-Domain
0,161	QQS (QUA-QUINE STARCH) (QQS)	unbekannt
Wasserkanäle		
0,727	PIP2 ;5 (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2 ;5)	PM-lokalisiert
1,307	PIP3 (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 3)	PM-lokalisiert
1,350	PIP1B (NAMED PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1B)	PM-lokalisiert
1,433	PIP1C (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1C)	PM-lokalisiert
1,436	PIP1 ;5 (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1 ;5)	PM-lokalisiert
1,445	PIP2A (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2A)	PM-lokalisiert
1,486	PIP2B (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2)	PM-lokalisiert
1,507	PIP2 ;8 (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2 ;8)	PM-lokalisiert
1,519	GAMMA-TIP (GAMMA TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN)	VM-lokalisiert
1,699	PIP1A (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1A)	VM-lokalisiert
1,825	TIP2 (TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN 2)	VM-lokalisiert
1,844	PIP2 ;4 (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2 ;4)	PM-lokalisiert
2,186	TIP2 ;2 (TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN 2 ;2)	VM-lokalisiert
2,298	TIP2 ;3 (TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN 2 ;3)	VM-lokalisiert

7.5.3 Qualitätsanalyse der Microarray-Datensätze bei Erfassung der differentiellen Genexpression in *ralph/horst*

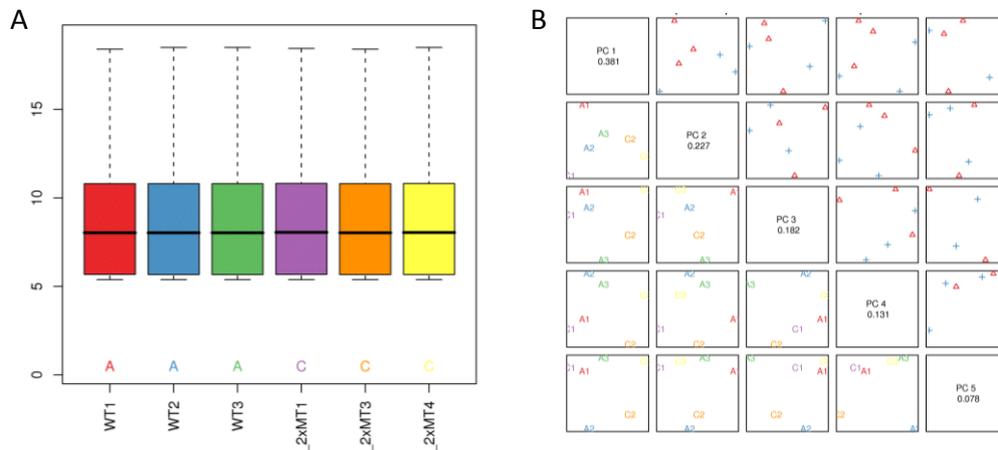


Abbildung 59: Box-Whisker-Plot der log₂ transformierten Expressionswerte der Versuchsp parallelen nach Normalisierung der Datensätze (A) und Hauptkomponentenanalyse der normalisierten Expressionsdaten (B)

(A): Gezeigt ist die numerische Verteilung der log₂ transformierten Daten der einzelnen Parallelen von WT und *ralph/horst* (2xMT). Die Linie im Zentrum der Box markiert den Median, die Grenzen der Box markieren das obere und untere Quartil, der Abstand zwischen oberem und unterem Quartil entspricht dem Interquartilsabstand. Die Antennen in diesem Diagramm entsprechen dem Minimum, beziehungsweise Maximum. (B): Hauptkomponentenanalyse der normalisierten und gefilterten Expressionswerte der Parallelen des Wildtyps (WT) und *ralph/horst* (2xMT) (35204 Gene). Die ersten 5 Hauptkomponenten wurden hier gegeneinander Aufgetragen. Die Zahlenwerte der Diagonale geben den relativen Anteil der einzelnen Hauptkomponenten an den Gesamtunterschieden zwischen den Microarrays an.

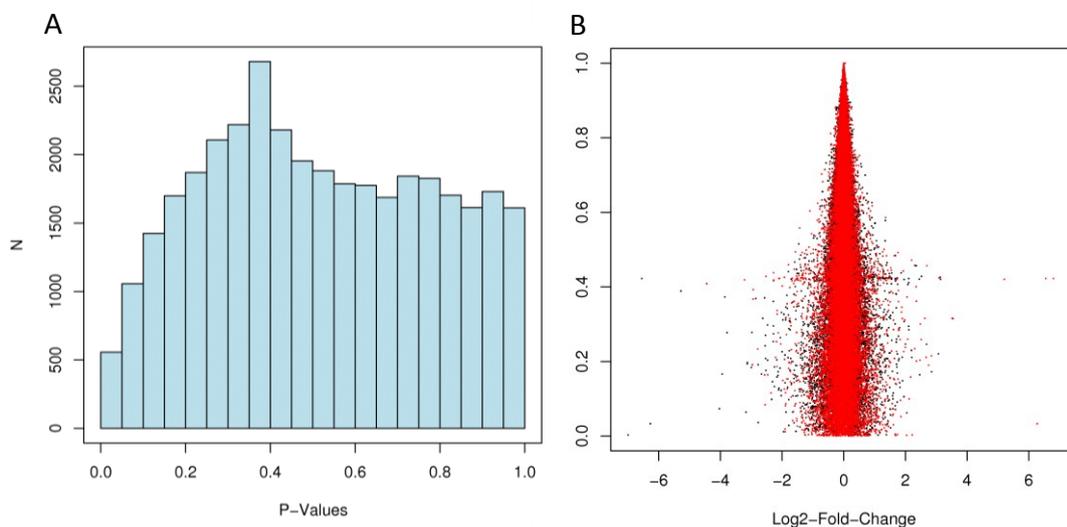


Abbildung 60: Histogramm der Signifikanzwerte der erfassten Hybridisierungs-Daten nach Normalisierung (A) und grafische Darstellung der statistischen Signifikanz der log₂ transformierten Expressionsänderungen in *ralph/horst*

(A): Die y-Achse zeigt die Frequenz (N) der auf der x-Achse genannten Signifikanzwerte (p-Values). Eine hohe Frequenz von Signifikanzwerten nahe Null kennzeichnet eine hohe Anzahl differenziell exprimierter Gene. (B): Die horizontale Dimension zeigt die logarithmisch transformierte Änderung der Genexpression zwischen den beiden Gruppen WT und *ralph/horst* (Log₂-Fold-Change), die vertikale Dimension repräsentiert die zugehörigen Signifikanzwerte (p-values) eines T-Tests zwischen den Gruppen. Rote Punkte repräsentieren zufallsverteilte Daten, schwarze Punkte Daten des Microarrays.

7.5.4 Zusammengefasste Ergebnisse der Analyse der differentiellen Genexpression in *ralph/horst*

Tabelle 31: Auswahl differentiell exprimierter Gene des Lipidmetabolismus, der Cytochrom-P450-Monooxygenasen, der Peroxidasen und der Gene des Phenylpropanstoffwechsels in *ralph/horst*

Gezeigt ist hier die relative Änderung der Genexpression (Ratio) in *ralph/horst-1* im Vergleich zum Wildtyp, die Beschreibung der jeweiligen Gene nach den Annotationen des *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und eine Klassifizierung der Gene

Ratio	Beschreibung	Klassifizierung
Acyl-Lipide		
1,828	GPAT1 (Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase 1)	GPAT
0,862	LACS6 (long-chain acyl-CoA synthetase 6)	LACS
1,149	Long-Chain-Fatty-Acid-CoA ligase, putative (AT1G64400)	LACS
0,694	Triacylglycerol Lipase (AT4G13550)	Lipase
0,816	ATLIP1 (<i>Arabidopsis thaliana</i> lipase 1)	Lipase
1,047	Triacylglycerol Lipase (AT2G31100)	Lipase
0,663	LPAT5 ; Acyltransferase (LPAT5)	Transfer
0,767	Lipid Transfer Protein (LTP) family protein (AT2G45180)	Transfer
0,909	DIR1 (Defective in Induced Resistance 1) ; lipid binding / lipid transporter	Transfer
1,145	Phospholipid/Glycerol Acyltransferase family protein (AT5G60620)	Transfer
1,205	Acyl-(Acyl Carrier Protein) Acyl-ACP Thioesterase, putative (AT4G13050)	Transfer
1,210	Lipid Transporter (AT5G07630)	Transfer
1,236	Acyl-(Acyl-Carrier-Protein) Desaturase, putative , putative (AT5G16230)	Transfer
Cytochrom-P450-Monooxygenasen		
0,111	CYP86B2	Monooxygenase
0,377	CYP82C3	Monooxygenase
0,381	CYP82C2	Monooxygenase
0,411	CYP71A12	Monooxygenase
0,428	CYP79B2	Monooxygenase
0,505	CYP81F2	Monooxygenase
0,560	CYP706A1	Monooxygenase
0,630	CYP706A3	Monooxygenase
0,635	CYP89A5	Monooxygenase
0,654	CYP722A1	Monooxygenase
0,761	CYP83B1	Monooxygenase
1,030	CYP71B32	Monooxygenase
1,218	CYP705A18	Monooxygenase
1,287	CYP705A13	Monooxygenase
1,373	CYP709B3	Monooxygenase
1,553	CYP72C1	Monooxygenase
1,740	CYP76C4	Monooxygenase
2,089	CYP82F1	Monooxygenase
Peroxidasen		
0,471	anionic peroxidase, putative (AT1G14550)	Peroxidase
0,473	anionic peroxidase, putative (AT1G14540)	Peroxidase
0,493	peroxidase, putative (AT5G06730)	Peroxidase
0,576	peroxidase, putative (AT5G64120)	Peroxidase
0,629	peroxidase 22 (PER22) (P22) (PRXEA) / basic peroxidase (AT2G38380)	Peroxidase
0,648	peroxidase, putative (AT5G64110)	Peroxidase
0,678	peroxidase 50 (PER50) (P50) (PRXR2) (AT4G37520)	Peroxidase
0,808	peroxidase, putative (AT4G08780)	Peroxidase
1,323	peroxidase, putative (AT5G47000)	Peroxidase
1,559	peroxidase, putative (AT5G22410)	Peroxidase
1,626	peroxidase 27 (PER27) (P27) (PRXR7) (AT3G01190)	Peroxidase
Phenylpropan-Stoffwechsel		
0,486	Cinnamoyl-CoA Reductase-related (AT2G23910)	
0,763	Cinnamyl-Alcohol Dehydrogenase, putative (CAD) (AT5G19440)	
1,196	Cinnamoyl-CoA Reductase family (AT2G02400)	

Tabelle 32: Auswahl differenziell exprimierter Transkriptionsfaktoren und Wasserkanäle in *cyp86A1-1/horst-1*

Gezeigt ist hier die relative Änderung der Genexpression (Ratio) in *horst-1* im Vergleich zum Wildtyp, die Beschreibung der jeweiligen Gene nach den Annotationen des *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und eine Klassifizierung der Gene. Mit PM = Plasmamembran, VM = Vakuolenmembran

Ratio	Beschreibung	Klassifizierung
Transkriptionsfaktoren		
0,439	MYB122 (MYB DOMAIN PROTEIN 122)	MYB
0,742	MYB94 (MYB DOMAIN PROTEIN 94) DNA binding / transcription factor	MYB
0,779	PC-MYB1 transcription factor	MYB
1,513	myb family transcription factor (AT1G13300)	MYB
1,593	myb family transcription factor (AT3G16350)	MYB
1,619	MYB34 (MYB DOMAIN PROTEIN 34) transcription factor	MYB
1,648	myb family transcription factor (AT3G11280)	MYB
1,665	myb family transcription factor (AT3G13040)	MYB
0,638	ANAC011 (Arabidopsis NAC domain containing protein 11) ; transcription factor	NAC
0,804	ANAC086 (Arabidopsis NAC domain containing protein 86) ; transcription factor	NAC
1,432	ANAC020 (Arabidopsis NAC domain containing protein 20) ; transcription factor	NAC
2,377	ANAC080 (Arabidopsis NAC domain containing protein 80) ; transcription factor	NAC
1,043	No Apical Meristem (NAM) family protein (AT3G56520)	NAM
0,816	WRKY15 ; calmodulin binding / transcription factor (WRKY15)	WRKY
1,248	WRKY48 ; transcription factor (WRKY48)	WRKY
1,275	WRKY69 ; transcription factor (WRKY69)	WRKY
1,357	WRKY9 ; transcription factor (WRKY9)	WRKY
0,455	AP2 domain-containing transcription factor, putative (DRE2B) (AT2G40340)	AP2-Domain
1,848	AP2 domain-containing protein (AT5G52020)	AP2-Domain
2,115	AP2 domain-containing transcription factor, putative (AT2G20880)	AP2-Domain
2,139	AP2 domain-containing transcription factor, putative (AT1G64380)	AP2-Domain
1,017	SHN2 (shine2) ; DNA binding / transcription factor (SHN2)	SHINE
0,146	QQS (QUA-QUINE STARCH) (QQS)	
Wasserkanäle		
0,683	BRX (BREVIS RADIX) water channel (BRX)	
1,598	PIP2B (Plasma Membrane Intrinsic Protein 2) ; water channel (PIP2B)	PM-lokalisiert
1,719	GAMMA-TIP (Gamma Tonoplast Intrinsic Protein) ; water channel (GAMMA-TIP)	VM-lokalisiert
1,781	PIP2A (Plasma Membrane Intrinsic Protein 2A) ; water channel (PIP2A)	PM-lokalisiert
1,835	MSL5 (Mechanosensitive Channel of Small Conductance-like 5) (MSL5)	
1,888	PIP1B (Named Plasma Membrane Intrinsic Protein 1B) ; water channel (PIP1B)	PM-lokalisiert
2,098	TIP2 ;2 (Tonoplast Intrinsic Protein 2 ;2) ; water channel (TIP2 ;2)	VM-lokalisiert
3,029	AtTIP2 ;3 water channel (TIP2 ;3)	VM-lokalisiert

7.6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Apoplastische Suberinmodifikationen in unterschiedlichen Stadien der Wurzelentwicklung	5
Abbildung 2: Darstellung der Depositionsorte von Suberin in den Geweben von <i>Arabidopsis thaliana</i> anhand von <i>Prom_{ASFT}::eYFP</i> Observation	7
Abbildung 3: Modellvorstellungen des dreidimensionalen Aufbaus des Suberinpolyesters....	9
Abbildung 4: Ultrastruktur suberinisierter Peridermzellen der Kartoffelschale	10
Abbildung 5: Modell der Biosynthese des aliphatischen Suberinpolyesters	13
Abbildung 6: Katalytischer Mechanismus der Cytochrom-P450-Monooxygenasen.....	15
Abbildung 7: Funktionsprinzip einer kompetitiven PCR.....	30
Abbildung 8: Schematische Darstellung der BP-Rekombinationsreaktion des Gateway-Systems	34
Abbildung 9: Vektorkarte des <i>entry clones</i> aus dem <i>entry vector</i> pDONR/Zeo und dem Konstrukt <i>Prom_{CYP86B1}-CYP86B1</i>	34
Abbildung 10: Schematische Darstellung der LR-Reaktion des Gateway-Rekombinationssystems.....	35
Abbildung 11: Vektorkarte des <i>expression clones</i> aus dem Destinationsvektor pMDC111 und dem Konstrukt <i>Prom_{CYP86B1}-CYP86B1</i>	36
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Umesterungsreaktion.....	44
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Derivatisierungsreaktion mit BSTFA	45
Abbildung 14: Mikroskopische Untersuchung der Antheren und des Pollenkorns des Wildtyps und der Linie <i>cyp704B2</i> mittels Rasterelektronenmikroskopie	52
Abbildung 15: Korrelationsanalyse des Oberfläche/Gewicht-Verhältnisses von Antheren des Wildtyps und der Linie <i>cyp704B2</i>	53
Abbildung 16: Vergleich der absoluten und relativen Verteilung der Monomere des Wachses von Antheren der <i>cyp704B2</i> Mutante und des korrespondierenden Wildtyps (<i>Oryza sativa</i>)	55
Abbildung 17: Vergleich der absoluten und relativen Verteilung der Monomere des Kutins von Antheren der <i>cyp704B2</i> Mutante und des korrespondierenden Wildtyps (<i>Oryza sativa</i>)	57
Abbildung 18: Schematische Darstellung der Kandidatengene mit potenzieller Beteiligung an der Suberinbiosynthese.....	59
Abbildung 19: Organspezifische Expressionsstudien von Genen mit einer potenziellen Funktion in der Suberin-Biosynthese in <i>Arabidopsis thaliana</i>	60
Abbildung 20: Schematische Darstellung der Cytochrom-P450-Monooxygenasen mit potenzieller Funktion in der Suberinbiosynthese.....	61
Abbildung 21: organspezifische Expressionsstudien von Cytochrom-P450-Monooxygenasen der CYP86 und CYP94 Familie in <i>Arabidopsis thaliana</i>	62

Abbildung 22: Mikroskopische Untersuchung der Wurzel von transformierten <i>Arabidopsis thaliana</i>	65
Abbildung 23: Vergleich der Monomierzusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins der <i>knockout</i> Mutante <i>ralph-2</i> sowie den RNAi-Linien <i>ralph-3</i> und <i>ralph-4</i> und des Wildtyps	68
Abbildung 24: Vergleich der relativen Monomierzusammensetzung des aliphatischen Wurzelsuberins der <i>knockout</i> Mutante <i>ralph-2</i> sowie den RNAi-Linien <i>ralph-3</i> und <i>ralph-4</i> und des Wildtyps	69
Abbildung 25: Vergleich der Zusammensetzung des Samenschalenpolyesters der <i>knockout</i> Mutanten <i>ralph-1</i> und <i>ralph-2</i> , der RNAi-Linien <i>ralph-3</i> und <i>ralph-4</i> und des korrespondierenden Wildtyps	72
Abbildung 26: Ergebnisse der <i>in silico</i> Koexpressions-Analyse mittels ATTED-II	73
Abbildung 27: Schematische Darstellung des Genlocus der putativen Peroxidase <i>POX</i>	74
Abbildung 28: Genotypisierung potenzieller Insertionsmutanten der Linie SALK_053130.41.15.x im Gen At1g68850 (<i>POX</i>)	74
Abbildung 29: Vergleich der Zusammensetzung des Wurzelsuberins der <i>pox</i> Mutante und des korrespondierenden Wildtyps.....	76
Abbildung 30: Vergleich der Zusammensetzung des Samenschalenpolyesters der <i>knockout</i> Mutante <i>pox</i> und des korrespondierenden Wildtyps	78
Abbildung 31:Vergleich der relativen Zusammensetzung des Samenschalenpolyesters der <i>knockout</i> Mutante <i>pox</i> und des korrespondierenden Wildtyps	79
Abbildung 32: Schematische Übersicht der Genloci <i>CYP86B1/RALPH</i> (At5g23190) (A) und <i>POX</i> (At1g68850) (B)	81
Abbildung 33: Genotypisierung putativer <i>ralph/pox</i> Doppelmutanten.....	81
Abbildung 34: Vergleich der Zusammensetzung des Samenschalenpolyesters der Doppelmutante <i>ralph/pox</i> und des korrespondierenden Wildtyps	84
Abbildung 35: Vergleich der relativen Zusammensetzung des Samenschalenpolyesters der Doppelmutante <i>ralph/pox</i> und des korrespondierenden Wildtyps	85
Abbildung 36: Genotypisierung putativer <i>kcs17/ralph</i> Doppelmutanten	87
Abbildung 37: Vergleich der Zusammensetzung des Samenschalenpolyesters der Doppelmutante <i>kcs17/ralph</i> und des korrespondierenden Wildtyps.....	89
Abbildung 38: Vergleich der relativen Zusammensetzung des Samenschalenpolyesters der Doppelmutante <i>kcs17/ralph</i> und des korrespondierenden Wildtyps.....	90
Abbildung 39: Schematische Darstellung der Genloci von <i>RALPH</i> (A) und <i>HORST</i> (B)	92
Abbildung 40: Genotypisierung der F ₂ -Generation putativer Doppelmutanten <i>ralph/horst</i>	92
Abbildung 41: Vergleich der Zusammensetzung des Wurzelsuberins der Doppelmutante <i>ralph/horst</i> und des korrespondierenden Wildtyps	95

Abbildung 42: Relative Zusammensetzung des Wurzelsuberins der Doppelmutante <i>ralph/horst</i> und des korrespondierenden Wildtyps	96
Abbildung 43: Anatomie und Histologie der primären Wurzel des Wildtyps und der Doppelmutante <i>ralph/horst</i>	98
Abbildung 44: Schematische Darstellung der Genloci von <i>HORST</i> (A) und <i>CYP86B2</i> (B)..	100
Abbildung 45: Genotypisierung potenzieller <i>horst/cyp86B2</i> Doppelmutanten	101
Abbildung 46: Vergleich der Zusammensetzung des Wurzelsuberins der Doppelmutante <i>horst/cyp86B2</i> , der Mutante <i>horst-1</i> und des korrespondierenden Wildtyps	103
Abbildung 47: Vergleich der relativen Zusammensetzung des Suberinpolyesters der Doppelmutante <i>horst/cyp86B2</i> , der Mutante <i>horst-1</i> und des korrespondierenden Wildtyps	104
Abbildung 48: Tetrazolium Test zur Bestimmung der Samenschalenpermeabilität	106
Abbildung 49: Tetrazolium Test zur Bestimmung der Samenschalenpermeabilität	108
Abbildung 50: Prozentuale Darstellung der Samenkeimungsrate und der Überlebensrate von <i>Arabidopsis</i> Keimlingen der <i>ralph/horst</i> Doppelmutante und des korrespondierenden Wildtyps.....	110
Abbildung 51: Phänotypische Auswirkungen von Salzstress und osmotischem Stress bei <i>Arabidopsis</i> Keimlingen	112
Abbildung 52: Darstellung der Austrocknungstoleranz von Suberinmutanten in <i>Arabidopsis</i>	114
Abbildung 53: Differenziell hochregulierte Gene in den Geweben der Wurzelspitze der Mutante <i>horst-1</i>	117
Abbildung 54: Differenziell runterregulierte Gene in den Geweben der Wurzelspitze der Mutante <i>horst-1</i>	118
Abbildung 55: Differenziell hochregulierte Gene in den Geweben der Wurzelspitze der Doppelmutante <i>ralph/horst</i>	119
Abbildung 56: Differenziell runterregulierte Gene in den Geweben der Wurzelspitze der Doppelmutante <i>ralph/horst</i>	120
Abbildung 57: Box-Whisker-Plot der log ₂ transformierten Expressionswerte der Versuchsp parallelen nach Normalisierung der Datensätze (A) und Hauptkomponentenanalyse der normalisierten Expressionsdaten (B).....	195
Abbildung 58: Histogramm der Signifikanzwerte der erfassten Datensätze nach Normalisierung (A) und grafische Darstellung der statistischen Signifikanz der log ₂ transformierten Expressionsänderungen in <i>horst-1</i>	195
Abbildung 59: Box-Whisker-Plot der log ₂ transformierten Expressionswerte der Versuchsp parallelen nach Normalisierung der Datensätze (A) und Hauptkomponentenanalyse der normalisierten Expressionsdaten (B).....	198

Abbildung 60: Histogramm der Signifikanzwerte der erfassten Hybridisierungs-Daten nach Normalisierung (A) und grafische Darstellung der statistischen Signifikanz der log₂ transformierten Expressionsänderungen in *ralph/horst*.....198

7.7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes bei PCR mit Platinium [®] -Pfx-DNA-Polymerase.....	28
Tabelle 2: Temperaturprogramm des Thermocyclers bei Durchführung einer PCR mit Platinium [®] -Pfx-DNA-Polymerase.....	28
Tabelle 3: Reaktionsansatz einer kompetitiven PCR mit Tfi-DNA-Polymerase	30
Tabelle 4: Temperaturprogramm des Thermocyclers für eine kompetitive PCR	31
Tabelle 5: Zusammensetzung eines RT-PCR-Reaktionsansatzes.....	31
Tabelle 6: Temperaturprogramm bei Durchführung einer RT-PCR.....	31
Tabelle 7 Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes	37
Tabelle 8: Temperaturprogramme zur Auftrennung von Stoffgemischen in der Gaschromatographie.....	47
Tabelle 9: Absolute Verteilung der kutikulären Wachsmomere der Antheren der <i>cyp704B2</i> Mutante und des korrespondierenden Wildtyps in <i>Oryza sativa</i> bezogen auf die Antherenoberfläche	175
Tabelle 10: Relative Verteilung der kutikulären Wachsmomere der Antheren der <i>cyp704B2</i> Mutante und des korrespondierenden Wildtyps in <i>Oryza sativa</i> bezogen auf die Antherenoberfläche	176
Tabelle 11: Absolute Verteilung der Kutinmonomere der Antheren der <i>cyp704B2</i> Mutante und des korrespondierenden Wildtyps in <i>Oryza sativa</i> bezogen auf die Antherenoberfläche	177
Tabelle 12: Relative Verteilung der Kutinmonomere der Antheren der <i>cyp704B2</i> Mutante und des korrespondierenden Wildtyps in <i>Oryza sativa</i> bezogen auf die Antherenoberfläche	178
Tabelle 13: Absolute Verteilung der Wurzelsuberinmonomere der Linien <i>cyp86B1-2/ralph-2</i> , <i>cyp86B1-3/ralph-3</i> und <i>cyp86B1-4/ralph-4</i> und des korrespondierenden Wildtyps in <i>Arabidopsis thaliana</i> bezogen auf das Trockengewicht der Wurzel	179
Tabelle 14: Relative Verteilung der Wurzelsuberinmonomere der Linien <i>cyp86B1-2/ralph-2</i> , <i>cyp86B1-3/ralph-3</i> und <i>cyp86B1-4/ralph-4</i> und des korrespondierenden Wildtyps in <i>Arabidopsis thaliana</i>	180
Tabelle 15: Absolute Verteilung der Monomere des Samenschalenpolyesters der Linien <i>cyp86B1-1/ralph-1</i> , <i>cyp86B1-2/ralph-2</i> , <i>cyp86B1-3/ralph-3</i> , <i>cyp86B1-4/ralph-4</i> und des korrespondierenden Wildtyps in <i>Arabidopsis thaliana</i> bezogen auf das Trockengewicht der Samenschalen.....	181
Tabelle 16: Relative Verteilung der Monomere des Samenschalenpolyesters der Linien <i>cyp86B1-1/ralph-1</i> , <i>cyp86B1-2/ralph-2</i> , <i>cyp86B1-3/ralph-3</i> , <i>cyp86B1-4/ralph-4</i> und des korrespondierenden Wildtyps in <i>Arabidopsis thaliana</i>	182

Tabelle 17: Absolute Verteilung der Wurzelsuberinmonomere der Linie <i>pox</i> und des korrespondierenden Wildtyps in <i>Arabidopsis thaliana</i> bezogen auf das Trockengewicht der Wurzel.....	183
Tabelle 18: Relative Verteilung der Wurzelsuberinmonomere der Linie <i>pox</i> und des korrespondierenden Wildtyps in <i>Arabidopsis thaliana</i>	184
Tabelle 19: Absolute Verteilung der Monomere des Samenschalenpolyesters der Linie <i>pox</i> und des korrespondierenden Wildtyps in <i>Arabidopsis thaliana</i> bezogen auf das Trockengewicht der Samenschale.....	185
Tabelle 20: Relative Verteilung der Monomere des Samenschalenpolyesters der Linie <i>pox</i> und des korrespondierenden Wildtyps in <i>Arabidopsis thaliana</i>	186
Tabelle 21: Absolute Verteilung der Monomere des Samenschalenpolyesters der Doppelmutante <i>ralph/pox</i> und des korrespondierenden Wildtyps in <i>Arabidopsis thaliana</i> bezogen auf das Trockengewicht der Samenschale.....	187
Tabelle 22: Relative Verteilung der Monomere des Samenschalenpolyesters der Doppelmutante <i>ralph/pox</i> und des korrespondierenden Wildtyps in <i>Arabidopsis thaliana</i> ...	188
Tabelle 23: Absolute Verteilung der Monomere des Samenschalenpolyesters der Doppelmutante <i>kcs17/ralph</i> und des korrespondierenden Wildtyps in <i>Arabidopsis thaliana</i> bezogen auf das Trockengewicht der Samenschale.....	189
Tabelle 24: Relative Verteilung der Monomere des Samenschalenpolyesters der Doppelmutante <i>kcs17/ralph</i> und des korrespondierenden Wildtyps in <i>Arabidopsis thaliana</i>	190
Tabelle 25: Absolute Verteilung der Wurzelsuberinmonomere der Linie <i>cyp86A1-1/horst-1</i> , der Doppelmutante <i>horst/cyp86B2</i> und des korrespondierenden Wildtyps in <i>Arabidopsis thaliana</i> bezogen auf das Trockengewicht des Wurzelmaterials.....	191
Tabelle 26: Relative Verteilung der Wurzelsuberinmonomere der Linie <i>cyp86A1-1/horst-1</i> , der Doppelmutante <i>horst/cyp86B2</i> und des korrespondierenden Wildtyps in <i>Arabidopsis thaliana</i>	192
Tabelle 27: Absolute Verteilung der Wurzelsuberinmonomere der Linie <i>cyp86A1-1/horst-1</i> , <i>cyp86B1-1/ralph-1</i> , der Doppelmutante <i>ralph/horst</i> und des korrespondierenden Wildtyps in <i>Arabidopsis thaliana</i> bezogen auf das Trockengewicht des Wurzelmaterials	193
Tabelle 28: Relative Verteilung der Wurzelsuberinmonomere der Linie <i>cyp86A1-1/horst-1</i> , <i>cyp86B1-1/ralph-1</i> , der Doppelmutante <i>ralph/horst</i> und des korrespondierenden Wildtyps in <i>Arabidopsis thaliana</i>	194
Tabelle 29: Auswahl differenziell exprimierter Gene des Lipidmetabolismus, der CytochromP450-Monooxygenasen, der Peroxidasen und der Gene des Phenylpropanstoffwechsels in <i>cyp86A1-1/horst-1</i>	196

Tabelle 30: Auswahl differenziell exprimierter Transkriptionsfaktoren und Wasserkanäle in <i>cyp86A1-1/horst-1</i>	197
Tabelle 31: Auswahl differenziell exprimierter Gene des Lipidmetabolismus, der CytochromP450-Monooxygenasen, der Peroxidasen und der Gene des Phenylpropanstoffwechsels in <i>ralph/horst</i>	199
Tabelle 32: Auswahl differenziell exprimierter Transkriptionsfaktoren und Wasserkanäle in <i>cyp86A1-1/horst-1</i>	200

7.8 Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der Nukleinsäure-Konzentration einer Lösung	27
Formel 2: Berechnung der Schmelztemperatur von Primern	174
Formel 3: Berechnung der Hybridisierungstemperatur von Primern	174

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, den

Publikationsliste

Compagnon V, Diehl P, Benveniste I, Meyer D, Schaller H, Schreiber L, Franke R, Pinot F (2009) CYP86B1 Is Required for Very Long Chain ω -Hydroxyacid and α,ω -Dicarboxylic Acid Synthesis in Root and Seed Suberin Polyester. *Plant Physiology* **150**: 1831-1843

Li H, Pinot F, Sauveplane V, Werck-Reichhart D, Diehl P, Schreiber L, Franke R, Zhang P, Chen L, Gao Y, Liang W, Zhang D (2010) Cytochrome P450 Family Member CYP704B2 Catalyzes the ω -Hydroxylation of Fatty Acids and Is Required for Anther Cutin Biosynthesis and Pollen Exine Formation in Rice. *The Plant Cell Online* **22**: 173-190