

# Die pflanzlichen Biopolyester

## Kutin und Suberin

### Chemische Zusammensetzung und Biosynthese

#### Dissertation

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

vorgelegt von  
Sheron Francisco De Oliveira  
aus Burscheid

Bonn 2012

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Lukas Schreiber

2. Gutachter: PD Dr. Rochus Franke

Tag der Promotion: 08.04.2013

Erscheinungsjahr: 2013

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Hydrophobe Grenzflächen als Barrieren.....	2
1.1.1	Die Kutikula.....	2
1.1.2	Suberinisierte Grenzflächen.....	4
1.2	Aufklärung zur chemischen Zusammensetzung und Synthese der Polyester.....	8
1.2.1	Synthese der Polyester Kutin und Suberin.....	8
1.2.2	Die Familie der Cytochrom P450 Monooxygenasen.....	13
1.2.3	Die Familie der BAHD-Acyltransferasen.....	15
1.2.4	ABC-Transporter.....	17
1.2.5	Regulation der Polyestersynthese.....	18
1.3	Zielsetzung.....	20
1.3.1	Die $\omega$ -Hydroxylase CYP704B1 in Brassica napus.....	20
1.3.2	Die Acyltransferase DCR in Solanum lycopersicum.....	21
1.3.3	Der ABC-Transporter ABCG11 in Arabidopsis thaliana.....	21
1.3.4	Die SHINE-Transkriptionsfaktoren in Arabidopsis thaliana.....	22
2	Material und Methoden.....	24
2.1	Pflanzenmaterialien.....	25
2.1.1	Brassica napus.....	25
2.1.2	Solanum lycopersicum.....	25
2.1.3	Arabidopsis thaliana.....	26
2.1.3.1	Generierung transgener ABCG11-Linien.....	26
2.1.3.2	Generierung transgener SHN1/2/3-Linien.....	27
2.2	Mikroskopische Untersuchung.....	28
2.2.1	Untersuchungen unter dem Binokular und dem Lichtmikroskop.....	28
2.2.2	Anfertigung von Querschnitten mit dem Mikrotom.....	28
2.2.3	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen.....	28
2.3	Transpirationsmessung.....	30
2.3.1	Messaufbau.....	30
2.3.2	Auswertung.....	31
2.4	Analytische Studien.....	32
2.4.1	Wachs- und Kutinanalyse von Rapsantheren.....	32
2.4.2	Wachs- und Kutinanalyse von Tomatenfruchtkutikeln.....	34
2.4.3	Wachsanalyse von A. thaliana Pflanzenmaterialien.....	35

2.4.4	Polyesteranalyse von <i>A. thaliana</i> Pflanzenmaterialien .....	35
2.5	Gaschromatographie und Massenspektrometrie .....	37
2.5.1	Depolymerisierung der Polyester .....	37
2.5.2	Derivatisierung .....	38
2.5.3	Gaschromatographie .....	38
2.5.4	Massenspektrometrie .....	39
2.5.5	Auswertung .....	40
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Untersuchung der Bncyp704b1 Antherenkutikeln.....	42
3.2	Untersuchung der Sldcr Tomatenfruchtkutikeln.....	46
3.2.1	Makroskopische Untersuchung der Tomatenfruchtkutikeln .....	46
3.2.2	Mikroskopische Untersuchung der Tomatenfruchtkutikeln .....	47
3.2.3	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Tomatenfruchtkutikeln .....	49
3.2.4	Transportstudie zur Sldcr-Linie.....	50
3.2.5	Analyse des der Sldcr Tomatenfruchtwachses.....	53
3.2.6	Analyse des Sldcr Tomatenfruchtkutins .....	56
3.3	Untersuchung der transgenen ABCG-Linien.....	59
3.3.1	Analyse der Sprossachsenwachse der abcg11-Linie.....	59
3.3.2	Analyse des Sprossachsenkutins der abcg11- Linie.....	61
3.3.3	Analyse des Sprossachsenkutins der ABCG11-OE-Linie .....	62
3.3.4	Analyse des Blattkutins der abcg11-Linie .....	63
3.3.5	Analyse des Blattkutins der ABCG11-OE-Linie .....	64
3.3.6	Analyse des Blütenkutins der abcg11-Linie.....	66
3.3.7	Analyse des Schotenkutins der abcg11-Linie .....	67
3.3.8	Analyse des Wurzelsuberins der abcg11-Linie .....	69
3.3.9	Analyse des Wurzelsuberins der ABCG11-OE-Linie.....	70
3.4	Untersuchung der transgenen shn1/2/3-Linie .....	72
3.4.1	Analyse der Blütenwachse der shn1/2/3-Linie.....	72
3.4.2	Analyse des Blütenkutins der shn1/2/3-Linie.....	74
3.4.3	Analyse der Blattwachse der shn1/2/3-Linie .....	76
3.4.4	Analyse des Blattkutins der shn1/2/3-Linie .....	77
3.4.5	Analyse des Wurzelsuberins der shn1/2/3-Linie.....	79
4	Diskussion.....	81
4.1	Beteiligung des Gens BnCYP704B1 an der Entwicklung der Antherenkutikula .....	82
4.2	Beteiligung des Gens SIDCR an der Bildung der Tomatenfruchtkutikula .....	85

4.3	Beteiligung des Gens ABCG11 an der Kutikula- und Suberinbildung.....	89
4.4	Beteiligung der SHINE-Gene an der Kutikula- und Suberinbildung.....	95
4.5	Zusammenfassende Diskussion.....	100
5	Zusammenfassung.....	103
6	Literatur.....	106
7	Anhang.....	115
7.1	Daten zur Kutikulazusammensetzung der Bncyp704b1-Linie.....	116
7.2	Daten zu den Sldcr-Linien.....	119
7.2.1	Transpirationsmessung .....	119
7.2.2	Daten zur Kutikulazusammensetzung der Sldcr-Linien .....	120
7.3	Daten zur Kutikulazusammensetzung der ABCG11-Linien.....	128
7.4	Daten zu den shn1/2/3-Linien.....	144
7.4.1	Lokalisation, Expression und Coexpression.....	144
7.4.2	Daten zur Kutikulazusammensetzung .....	146
7.5	Abbildungsverzeichnis.....	155
7.6	Tabellenverzeichnis .....	157

**Erklärung**

**Publikationen**

**Danksagung**

# Abkürzungsverzeichnis

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ABC	<i>Adenosintriphosphate binding cassette</i>
AtDCR	<i>A. thaliana DCR</i>
<i>B. napus</i>	<i>Brassica napus</i>
BDG	<i>BODYGUARD</i>
bp	Basenpaare
BF <sub>3</sub> /MeOH	Methanolisches Bortrifluorid
BSTFA	N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
CoA	Coenzym A
CYP	Cytochrom Pigment 450
DCR	<i>DEFECTIVE IN CUTICULAR RIDGES</i>
DHFS	Dihydroxyfettsäure
DPM	<i>Disintegrations per minute</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAE	<i>Fatty Acid Elongation</i>
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatograph
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GPAT	<i>GLYCEROLE-3-PHOSPHATE ACYL TRANSFERASE</i>
HCl/MeOH	Methanolische Salzsäure
HDFS	Hydroxydifettsäure
HTH	<i>HOTHEAD</i>
LTP	<i>LIPID TRANSFER PROTEIN</i>
LTPG	<i>LTP-GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL ANCHORED</i>
MAG	Monoacylglycerin
MS	Massenspektrometer
MT	Mutante
<i>S. lycopersicum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
SHN	<i>SHINE</i>
SIDCR	<i>S. lycopersicum DCR</i>
sn-1(/2/3)	<i>stereo specific number-1(/2/3)</i>
TF	Transkriptionsfaktor
THFS	Trihydroxyfettsäure
VLCFA	<i>Very long chain fatty acids</i>
WT	Wildtyp

# **1 Einleitung**

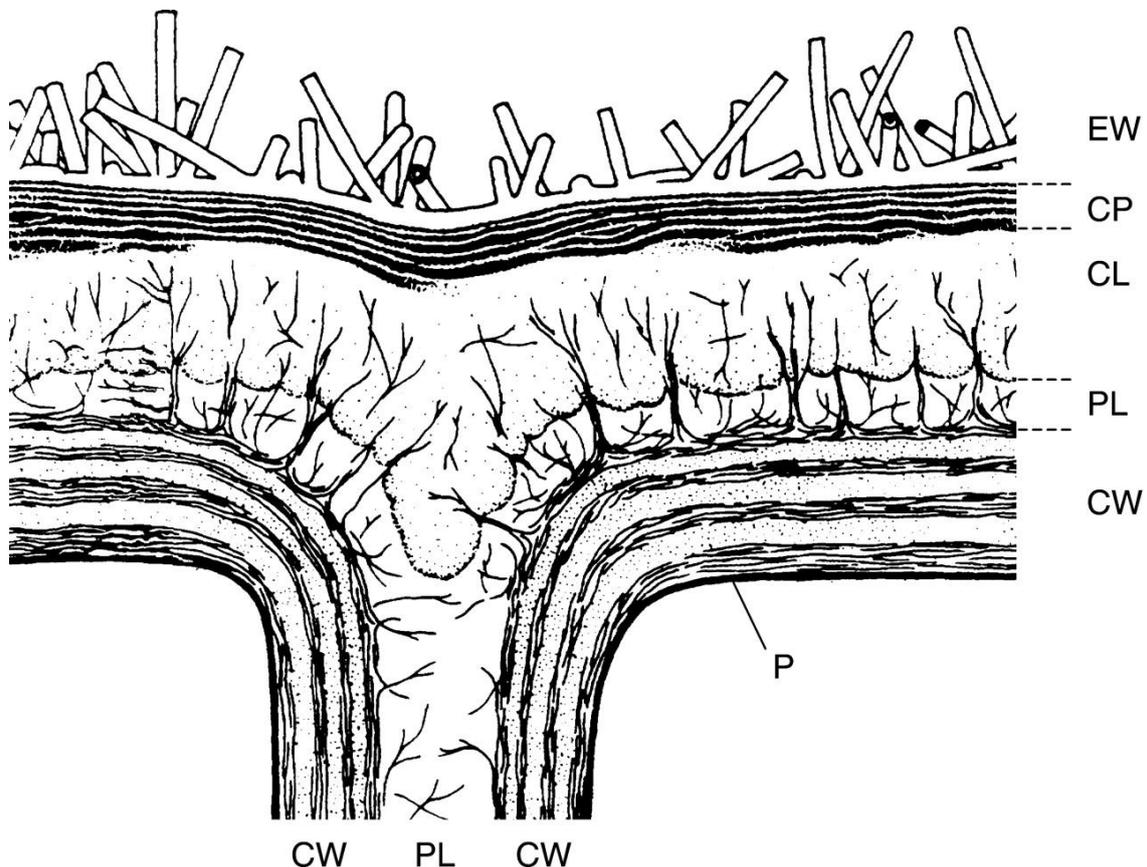
## **1.1 Hydrophobe Grenzflächen als Barrieren**

Vor etwa 400 Millionen Jahren begann die Besiedelung des Festlandes durch Pflanzen um neuen Lebensraum zu gewinnen (Riederer 1991). Die terrestrische Lebensweise mit den neuen klimatischen Bedingungen bedingten umfassende Anpassungen der Pflanzen. Eine der größten Herausforderungen stellten begrenzte Wasserressourcen im Boden und das hohe negative Wasserpotential der Atmosphäre dar. Waren die Pflanzen zuvor von Wasser umgeben, mussten sie nun besondere Schutzmechanismen entwickeln um ihren Wasserhaushalt weiter aufrecht zu erhalten. Eine Form stellte die Evolution hydrophober Grenzflächen dar, welche bis heute sowohl ober- als auch unterirdische Organe durch Barrieren vor unkontrolliertem Wasserverlust schützen (Riederer und Schreiber 2001). Die Wichtigkeit dieser Grenzflächen wird dadurch unterstrichen, dass sie artübergreifend in allen höheren Pflanzen ausgebildet werden (Kolattukudy 1980).

### **1.1.1 Die Kutikula**

Die Kutikula stellt die Grenzfläche aller primären oberirdischen Organe (Sprossachse, Blätter, Blüte und Früchte) zur Atmosphäre dar (Riederer und Schreiber 2001). Die Hauptaufgabe der Kutikula ist der Schutz vor unkontrollierter Transpiration. Die Barriereeigenschaft der Kutikula übersteigt, trotz der geringen Stärke der Kutikula von 0,1 bis 10  $\mu\text{m}$ , die Barriereeigenschaft synthetischer Folien gleicher Dicke. Die stomatäre Transpiration liefert die treibende Kraft zur Wasserversorgung für den gesamten Pflanzenkörper über die Wurzel und ermöglicht den Gasaustausch zur Aufnahme von Kohlendioxid und Abgabe von Sauerstoff (Riederer 1991). Des Weiteren schützt die Kutikula die Pflanze vor biotischen (Pathogenen, Insekten) und abiotischen Stressoren (UV-Strahlung, Nährstoffauswaschung durch Regen). Die Kutikula kann eine raue Oberflächenstruktur aufweisen. Diese Modifikation wird durch Wachskristalle oder Kutikularfaltung hervorgerufen und trägt zur selbstreinigenden Fähigkeit der Blattoberfläche bei was auch als Lotus-Effekt bekannt ist (Neinhuis und Barthlott 1997). Dabei werden anhaftende Partikel oder Pathogene durch Regenwasser abgespült. Des Weiteren wird die Rolle der Kutikula bei der Organdifferenzierung spekuliert, da bei Mutanten des Kutinstoffwechsels häufig Organfusionen beobachtet werden (Nawrath 2002).

Die Kutikula wird durch die Epidermis des Blattes, des Sproßes und der Früchte gebildet. Sie ist in ihrem strukturellen und chemischen Aufbau heterogen (Abbildung 1-1) und weist artspezifische Unterschiede auf (Kolattukudy 1980; Pollard et al. 2008). Das Polymer besteht aus einem depolymerisierbaren Anteil, dem Kutin, und einem nicht depolymerisierbaren Anteil, dem Kutan, wobei letzteres durchaus die Hälfte des Polymers ausmachen kann. Aliphatische Fettsäurederivate, insbesondere mittkettig oxygenierte Säuren und  $\omega$ -Hydroxysäuren, mit Kohlenstoffkettenlängen von  $C_{16}$  und  $C_{18}$  repräsentieren die Hauptbestandteile des Kutinpolyesters höherer Pflanzen (Tabelle 1-1). Disäuren, Fettsäuren, Alkohole und Aromaten kommen in geringeren Mengen vor. Die monomeren Bausteine sind über Esterbindungen untereinander und mit Glycerin zu einer dreidimensionalen Polyestermatrix verknüpft, welche mit der Zellwand kovalent verbunden ist (Graca et al. 2002).



**Abbildung 1-1 Schematische Darstellung der Kutikula im Querschnitt**

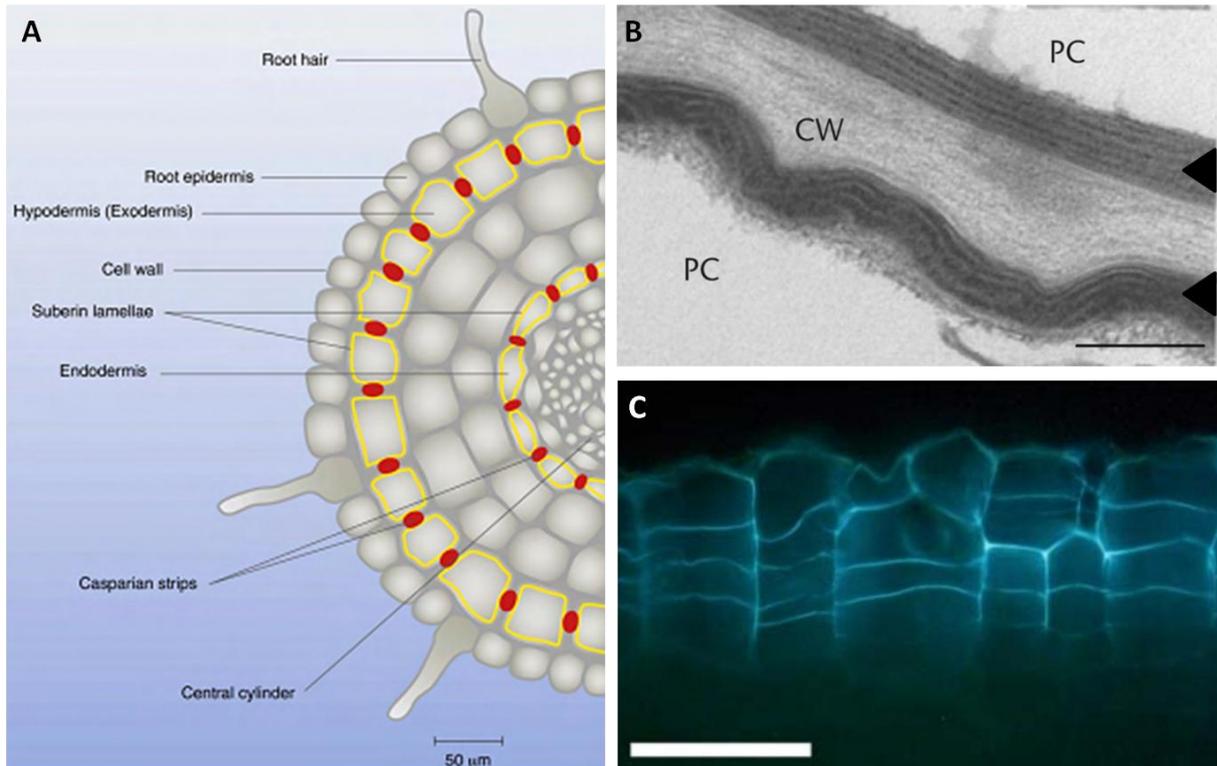
Die Kutikula bedeckt die äußere Zellwand (CW: cell wall) epidermaler Zellen oberirdischer Organe. Von der Zelle ausgehend ist die Plasmamembran (P: plasma lemma), eine zellulosereiche Schicht (CW: cell wall) und eine pektinreiche Schicht (PL: pectinaceous layer) anzutreffen, worauf die Kutikula folgt. Diese besteht aus der Kutikularschicht (CL: cuticular layer), welche Zellulosefibrillen beinhaltet, und einer Kutinschicht mit intrakutikulären Wachsen (CL: cuticular proper), der epikutikuläre Wachse (EW: epicuticular wax) aufgelagert sein können (aus Buchholz 2006 modifiziert nach Jeffree 1986).

Die Lösemittel-löslichen Bestandteile der Kutikula werden als Wachse bezeichnet, diese sind in der Polymermatrix ein- und aufgelagert (Kunst und Samuels 2003). Sie bestehen aus einem Gemisch lipophiler aliphatischer Fettsäurederivate (Fettsäuren, primäre und sekundäre Alkohole, Aldehyde, Ester, Alkane und Ketone) mit Kohlenstoffkettenlängen von C<sub>20</sub> bis C<sub>60</sub>, Triterpenoiden und Sterolen (Samuels, Kunst und Jetter 2008). Sie dichten das Polymergerüst ab, da nach dessen Extraktion ein Anstieg der Wasserpermeabilität um das 100- bis 1000-fache beobachtet werden kann (Schreiber 2010; Samuels, Kunst und Jetter 2008). Das Kutan ist nicht über Esterbindungen sondern über Etherbindungen und direkte C-C-Bindungen verknüpft, so dass eine Umesterung nicht möglich ist (Kolattukudy 2001). Man geht davon aus, dass die gleichen Monomere wie im Kutin vorhanden sind, diese jedoch radikalisch miteinander verknüpft werden.

### **1.1.2 Suberinisierte Grenzflächen**

Suberinisierte Grenzflächen kommen im Gegensatz zur Kutikula in verschiedenen Geweben der Pflanzen vor. Sie treten sowohl in unterirdischen als auch oberirdischen Organen der Pflanze auf und fungieren nicht nur als Grenzfläche zur Umwelt sondern trennen auch innerhalb der Pflanze funktionale Gewebe voneinander. So befinden sich suberinisierte Gewebe in sekundären Abschlussgeweben der Sprossachse und Wurzel höherer Pflanzen (Periderm), in der Wurzelendodermis, in Bündelscheidezellen von C<sub>4</sub>-Pflanzen, in Samenschalen und in Wundperidermen (Abbildung 1-2; (Li-Beisson 2011; Schreiber et al. 2005).

In der Wurzel bildet die Endodermis (Abbildung 1-2A), zwischen Zentralzylinder und Rindenparenchym lokalisiert, durch Bildung des Casparystreifen im Apoplasten eine physiologische Barriere aus. Als Casparystreifen wird die Suberinisierung der antiklinalen Zellwände der Endodermiszellen bezeichnet, welche die apoplastische Transportbarriere zur Kontrolle der Wasser und Nährstoffe darstellt (Ranathunge et al. 2011). In späteren Entwicklungsstadien kann eine weitere Suberindeposition zwischen Zellwand und Zellmembran beobachtet werden, welche eine lamellare Struktur aufweist (Abbildung 1-2A-B). Auch der Apoplast der Hypodermis kann durch Suberinisierung eine physiologische Barriere darstellen, bei Ausprägung eines Casparystreifens wird sie als Exodermis bezeichnet.

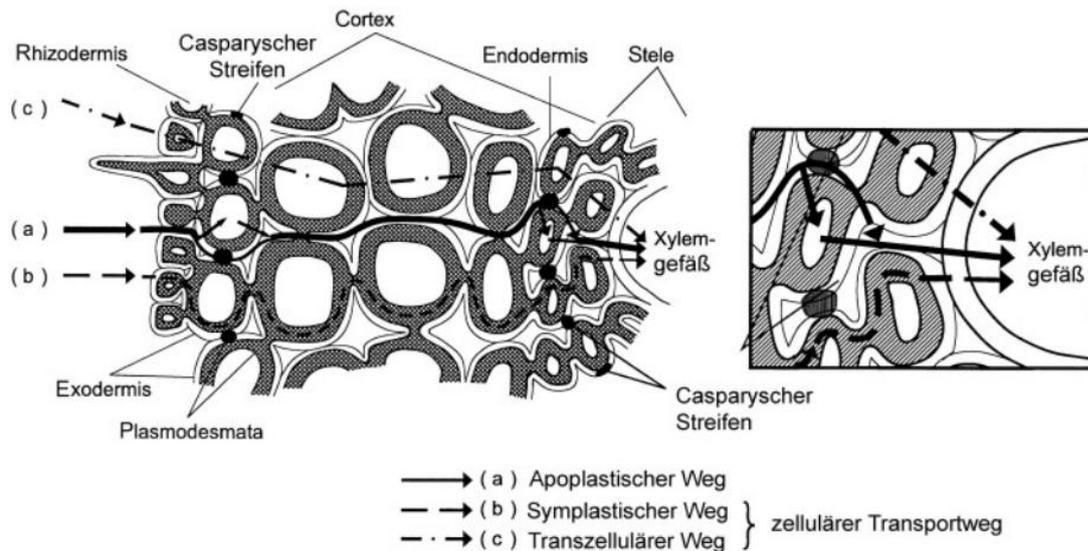


**Abbildung 1-2 Suberinisierte Gewebe**

(A) Schematische Darstellung eines Wurzelquerschnitts nach Schreiber (2010). Die Wurzel wird durch die Rhizodermis (*root epidermis*), mit Wurzelhaaren (*root hairs*), zur Umwelt hin abgegrenzt. Darunter befindet sich die Hypodermis mit Suberineinlagerungen, die bei Ausbildung von Casparian-Streifen (*casparian strips*) als Exodermis bezeichnet wird. In der Wurzel trennt die suberinisierte Endodermis als innere Abgrenzung das Rindenparenchym vom Zentralzylinder. (B) Ultrastruktur der Zellwand (CW) von Wurzelperidermzellen (PC) im Transmissionselektronenmikroskop. Die Suberinisierung (Dreiecke) weist eine lamellare Struktur auf (aus Li-Beisson 2011). (C) Querschnitt eines Wundperiderms der Kartoffelknolle unter dem Mikroskop bei 365 nm (Schreiber et al. 2005). Die Wundperidermbildung führt zur Suberinisierung mehrerer Zelllagen. Aromatische Einlagerungen im Wundperiderm verursachen die Autofluoreszenz unter UV-Licht. Maßstab: (B) 0,2 µm, (C) 100 µm

Über die Transpiration verlieren Pflanzen stetig Wasser. Um diesen Verlust auszugleichen werden Wasser und darin gelöste Nährstoffe über die Wurzel aufgenommen. Dies geschieht hauptsächlich in der Wurzelhaarzone die eine stark vergrößerte Oberfläche aufweist (Abbildung 3, Steudle und Peterson 1998). Dieser Vorgang ist rein passiv und funktioniert über die Diffusion. Der Wasserpotentialgradient, verursacht durch die Transpiration, liefert die treibende Kraft für den Wasserstrom aus dem Boden über die Pflanze zur Atmosphäre. Das Wasser und die darin gelösten Nährstoffe durchqueren den Wurzelquerschnitt zentripetal zu den Leitgeweben. Zur Durchquerung des Rindenparenchyms kann das Wasser mehrere Wege beschreiten: durch das Kontinuum der Zellwände (Apoplast), das Kontinuum der Cytoplasma (Symplast) oder transzellulär, d.h. beide Wege zusammen. In der Endodermis erschweren die hydrophoben Suberineinlagerungen der endodermalen

Zellwände den apoplastischen Wassertransport. Dies erlaubt die Kontrolle der Stoffaufnahme bei dem Übertritt in das Cytoplasma über die Plasmamembran und verhindert die Aufnahme toxischer Bestandteile sowie den Rückfluss des Wassers bei Trockenheit (Steudle 2002).



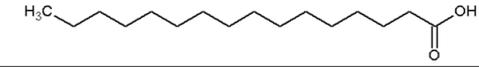
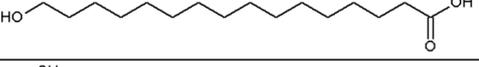
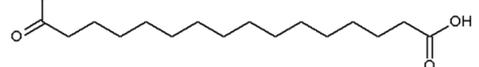
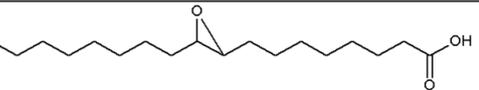
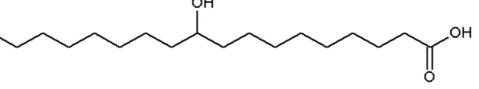
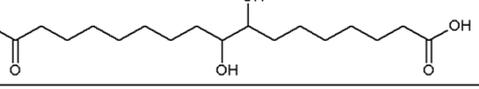
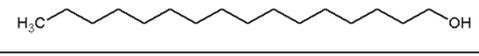
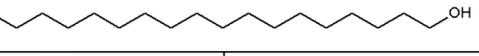
**Abbildung 1-3 Transportwege des Wassers und darin gelöster Nährstoffe in der Wurzel**

Schematische Darstellung des Wassertransportwegs in der Wurzel nach Steudle (1998). In dem Teilausschnitt des Wurzelquerschnitts symbolisieren die Pfeile die möglichen Routen des Wassers. Der durchgehende Pfeil beschreibt den apoplastischen Weg, der gestrichelte Pfeil die symplastische Route und der Strich-Punkt-Pfeil den transzellulären Weg.

Suberin besteht ähnlich wie die Kutikula aus einem Polymer mit einem depolymerisierbaren Anteil, dem Suberinpolyester, und einem nicht depolymerisierbaren Anteil, dem Suberan (Kolattukudy 2001). Chemisch betrachtet ähneln sich Kutin und Suberin dadurch, dass dieselben Substanzklassen vertreten sind, deren mengenmäßige Zusammensetzung jedoch deutliche und charakteristische Unterschiede aufweist (Tabelle 1-1). Das Suberinpolyester besteht aus aliphatischen Fettsäurederivaten, hauptsächlich Disäuren und  $\omega$ -Hydroxysäuren mit Kohlenstoffkettenlängen von  $C_{16}$  bis  $C_{24}$  und Aromaten die über Esterbindungen miteinander und mit Glycerin verknüpft sind.

**Tabelle 1-1 Zusammensetzung des Kutin- und Suberinpolyesters höherer Pflanzen**

Allgemeine Strukturformeln und relative Häufigkeit typischer Monomere der Polyester Kutin und Suberin verändert nach Pollard (2008). Es sind auch Isomere und ungesättigte Verbindungen der genannten Substanzen in den Polyestern vertreten, deren Strukturformeln hier nicht separat abgebildet wurden. Anzahl der Doppelbindungen hinter dem Doppelpunkt.

Substanzklasse	Struktur	Kutin		Suberin	
Säuren		1-25 %		1-10 %	
		$C_{16}$ , $C_{18}$ , $C_{18:1}$ , $C_{18:2}$		$C_{18}$ bis $C_{24}$	
$\omega$ -Hydroxysäuren		1-32 %		11-43 %	
		$C_{16}$ , $C_{18:1}$ , $C_{18:2}$		$C_{16}$ bis $C_{26}$ , $C_{18:1}$	
$\alpha$ , $\omega$ -Disäuren		< 5 %		24-45 %	
		$C_{16}$ , $C_{18}$ , $C_{18:1}$ , $C_{18:2}$		$C_{16}$ bis $C_{26}$ , $C_{18:1}$ , $C_{18:2}$	
<u>mittkettig oxygenierte Säuren</u>					
Epoxyssäuren		0-34 %		0-30 %	
		$C_{18}$ , $C_{18:1}$		$C_{18:1}$ , $C_{18}$ -Disäuren	
Polyhydroxysäuren		16-92 %		0-2 %	
		$C_{16}$ , $C_{18}$ - Trihydroxysäure		$C_{18}$ - Trihydroxysäure	
Polyhydroxydisäuren		Spuren		0-8 %	
				$C_{18}$ - Dihydroxysäure	
Alkohole		0-8 %		1-6 %	
		$C_{16}$ , $C_{18}$		$C_{16}$ bis $C_{22}$	
$\alpha$ , $\omega$ -Diöle		0-5 %		0-3 %	
		$C_{18:1}$		$C_{22}$	
Ferulasäure (Fe), Glycerin (Gl)		(Fe) 0-1 %	(Gl) 1-14 %	(Fe) 0-10 %	(Gl) 14-26 %

Chemisch charakteristische Unterscheidungsmerkmale des Suberins gegenüber dem Kutin sind höhere Mengen an Disäuren, Fettsäurederivaten höherer Kettenlängen (> $C_{20}$ ) und aromatischen Bestandteilen (Tabelle 1-1; Pollard et al. 2008). Die Bestandteile des Suberans sind vorwiegend aromatischer Herkunft, hauptsächlich Ferulasäuren und geringe Mengen Monolignole, die über nicht depolymerisierbare Kohlenstoff- und Etherbindungen verknüpft sind (Kolattukudy 2001). Das Suberinpolymer bildet eine dreidimensionale Matrix, welche kovalent mit dem Apoplasten verknüpft ist und in dem Lösemittel-lösliche Bestandteile eingelagert sind. Diese werden als Suberin assoziierte Wachse bezeichnet und sind chemisch den Suberinmonomeren ähnlicher als die kutikulären Wachse dem Kutin. Charakteristische Bestandteile der Suberin assoziierten Wachse sind langkettige Aliphaten (Säuren, Alkohole, Aldehyde, sekundäre Alkohole, Ketone) und aromatische Ester.

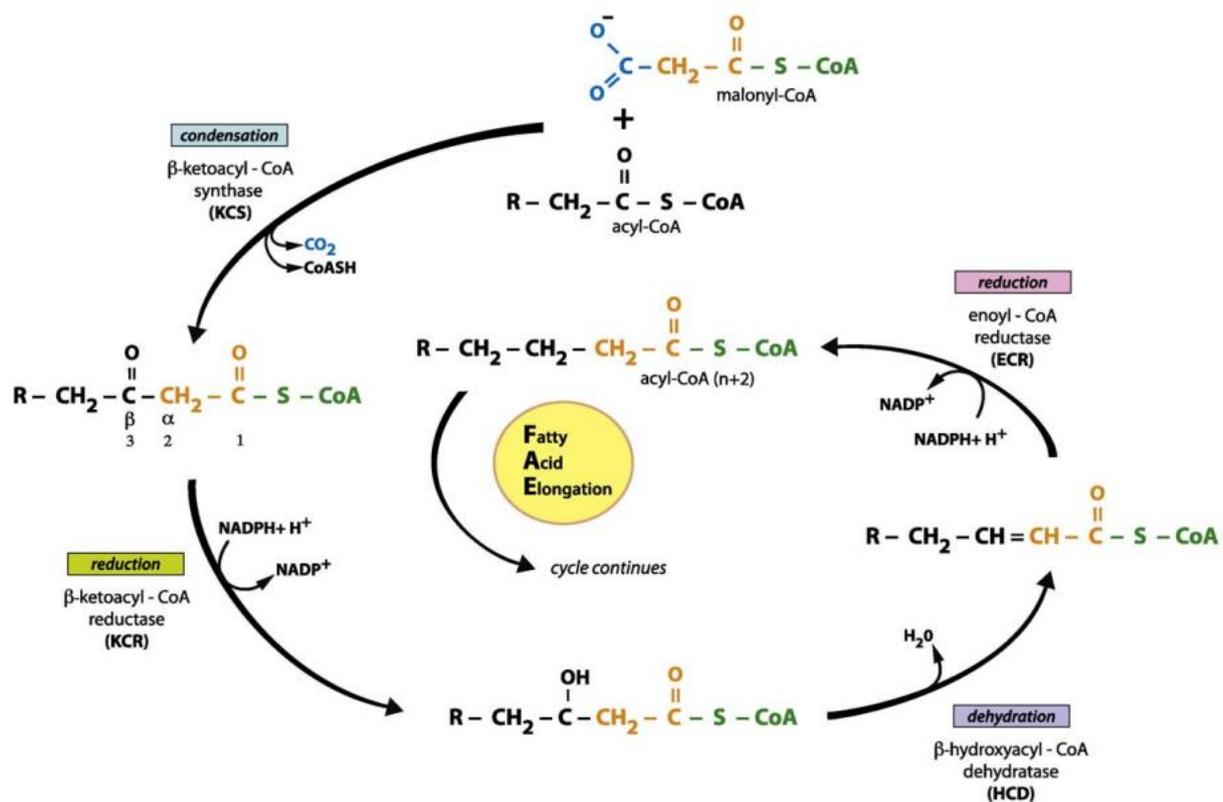
## 1.2 Aufklärung zur chemischen Zusammensetzung und Synthese der Polyester

Bereits im 19. Jahrhundert wurden die ersten Untersuchungen zur Zusammensetzung von Suberin und Kutin durchgeführt (Kolattukudy 2001; Kolattukudy 2005). Bei der salpetersauren Degradierung des Korksuberins wurde fälschlicherweise das Zersetzungsprodukt Suberinsäure (C<sub>8</sub>-Disäure) als Hauptbestandteil identifiziert. Erst Mitte des 20. Jahrhunderts konnten durch adäquatere Analysemethoden zur Depolymerisierung und Identifizierung die Bausteine der Biopolymere identifiziert werden. Studien zur Zusammensetzung von Kutin und Suberin durch Holloway und Kolattukudy in den 70er Jahren lieferten das heute noch bestehende Bild der Biopolymere. Die Erforschung der Biopolymer-Synthese wurde erst Ende des 20. Jahrhunderts mit der Nutzung von *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) vorangetrieben. Die landwirtschaftlich eher unbedeutende Acker-Schmalwand oder Schotenkresse startete Mitte des letzten Jahrhunderts eine Karriere als Modellpflanze in der molekulargenetischen Botanik die bis heute anhält (Meinke et al. 1998). Aufgrund des sequenzierten Genoms, eines kurzen Generationszyklus sowie etablierten Methoden für die Molekulargenetik und Samenbanken für Mutanten bildete *A. thaliana* eine ideale Modellpflanze für die botanische Grundlagenforschung. Die Suberinzusammensetzung der Arabidopsiswurzel ähnelt der anderer höherer Pflanzen (Franke et al. 2005). Die Kutinzusammensetzung der Blätter und der Sprossachse hingegen ist durch einen ungewöhnlich hohen Disäuregehalt gekennzeichnet und ähnelt somit der Suberinzusammensetzung (Bonaventure et al. 2004; Nawrath 2006). Das Kutin der Blüte, reich an mittkettig oxygenierten Hydroxysäuren und  $\omega$ -Hydroxysäuren, weist wiederum eine für das Kutin von Dikotylen typische Zusammensetzung auf (Bessire et al. 2011).

### 1.2.1 Synthese der Polyester Kutin und Suberin

Die Grundbausteine zur Synthese der aliphatischen Biopolymerbestandteile sind plastidäre C<sub>16</sub>-, C<sub>18</sub>- und C<sub>18:1</sub>-Fettsäuren. Diese werden durch Enzyme modifiziert, welche mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) assoziiert sind. Die Fettsäuren können durch Elongasen des ER-assoziierten Fettsäureelongationskomplexes (FAE) sukzessiv um zwei Kohlenstoffeinheiten verlängert werden. Dabei entstehen Fettsäuren

$\geq C_{20}$  bis zu Kettenlängen von  $C_{36}$ , die auch als VLCFA (*very long chain fatty acids* =sehr langkettige Fettsäuren) bezeichnet werden (Abbildung 1-4, Joubes et al. 2008; Nawrath 2006). Als Beispiel für Enzyme, die an der Kutikula- und der Suberinbildung beteiligt sind, kann die  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase KCS2 aufgeführt werden. Mithilfe von KCS2-Mutanten konnte in *A. thaliana* die Beteiligung an der Fettsäureelongation sowohl für aliphatische Wachs- als auch für aliphatische Suberinbestandteile nachgewiesen werden (Franke et al. 2009; Lee et al. 2009).



**Abbildung 1-4** Synthese von VLCFA im Fettsäureelongationskomplex

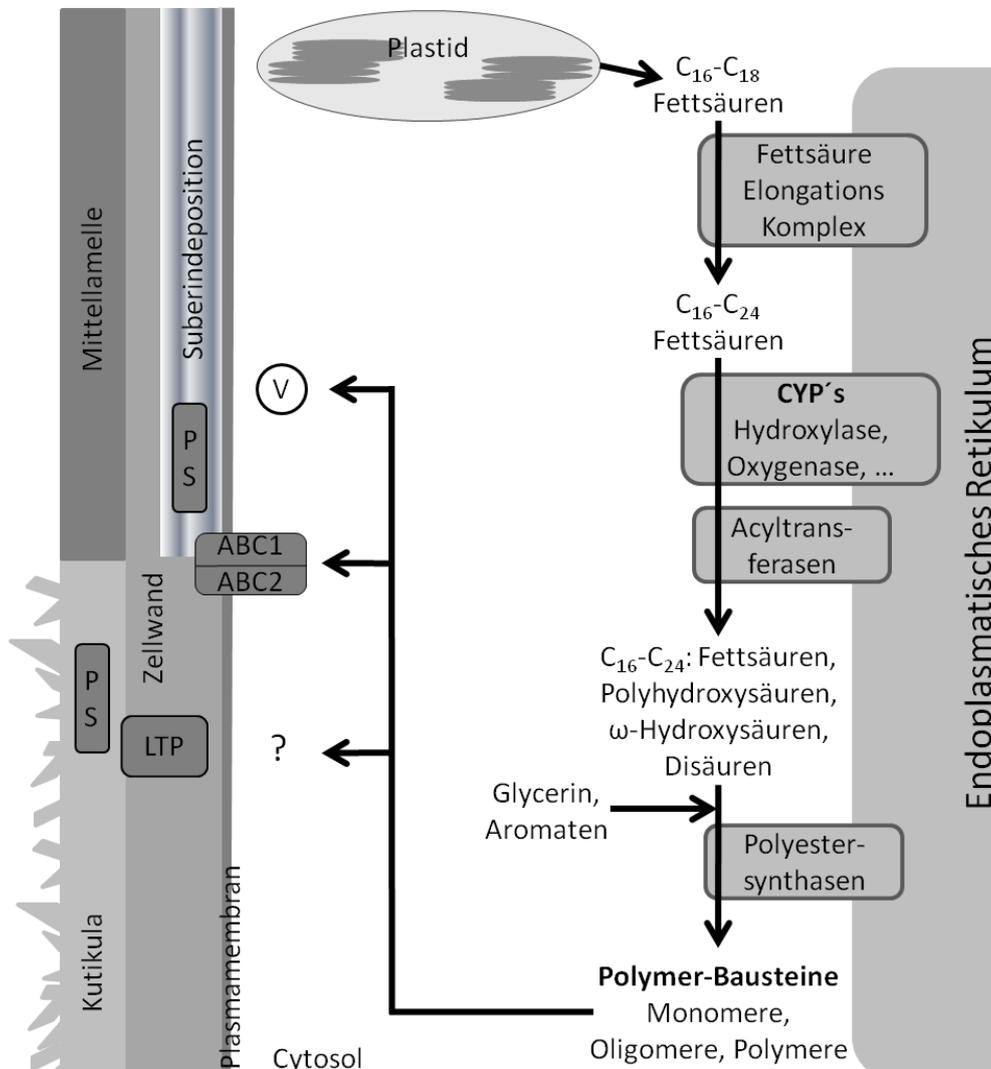
Synthese von VLCFA (*very long chain fatty acids*) im ER-Membran lokalisierten Fettsäureelongationskomplex nach Kunst und Samuels (2009). Die Elongation startet mit der Verknüpfung von Malonyl-CoA mit Acyl-CoA durch  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthasen (KCS). Unter Abspaltung von CO<sub>2</sub> und Coenzym A entsteht  $\beta$ -Ketoacyl-CoA, welches durch  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Reduktasen (KCR) unter NADPH+H<sup>+</sup>-Verbrauch zu  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA reduziert wird. Im nächsten Schritt wird durch  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen (HCD) Wasser abgespalten und es entsteht Enoyl-CoA. Letzteres wird durch Enoyl-CoA-Reduktasen (ECR) unter NADPH+H<sup>+</sup>-Verbrauch zum Acyl-CoA reduziert, welches nun um zwei Kohlenstoffeinheiten verlängert ist. Das elongierte Produkt kann erneut in den Elongationszyklus eingehen.

Die Fettsäuren können anschließend durch Hydroxylasen, Oxidasen, Epoxygenasen und weitere Enzyme funktionalisiert werden. Einige dieser Enzyme und der dafür codierenden Gene wurden bereits charakterisiert; so führen viele Mitglieder der CYP86-Familie Hydroxylierungen der  $\omega$ -Methylgruppe aliphatischer Säuren durch, näheres in

Kapitel 1.2.2. Für die Reaktionen müssen Edukte aktiviert werden, Mitglieder der LACS-Familie (*long chain acyl-CoA-synthase*) führen Veresterungen der Säuregruppe mit Coenzym A durch, sodass aktivierte Thioesterderivate entstehen. Die Mutation des *LACS2*-Gens in *A. thaliana* führte zu Defiziten in den Lipiden der Blattkutikula (Schnurr et al. 2004). Die Rolle von *LACS2* als Thioestersynthase zur Aktivierung von Säurederivaten mit Coenzym A konnte durch in vitro Studien gestützt werden, die eine hohe Spezifität für  $C_{16}$ - $\omega$ -Hydroxysäure belegten. Auch für das *LACS1*-Gen konnte mithilfe von Knockoutlinien in *A. thaliana* die Beteiligung an der Kutin- und Wachsbiosynthese in der Sprossachsen- und Blattkutikula festgestellt werden (Lü et al. 2009). Durch in vitro Studien konnte die Thioestersynthaseaktivität für Fettsäuren mit Kettenlängen von  $C_{16}$  bis  $C_{30}$  nachgewiesen werden. Es wird spekuliert, dass LACS-ähnliche Enzyme auch bei der Suberinsynthese beteiligt sind (Franke und Schreiber 2007). Acyltransferasen der GPAT-Familie und der BAHD-Familie spielen bei der Polymersynthese eine tragende Rolle, näheres zu letzterem in Kapitel 1.2.3. Den bisher untersuchten Mitgliedern der GPAT-Familie (*glycerol-3-phosphat-acyltransferase*) konnte in vitro eine Funktion als Acyltransferase nachgewiesen werden, wobei Coenzym A-aktivierte Fettsäuregruppen auf Glycerinderivate übertragen werden (Beisson et al. 2012). Mangelmutanten des *GPAT5*-Gens in *A. thaliana* weisen verringerte Mengen an Disäuren und  $\omega$ -Hydroxysäuren im Samenschalenpolyester und ein Mangel an VLCFA im Wurzelsuberin auf, was ein Indiz auf die Beteiligung an der Polymerbildung darstellt (Beisson et al. 2007). In *A. thaliana* konnte für Mangelmutanten des *GPAT4*- und *GPAT8*-Gens ein Defizit an Polyesterbestandteilen im Blatt- und Sprossachsenkutin und für das *GPAT6*-Gen im Blütenkutin nachgewiesen werden, was ebenfalls auf eine Beteiligung an der Polyesterbildung deutet (Li et al. 2007; Li-Beisson et al. 2009b). Es wird spekuliert, dass die Positionierung der Acylgruppe auf das Glycerin ausschlaggebend für die Unterscheidung im Stoffwechsel ist, da GPAT bevorzugt Monoacylglycerole für Membran- und Speicherlipide auf sn-1 (*stereo specific number*) und GPAT4 bis 6 Polyesterlipide auf sn-2 positioniert (Li-Beisson 2011).

Die genannten Beispiele lassen sich fortsetzen und belegen die Aktivität von Enzymen in den Biosynthesewegen beider Polyester die denselben Familien angehören und die gleichen Reaktionen katalysieren. Somit ähneln sich die beiden Polyester nicht nur in ihrer Funktionalität als hydrophobe Barriere und in ihrer chemischen Komposition; die

Gemeinsamkeit der Polyester setzt sich in den Lipidsynthesemaschinerien fort (Li-Beisson 2011; Beisson et al. 2012). Basierend darauf können die Lipidsynthesen beider Polyester gemeinsam betrachtet werden (Abbildung 1-5).



**Abbildung 1-5 Syntheschema der Biopolyester Kutin und Suberin**

Schematische Darstellung einer fiktiven Kutin und Suberin bildenden Zelle. Plastidäre  $C_{16}$ - und  $C_{18}$ -Fettsäuren können durch ER-assoziierte Proteine verlängert und modifiziert werden. Acyltransferasen spielen eine Rolle bei der Aktivierung der Monomere mit Coenzym A oder Verknüpfung miteinander oder Glycerin. Die entstandenen Fettsäurederivate (Fettsäuren, Polyhydroxysäuren, etc.) werden zu Polymerbausteinen verknüpft und exportiert. Der Transfer der Bausteine, zur Membran und der Export in den Apoplasten, ist nicht vollständig aufgeklärt. Es besteht die Möglichkeit, dass die Bausteine über freie Diffusion, durch sekretorische Vesikel (V) oder mithilfe von LTP-s (Lipidtransferproteine) zur Plasmamembran gelangen und vesikulär, durch ABC-Transporter oder auf andere Weise exportiert werden. Indizien legen nahe, dass in der Zellwand Polyestersynthasen (PS) vorhanden sind die die Bausteine in die Polyester matrix einbauen. Bei der Kutikulabildung wird spekuliert ob LTP-s lipophile Polymerbausteine durch die hydrophile Zellwand transportieren

Viele Schritte der Polymersynthese sind noch nicht aufgeklärt. So ist nicht bekannt in welcher Form die Monomere in den Reaktionen vorliegen (Abbildung 1-6) bzw. in welcher Reihenfolge die Reaktionen ablaufen (Pollard et al. 2008). Es wäre möglich, dass freie Fettsäuren, Coenzym A-aktivierte Acyl-Derivate oder auch Acylglycerine als Reaktanden fungieren. Auch sind Transportform und Transportart der Polymerbausteine vom Syntheseort zur Zellmembran sowie der Export aus dem Protoplasten nicht aufgeklärt. Die Polyesterbestandteile könnten bereits in der Zelle zu Polymer-Bausteinen (Dimere, Oligomere oder Polymere) verknüpft werden. Dazu konnte Molina et al. (2009) mithilfe von *ASFT*-Mutantenlinien (*aliphatic suberin feruloyl transferase*) Indizien liefern. *ASFT*-Knockoutlinien in *A. thaliana* fehlen im Samenschalenpolyester  $\omega$ -Hydroxysäuren und Ferulasäuren im stöchiometrischen Verhältnis. Dies lieferte das Indiz, dass die beiden Monomere möglicherweise als Dimer eine Einheit in der Polymersynthese darstellen. Die Bausteine könnten durch freie Diffusion, mithilfe von Transportproteinen oder vesikulär zur Membran gelangen und durch ABC-Transporter exportiert werden (Beisson et al. 2012). Indizien führen zu der Annahme, dass Proteine in der Zellwand an der Assemblierung des Polymers beteiligt sind. *LTPG* (*lipid transfer protein glycosylphosphatidylinositol-anchored*) ist ein membrangebundenes Protein was im Apoplasten der Epidermis von Blättern und Sprossachsen lokalisiert ist. Die Mutation des Gens in *A. thaliana* führt zu einem Wachsmangel (De Bono et al. 2009). Durch in vitro-Studien konnte eine Lipidbindefähigkeit des Proteins nachgewiesen werden, woraus man schloss, dass das Protein möglicherweise lipophile Polymerbausteine durch die hydrophile Zellwand zur Kutikula transportiert. Des Weiteren konnte in *A. thaliana* *BDG* (*BODYGUARD*) als Kandidat einer Polyestersynthese identifiziert werden (Kurdyukov et al. 2006a). *BDG* gehört der Superfamilie der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen an und ist in der Epidermiszellwand lokalisiert. Die Mutation des Gens führt zur Akkumulation von Kutinbestandteilen und einer veränderte Zellwand-Ultrastruktur. Ähnliche Veränderungen konnten in einer Mutante von *A. thaliana* beobachtet werden in der eine pilzliche Kutinase, ebenfalls eine  $\alpha/\beta$ -Hydrolase, heterolog exprimiert wurde. Diese Indizien führen zu der Hypothese, dass es sich bei *BDG* um eine Kutinsynthese (Polyestersynthese) handelt.

Um die komplexen Vorgänge bei der Polymerbildung zeitlich und räumlich koordiniert vorzustattengehen zu lassen bedarf es der genetischen Kontrolle der beteiligten Enzyme.

Bisher konnte eine Transkriptorenfamilie in *A. thaliana* identifiziert werden die eindeutig an der Kutikulabildung beteiligt ist; näheres dazu in Kapitel 1.2.5.

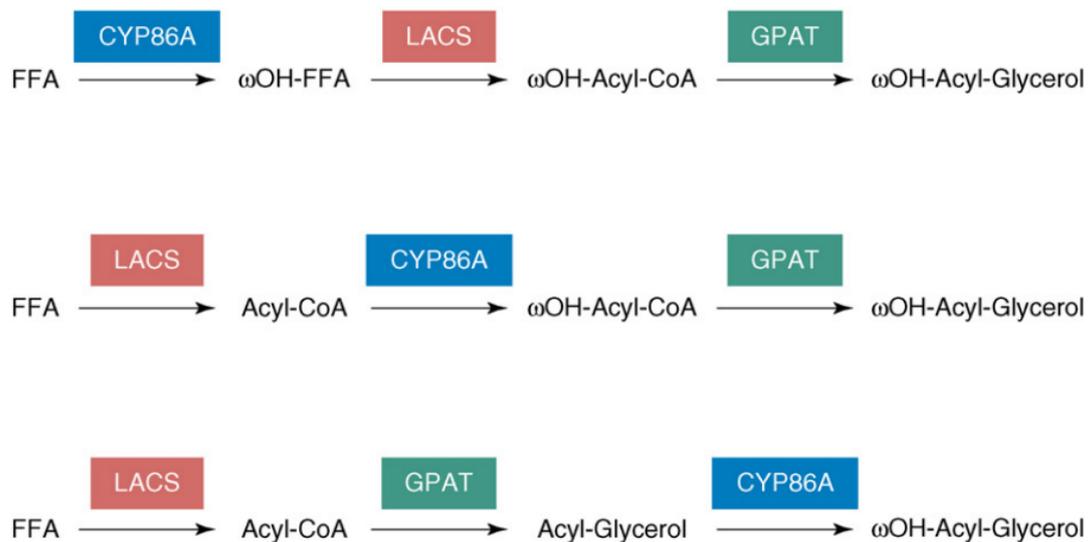


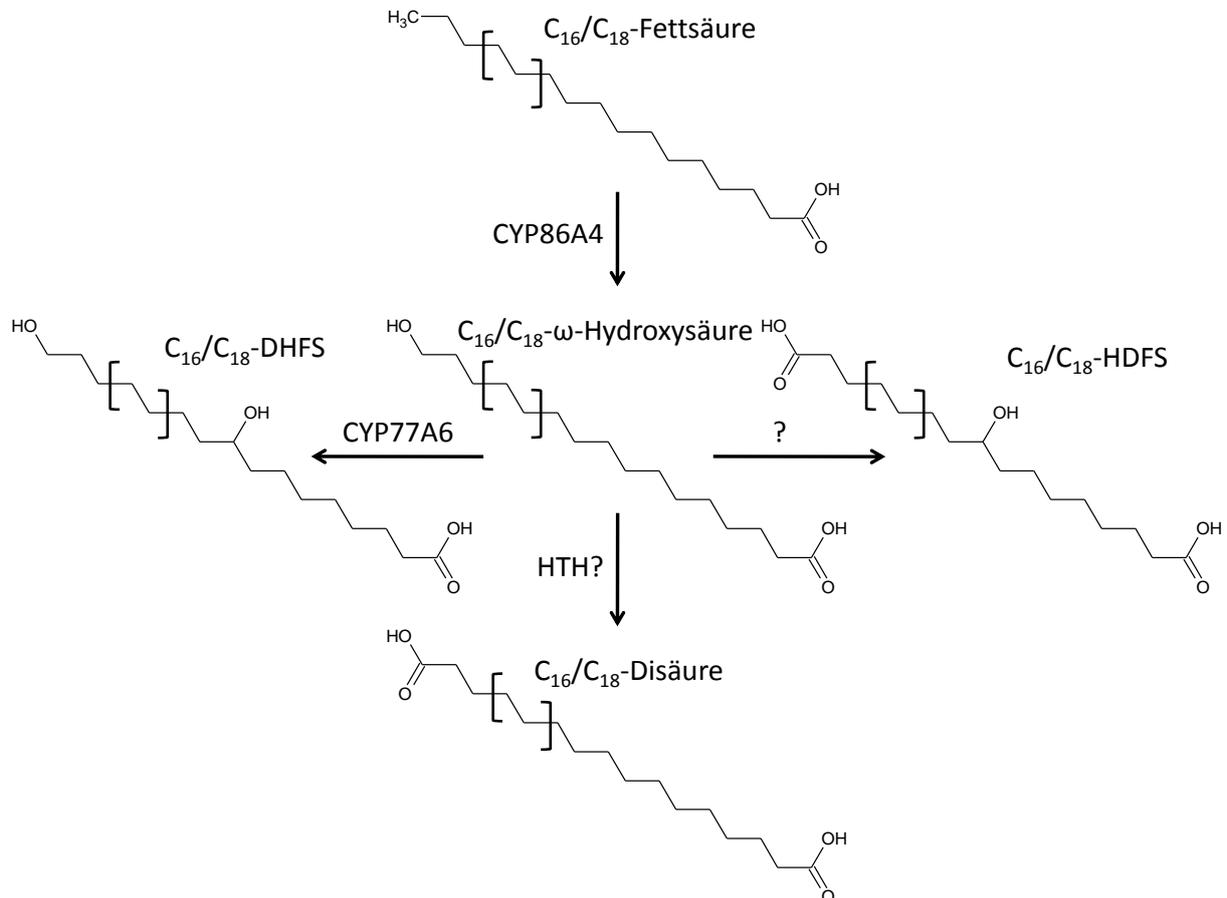
Abbildung 1-6 Synthese von  $\omega$ -Hydroxysäureglycerin

Die Abbildung (Pollard 2008) stellt mögliche Reaktionsreihenfolgen zur Synthese des  $\omega$ -Hydroxysäureglycerins ( $\omega$ OH-Acyl-Glycerol) dar, wobei die Reaktion mit freien Fettsäuren (FFA: *free fatty acids*) startet. In den Zwischenschritten findet eine Aktivierung mit Coenzym A durch eine Thioestersynthese (LACS), die Hydroxylierung an der  $\omega$ -Position durch eine Hydroxylase (CYP86) und die Verknüpfung mit Glycerin durch eine Acyltransferase (GPAT) statt.

## 1.2.2 Die Familie der Cytochrom P450 Monooxygenasen

Cytochrom P450 Monooxygenasen sind ubiquitär in allen Organismen vertreten und stellen eine der größten Superfamilien im Pflanzenreich dar (Nelson 2006; Pinot und Beisson 2011). Die Bezeichnung P450 steht für „Pigment 450 nm“ und resultiert aus der physikalisch-chemischen Eigenschaft des Proteins, das bei Bindung von Kohlenmonoxid am katalytischen Zentrum anstelle von Sauerstoff eine Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 450 nm erfährt (Werck-Reichhart und Feyereisen 2000). In Pflanzen liegen die CYP's als membrangebundene Proteine vor, deren katalytisch aktive Domäne zum Cytoplasma gerichtet ist (Chapple 1998; Rupasinghe und Schuler 2006). Basierend auf Aminosäuresequenzhomologien werden die Mitglieder der CYP-Superfamilie in Familien (> 40 %), Unterfamilien (> 55 %) oder in Allele (> 97 %) eingeteilt (Rupasinghe und Schuler 2006). Allen Proteinen der CYP-Superfamilie ist das katalytische Zentrum gemein. Dort befindet sich eine kurze Aminosäuresequenz mit einem hochkonservierten Cystein welches mit einer Häm-Eisen-Gruppe assoziiert ist (Rupasinghe und Schuler 2006; Werck-Reichhart et al. 2002). Mitglieder dieser

Superfamilie sind an sehr verschiedenen Stoffwechselfvorgängen wie der Detoxifikation und Synthesen von Pigmenten, Sterolen, Hormonen und weiteren Sekundärmetaboliten beteiligt, wobei häufig die Insertion von molekularem Sauerstoff Teil der Reaktion ist, woher die Bezeichnung auch als Monooxygenasen stammt (Werck-Reichhart et al. 2002).



**Abbildung 1-7 Syntheseweg der Polyesterhauptbestandteile im Kutin und Suberin**

Die enzymatische Funktionalisierung der Fettsäuren durch CYP's führt zu den Hauptbestandteilen der Kutin- und Suberinpolyester: den  $\omega$ -Hydroxysäuren, Disäuren und mittkettig oxygenierten Säuren mit  $C_{16}$ - und  $C_{18}$ -Kohlenstoffkettenlängen.  $C_{16}/C_{18}$ -Fettsäuren werden an der  $\omega$ -Position durch  $\omega$ -Hydroxylasen (CYP86A4) hydroxyliert.  $\omega$ -Hydroxysäuren stellen die Vorstufe zu weiteren Oxidationsprodukten dar, die ebenfalls durch Mitglieder der CYP-Familie erzeugt werden. Eine Mittketten-Hydroxylierung (CYP77A6) der  $\omega$ -Hydroxysäure führt zur Produktion von  $C_{16}$ -DHFS ( $C_{16}$ -9/10-Dihydroxyfettsäure) (Li-Beisson 2009). Die Synthesen der  $C_{16}$ -HDFS ( $C_{16}$ -7/8-Hydroxydifettsäure) und  $C_{16}/C_{18}$ -Disäuren sind nicht aufgeklärt. Indizien führen zur Annahme, dass HOTHEAD (HTH) an der Disäuresynthese beteiligt ist (Kurdyukov 2006).

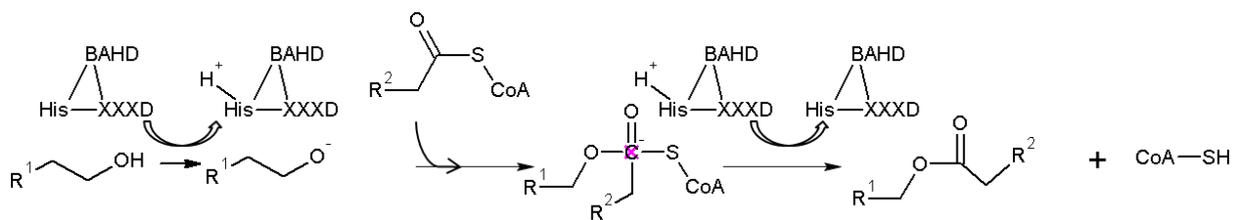
Die Mitglieder dieser Familie spielen eine integrale Rolle an der Kutin- und Suberinbiosynthese, nicht zuletzt aufgrund der Beteiligung an der Synthese der Polymerhauptbestandteile (Abbildung 1-7; Tabelle 1-1). Der Stoffwechselweg zur

Funktionalisierung der Fettsäuren, welcher zu prominentesten Hauptvertretern der Polyester führt, wird durch  $\omega$ -Hydroxylasen eingeleitet (Kolattukudy 2001). Wie bereits erwähnt, gehören viele der  $\omega$ -Hydroxylasen der CYP86- und der CYP94-Familie an, jedoch sind auch  $\omega$ -Hydroxylasen bekannt die den Familien CYP703, CYP704, CYP709, CYP74 und CYP77 angehören (Pinot und Beisson 2011).  $\omega$ -Hydroxysäuren stellen die Vorstufe zu weiteren Oxidationsprodukten dar, welche ebenfalls durch Mitglieder der CYP-Familie erzeugt werden. CYP77A6 wurde als Mittketten-Hydroxylase identifiziert, welche nach CYP86A4, einer  $\omega$ -Hydroxylase aktiv ist und zur Synthese von C<sub>16</sub>-9/10,16-Dihydroxyfettsäure (C<sub>16</sub>-DHFS) benötigt wird (Li-Beisson et al. 2009a, b). *HOTHEAD*-Mangelmutanten (*HTH*) in *A. thaliana* weisen im Blattkutin ein Defizit an Disäuren und einer Akkumulation an  $\omega$ -Hydroxysäuren auf (Kurdyukov et al. 2006b). In-vitro konnte für *HTH* eine  $\omega$ -Alkohol-Dehydrogenase-Funktion, also die Umsetzung von  $\omega$ -Hydroxysäuren zu  $\omega$ -Oxosäuren, nachgewiesen werden. Es wird angenommen, dass im Folgeschritt eine CYP-Monooxygenase an der Disäuresynthese beteiligt ist, die  $\omega$ -Oxosäuren weiter zu Disäuren oxidiert, die bisher noch nicht identifiziert werden konnte.

### 1.2.3 Die Familie der BAHD-Acyltransferasen

Pflanzliche BAHD-Proteine stellen eine große Familie der Acyltransferasen dar. Anhand von Sequenzhomologie-Studien wurden bei *A. thaliana* über 60 und bei *Oryza sativa* (*O. sativa*) 119 putative BAHD-Mitglieder identifiziert (D'Auria 2006; Yu et al. 2009). Die Familie wurde nach den Buchstaben der ersten vier charakterisierten Mitglieder, BEAT (Benzylalkohol-Acyltransferase), AHCT (Anthocyanin-Hydroxycinnamoyl-Transferase), HCBT (Hydroxycinnamoyl-Benzoyl-Transferase) und DAT (Diacetylvindolin-Acyltransferase), benannt. Abhängig von der Substratspezifität und Sequenzhomologie werden die BAHD-Mitglieder in fünf Unterfamilien eingeteilt. Alle bisher beschriebenen BAHD-Acyltransferasen weisen Gemeinsamkeiten auf, die folgend erläutert werden. Die charakterisierten Proteine liegen als Monomere mit Größen von 48 bis 55 kDa (im Mittel etwa 445 Aminosäuren) vor und weisen eine Sequenzhomologie von 25 bis 34 % auf. Zwei hochkonservierte Aminosäuremotive sind allen BAHD's gemein, die HXXXD-Domäne im aktiven Zentrum und die DFGWG-Domäne am Carboxyl-Terminus. Mangels genomischer und peptidischer Target-Sequenzen der untersuchten BAHD-Mitglieder und basierend auf GFP-Lokalisations-Studien nimmt man an, dass die Proteine

hauptsächlich als cytosolisch gelöste Proteine vorliegen. Die BAHD-Acyltransferasen führen Veresterungen mit aromatischen oder aliphatischen Substraten durch. Dabei überträgt das Protein CoA-aktivierte Säuregruppen auf Alkohol- oder Amidgruppen die mit dem Protein temporär assoziiert vorliegen. Die Aufklärung des Reaktionsmechanismus konnte durch Kristallstruktur-Analysen der Vinorinsynthese, eines BAHD-Familienmitglieds, vorangetrieben werden und könnte auch bei weiteren BAHD-Proteinen wie in der Modelldarstellung (Abbildung 1-8) dargestellt stattfinden (D'Auria 2006).



**Abbildung 1-8 Modell zum Reaktionsmechanismus der BAHD-Acyltransferasen**

Im aktiven Zentrum des BAHD-Enzyms deprotoniert das Histidin (His) des HXXXD-Motivs den Sauerstoff (oder Stickstoff) der Hydroxylgruppe (bzw. Amingruppe) des Akzeptors. Diese kann einen nukleophilen Angriff auf das Kohlenstoff-Atom der Carbonylgruppe des CoA-Thioesters durchführen. Das Intermediat, in dem das C-Atom mit seinen "alten" Substituenten und der neuen Substratgruppe verbunden ist, wird reprotoniert. Es entsteht der neue Ester (bzw. Amid) und freies CoA. R<sup>1</sup>/R<sup>2</sup>: organischer Rest

Bisher wurden vier BAHD-Acyltransferasen charakterisiert, die am Aufbau des Kutins oder des Suberins beteiligt sind. Für zwei Acyltransferasen konnte in *A. thaliana* die Beteiligung an der Kutinpolyestersynthese nachgewiesen werden. In Pflanzen von *DCF*-Knockdownlinien (*Deficient in Cutin Ferulate*) liegen die aromatischen Kutinbestandteile der Sprossachse und Blätter um die Hälfte verringert vor (Rautengarten et al. 2012). Aus *in vitro*-Studien folgerte man, dass die Enzymfunktion einer Ferulasäure-CoA-Acyltransferase mit  $\omega$ -Hydroxysäuren als Substrat entspricht. Pflanzen der *DCR*-Knockoutlinien (*Deficient in Cuticular Ridges*) weisen eine verringerte Kutinmenge der Blütenblätter auf, was von dem Fehlen der Kutikularfaltung begleitet wird (Panikashvili et al. 2007), worauf näher in Kapitel 1.3.2 eingegangen wird. Für zwei Acyltransferasen, *ASFT* (*aliphatic suberin feruloyl transferase*) in *A. thaliana* und dessen Ortholog *FHT* (*fatty  $\omega$ -hydroxyacid/hydroxycinnamoyl transferase*) in *Solanum tuberosum*, konnte die Beteiligung an der Suberinbiosynthese nachgewiesen werden (Molina et al. 2009; Gou et al. 2009; Serra et al. 2010). In Pflanzen von *ASFT*-Knockdownlinien fehlen im Samenschalenpolyester Ferulasäuren und  $\omega$ -Hydroxysäuren. In Pflanzen von *FHT*-

Knockoutlinien konnte im Suberin der Kartoffelperiderme eine Reduktion der Ferulasäure und der C<sub>18:1</sub>- $\omega$ -Hydroxysäure festgestellt werden.

#### 1.2.4 ABC-Transporter

Die ABC-Transporter-Superfamilie stellt eine Gruppe membranlokalisierter Transportproteine dar, die sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten vertreten sind. Die Proteinfunktion besteht im Substrattransport zur Aufnahme oder Abgabe von Stoffen (Rea 2007). Die Substrate können verschiedenster Natur sein können, wie beispielsweise Antibiotika, Lipide, Toxine oder Ionen, wodurch die Transporter an verschiedenen Stoffwechselfunktionen wie Detoxifikation, Proteintransfer und Entwicklungsprozessen beteiligt sein können. Aufnahme von Substraten ABC-Transporter bestehen typischerweise aus zwei Untereinheiten, die ein Dimer bilden. Die Untereinheiten (*half-size-ABCs*) bestehen aus einer Transmembran-Domäne (TMD) und einer nukleotidbindenden Domäne bzw. Faltung (NBD bzw. NBF). Handelt es sich um identische Untereinheiten werden sie als Homodimer bezeichnet, bei unterschiedlichen Untereinheiten bilden sie Heterodimere aus. Die TMDs sind stark hydrophob und sind mit vier bis sechs  $\alpha$ -Helices in die Plasmamembran eingelagert. Sie formen den Transportkanal und können auch an der Substratspezifität beteiligt sein (Theodoulou 2000). Die NBFs weisen alle mit geringen Abweichungen charakteristische Aminosäuresequenzen auf: die Walker A Box, die Walker B Box und ein ABC-Signatur-Motiv (Rea 2007, Theodoulou 2000). Letzteres ist das charakteristische Unterscheidungsmerkmal von ABC-Transportern im Vergleich zu anderen Walker Box-enthaltenden Nukleosidtriphosphat-bindenden (NTP) Proteinen. Die NBF bilden die ATP-bindende Kasette, welche durch ATP-Hydrolyse die Energie für Transportvorgänge erzeugt. Angelehnt an die Nomenklatur von tierischen ABC-Transportern führte Verrier et al. (2008) für pflanzliche ABC-Transporter eine Systematik ein, welche diese anhand der Gensequenzhomologie und Motivtopologie in acht Unterfamilien (ABCA bis ABCH) unterteilt.

Erste Einblicke in den Export der kutikulären Lipide wurden durch Pighin et al. (2004) veröffentlicht. Dieser entdeckte einen putativen ABC-Transporter *ABCG12* (auch als *CER5* bekannt) in *A. thaliana* dessen Knockout zu einer veränderten Kutikula-zusammensetzung führte. Die untersuchten *abcg12*-Mutanten wiesen ein Defizit der

epidermalen Sprossachsenwachse auf. Erst eine Totalextraktion setzte intrazellulär lipophile Agglomerate frei, die mengenmäßig dem Wachsdefizit entsprachen. Seitdem wurden drei weitere ABC-Transporter in *A. thaliana* entdeckt, die an der Kutikulabildung beteiligt sind und alle der ABCG-Unterfamilie angehören. Knockoutmutanten der Gene *ABCG11*, *ABCG13* und *ABCG32* sind durch einen Defizit an Kutinbestandteilen charakterisiert, wobei die *abcg11*-Linie zusätzlich einen Mangel an epidermalen Sprossachsenwachsen aufweist (Beisson et al. 2012; Luo et al. 2007; Panikashvili et al. 2007, 2011; Ukitsu et al. 2007).

### 1.2.5 Regulation der Polyestersynthese

*SHINE1* (*SHN1*, At1g15360), auch bekannt als *WAX INDUCER1* (*WIN1*), war der erste Transkriptionsfaktor (TF), dem eine Beteiligung an der Kutikulabildung in *A. thaliana* nachgewiesen werden konnte (Aharoni et al. 2004; Broun et al. 2004). Bei Überexpression des Gens weisen die Linien eine glänzende Oberfläche der Blätter und Sprossachse auf, daher auch die Namensgebung *shine* bzw. *wax inducer* (Aharoni et al. 2004). Häufig wird bei Wachsmangelmutanten eine glänzende Pflanzenoberfläche beobachtet, wogegen hierbei eine intrakutikuläre Akkumulation der Wachse vorgefunden wurde (Aharoni et al. 2004; Broun et al. 2004). *SHN2* (At5g11190) und *SHN3* (At5g25390) weisen, basierend auf der Aminosäuresequenz, eine Homologie von 54 %, bzw. 55 % zu *SHN1* auf und werden als *SHINE*-Familie zusammengefasst, die zu den *ethylene response factors* (ERF)-Proteinen zählen. Die Gene *SHN1*, *SHN2* und *SHN3* werden in denselben Geweben exprimiert (Shi et al. 2011). Shi konnte des Weiteren nachweisen, dass *SHN2* am höchsten in Abszissions- und Dehiszenzzonen exprimiert wird. Eine in silico-Studie mit Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/>) ergab für die Gene *SHN1* und *SHN3* eine Expression in der juvenilen Pflanze in Wurzeln, Sprossachsen und Blätter und in der adulten Pflanze in Sprossachsen, Blätter und besonders hoch in der Blüte (Kapitel 7.4.1, Abbildung 7-14). Durch eine weitere in silico-Studie mit ATTED-II (<http://atted.jp/>) der beiden Gene konnte eine Coregulation mit Kutikula-formierenden Genen festgestellt werden (Kapitel 7.1, Abbildung 7-14). *SHN1* weist eine Coregulation mit Genen auf die aus der Kutinbildung bekannt sind, wie  $\omega$ -Hydroxylasen (CYP86A4, CYP86A7), oder die in Verknüpfung mit der Bildung von Zellwandstrukturen stehen, wie Lyasen (At5g55720) und GDGL-Lipasen/Hydroxylasen. *SHN3* ist mit Genen die aus der Wachsbiosynthese assoziiert sind, wie beispielsweise der

Mittketten-Alkan-Hydroxylase (*CYP96A15*), coreguliert (Abbildung 7-15). Die Befunde für *SHN1* konnten durch eingehendere Studien bestätigt werden (Aharoni et al. 2004; Shi et al. 2011). Während die Überexpressionslinien der einzelnen *SHINE*-Gene alle den gleichen Phänotypen aufweisen, konnten keine morphologischen Änderungen bei Knockoutlinien der einzelnen *SHINE*-Gene beobachtet werden (Aharoni et al. 2004; Broun et al. 2004; Shi et al. 2011). Daher wird angenommen, dass eine funktionale Redundanz zwischen den Mitgliedern der *SHINE*-Transkriptionsfaktorenfamilie zugrunde liegt.

### 1.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es mit ausgewählten Mutanten, deren Gene in Verbindung mit der Kutin- und Suberinsynthese stehen, Änderungen der Polyesterkomposition zu erfassen und anhand dieser Veränderungen deren mögliche Funktion in der Biopolymersynthese abzuleiten. Untersucht wurden: eine putative  $\omega$ -Hydroxylase der CYP704-Familie (Kapitel 1.2.2) in *Brassica napus* (*B. napus*), eine putative BAHD-Acyltransferase in *Solanum lycopersicum* (*S. lycopersicum*, Kapitel 1.2.3), ein putativer ABC-Transporter (Kapitel 1.2.4) in *A. thaliana* und die Transkriptionsfaktorenfamilie SHINE (Kapitel 1.2.5) in *A. thaliana*.

#### 1.3.1 Die $\omega$ -Hydroxylase CYP704B1 in *Brassica napus*

In Raps wurden natürlich vorkommende männlich sterile Pflanzen entdeckt. Während des vegetativen Wachstums weisen diese keine besonderen Merkmale auf, wogegen in der Blütenentwicklungsphase die Mutation zum Tragen kommt (Yi et al. 2010). In den Antheren der Linie wurden defekte Pollen gebildet was zur Folge hat, dass sich keine Samen entwickeln. Durch rasterelektronenmikroskopische Studien der Pollen wurden strukturelle Defekte in den Pollenwänden erkannt. Diese Merkmalsausprägung konnte auf einen Gendefekt zweier rezessiver Allele, *Bncyp704b1-1* und *Bncyp704b1-2*, zurückgeführt werden. Ähnliche Pollenwanddefekte wurden bei transgenen Linien der orthologen Gene *At1g69500* (*AtCYP704B1*) in *A. thaliana* und *Os03g07250* (*OsCYP704B2*) in *O. sativa* beobachtet und auf ein Defizit des Exons oder Sporopollenins zurückgeführt (Dobritsa et al. 2009; Li et al. 2010; Yi et al. 2010). Man folgerte daraus eine Beteiligung der Gene an der Pollenwandbildung durch eine gestörte Exin- und/oder Sporopolleninsynthese. In *OsCYP704B2*-Knockoutlinien konnte zusätzlich eine veränderte chemische Zusammensetzung des Antherenkutins beobachtet werden (Li et al. 2010). Für die Enzyme *AtCYP704B1* und *OsCYP704B2* konnte in vitro die Funktion einer NADPH-abhängigen  $\omega$ -Hydroxylase nachgewiesen werden (Dobritsa et al. 2009; Li et al. 2010). Die Enzyme hydroxylieren spezifisch Fettsäuren mit Kohlenstoffkettenlängen von C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub>. Das Enzym *BnCYP704B1* weist basierend auf der Aminosäuresequenz eine Homologie von 86 % zu *AtCYP704B1* und 68 % zu *OsCYP704B2* auf (Yi et al. 2010). Aufgrund dessen wird für das Enzym *BnCYP704B1* ebenfalls eine Funktion als  $\omega$ -Hydroxylase angenommen. Dem Gen *OsCYP704B2* konnte des Weiteren die Beteiligung an der Assemblierung des Antherenkutins nachgewiesen werden (Li et al. 2010). Dort wurde in Mutantenlinien ein Defizit an Kutinbestandteilen,

insbesondere der  $\omega$ -Hydroxysäuren, festgestellt. Aufgrund der hohen Aminosäuresequenzhomologie der Proteine OsCYP704B2 und BnCYP704B1 wird für letzteres eine ähnliche Funktion in der Antherenkutinbildung in Raps angenommen. In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob das Gen *BnCYP704B1* an der Kutinsynthese beteiligt ist. Yi et al. (2010) konnte die Expression des Gens in der Blüte nachweisen, wogegen andere Organe (Wurzel, Sprossachse, Blätter) keine Expression aufwiesen. Innerhalb der Blüte wurde die maximale Expression in den Antheren festgestellt. Aufgrund der antherenspezifischen Expression wird die Lipidkomposition der Antherenkutikula analysiert.

### **1.3.2 Die Acyltransferase DCR in *Solanum lycopersicum***

Das Gen *DCR* (At5g23940) wurde wie in Kapitel 1.2.3 beschrieben in *A. thaliana* untersucht, in dessen Knockdownlinien (*Atdcr*) im Blütenkutin ein hohes Defizit an C<sub>16</sub>-DHFS beobachtet werden konnte. Das Kutin der Tomatenfruchtkutikula besteht bis zu 80 % aus der C<sub>16</sub>-DHFS und wurde daher als Untersuchungsobjekt für ein *AtDCR*-Ortholog gewählt (Isaacson et al. 2009). Das orthologe Gen der *AtDCR* in *Solanum lycopersicum*, im Folgenden als *SIDCR* bezeichnet, weist basierend auf der Aminosäuresequenz eine Homologie von 78 % auf. Konkret sollen die Auswirkungen des Genknockdowns auf das Kutin der Tomatenfruchtkutikula untersucht werden um anhand möglicher Änderungen der Kutinkomposition Rückschlüsse auf die Proteinfunktion in der Polymersynthese ziehen zu können.

### **1.3.3 Der ABC-Transporter ABCG11 in *Arabidopsis thaliana***

ABCG11 (At1g17840) weist basierend auf der Aminosäuresequenz eine Homologie von 52 % zu ABCG12 (CER5) und wird auch mit *ACBG12* coexprimiert (Panikashvili et al. 2007). Vorrausgehende Studien des Transporters *ABCG11* in *A. thaliana* zeigten drastische Auswirkungen des Knockouts auf das vegetative Wachstum der Pflanzen (Bird et al. 2007; Luo et al. 2007; Panikashvili et al. 2007). Die phänotypischen Merkmale zeichneten sich durch Zwergwuchs und Organfusionen in den Blütenorganen und den Samenanlagen aus. Die Analyse der kutikulären Lipidzusammensetzungen der Sprossachse und der Blätter ergab drastische Defizite aller Wachs- und Kutinbestandteile, was nicht ausschließlich auf primäre Effekte der Mutation

zurückgeführt wurde. Die Knockoutlinien beinhalten subzelluläre Einschlüsse im Cytoplasma der Epidermiszellen, welche Einstülpungen in die Zentralvakuole aufwiesen und sich mit lipophilen Färbemitteln färben ließen. Ähnliche lipophile Einschlüsse wurden auch bei den *ABCG12*-Knockdownlinien entdeckt (Kapitel 1.2.4). In dieser Arbeit wurden transgene Cosuppressionslinien des *ABCG11*-Gens untersucht. Durch Überexpression eines Gens kann der Mechanismus der Cosuppression eintreten. Als Folge dessen können mildere phänotypische Merkmalsausprägungen der Mutantlinien eintreten als durch einen vollständigen Genknockout oder RNAi-Genknockdown erreicht wurden und sekundäre Effekte der Mutation verringert werden (Panikashvili et al. 2007/2010). Die Cosuppression führte zu Pflanzen mit geringeren morphologischen Auswirkungen auf das vegetative Wachstum, der Blüten- und Samenentwicklung und verminderter Expression des *ABCG11*-Gens (Panikashvili et al. 2010). Um die Auswirkung der Genveränderung auf die Polyester festzustellen, werden die Polymerzusammensetzungen in Blatt, Sprossachse, Blüte, Schote und Wurzel und die Wachszusammensetzung der Sprossachse der Knockdownlinien untersucht. Unter den transgenen Linien waren auch Pflanzen ohne Phänotypen vertreten, die folgend als Überexpressionslinien bezeichnet werden. Bei diesen Linien werden die Zusammensetzungen des Sprossachsen- und Blattkutins und Wurzelsuberins untersucht.

#### **1.3.4 Die SHINE-Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis thaliana***

Wie in der Kapitel 1.2.5 erläutert, liegt bei Knockoutlinien der *SHINE*-Transkriptionsfaktoren möglicherweise eine funktionale Redundanz zwischen *SHN1*, -2 und -3 vor. Um diese Redundanz zu umgehen wurden alle drei *SHINE*-Familienmitglieder durch ein artifizielles microRNA-System in *A. thaliana* simultan herunterreguliert (Shi et al. 2011). Den transgenen Tripel-Knockdownlinien, folgend als *shn1/2/3* bezeichnet, konnte eine verringerte Expression der *SHINE*-Gene nachgewiesen werden. Die vegetative Entwicklung der Pflanzen verlief normal, wogegen während der Blütenentwicklung Organfusionen der Blütenblätter und eine verfrühte Abszission beobachtet werden konnte. Des Weiteren konnte Shi et al. (2011) eine veränderte Zellwandzusammensetzung der Blütenblätter feststellen, was auf die Regulation des epidermalen Zellwandaufbaus durch die *SHINE*-Transkriptionsfaktoren hindeutet. Organfusionen wurden häufig bei Mutanten mit veränderter Kutinzusammensetzung

beobachtet (Nawrath 2002). Ausgehend von diesen Beobachtungen und der Expression in der Wurzel (Kapitel 1.2.5) wurde die Zusammensetzung der Blüten- und Blattkutikula und des Wurzelsuberins untersucht um eine Beteiligung der *SHINE*-Transkriptionsfaktoren bei deren Bildung festzustellen.

## **2 Material und Methoden**

## 2.1 Pflanzenmaterialien

Die untersuchten Pflanzenmaterialien wurden von verschiedenen Kooperationspartnern bereitgestellt.

### 2.1.1 *Brassica napus*

Die Rapsmutante *Bncyp704b1* wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Tingdong Fu, *National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement der Huazhong Agricultural University* (Wuhan, China) erzeugt.

In *B. napus* sind zwei Allele, *BnCYP704B1-1* und *BnCYP704B1-2*, des Gens *BnCYP704B1* vorhanden (Yi et al. 2010). Durch Segregation der normal fertilen natürlich vorkommenden S45B-Linie (*BnCYP704B1-1cyp704b1-1cyp704b1-2cyp704b1-2*) wurden die doppelt rezessive Linie *Bncyp704b1* (*cyp704b1-1cyp704b1-1cyp704b1-2cyp704b1-2*) gewonnen. Die S45B-Linie wurde als Referenzlinie unter der Bezeichnung Wildtyp für die folgenden Untersuchungen verwendet. Die Wildtyp- und Mutantenlinien wurden in den Versuchsfeldern des Instituts unter Freilandbedingungen angezogen (Chen et al. 2009).

Die Knockdownlinie *Bncyp704b1* wies im Vergleich zum Wildtyp größere Antheren auf und wurde durch die verminderte Expression des *BnCYP704B1*-Gens gegenüber dem Wildtyp identifiziert. Die Antheren wurden von adulten Pflanzen geerntet und bis zur chemischen Analyse im getrockneten Zustand aufbewahrt. Detaillierte Beschreibungen können der Publikation von Yi et al. (2010) entnommen werden.

### 2.1.2 *Solanum lycopersicum*

Die Erzeugung und Anzucht der *Sldcr*-Linien und des Wildtyps (M82), sowie die Isolation der Kutikeln von Tomatenfrüchten, wurde in der Arbeitsgruppe von Asaph Aharoni, *Department of Plant Sciences des Weizmann Institute of Science* (Rehovot, Israel) durchgeführt, Publikation ausstehend.

Die RNAi-Knockdownlinien des Gens *Solyc03g025320* (*SIDCR*) wurden in der Arbeitsgruppe von Avi Levy, *Plant Sciences Department des Weizmann Institute of Science* (Rehovot, Israel), erzeugt. Zur Erzeugung des RNAi-Konstrukts wurde ein cDNA-Fragment des *DCR*-Gens amplifiziert und in einen Vektor mit dem CaMV 35S-Promotor

kloniert. Das Fusionskonstrukt wurde mit einem weiteren Vektor rekombiniert und nach Dan et al. (2006) wurden Kotyledonen transformiert.

Die Anzucht der transgenen *Sldcr*-Linien und des korrespondierenden Wildtyps erfolgte im Gewächshaus auf Erde mit natürlichem Tag/Nacht-Rhythmus bei 24/18°C. Die Tomatenfrüchte der Knockdownlinien *Sldcr11*, *Sldcr13* und *Sldcr16* zeigten phänotypische Unterschiede zum Wildtyp und eine verminderte Expression des *SIDCR*-Gens, daher wurden diese Linien für weitere Untersuchungen verwendet. Die Ernte der Tomatenfrüchte (Ende der grünen Reifungsphase) erfolgte etwa 35 Tage nach der Blütezeit. Aus der Fruchtschale wurden Scheiben mit einem Durchmesser von 10 mm ausgestanzt und Zellwandbestandteile durch Verdauung mit Pektinasen und Zellulasen entfernt. Die Kutikulascheiben der Mutanten und des Wildtyps wurden bis zur weiteren Verwendung im getrockneten Zustand gelagert.

### **2.1.3 Arabidopsis thaliana**

Die Erzeugung, Pflanzenanzucht und Isolation des Pflanzenmaterials der transgenen Linien *ABCG11* und *SHN1/2/3* in *A. thaliana* wurden in der Arbeitsgruppe von Asaph Aharoni, *Department of Plant Sciences des Weizmann Institute of Science* (Rehovot, Israel) durchgeführt.

Die Pflanzenanzucht erfolgte in der Klimakammer auf Erde bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h, bei 20°C und 70 % relativer Luftfeuchte. Die Mutantenlinien konnten durch morphologische Veränderungen der Pflanzen (Kapitel 1.3.3 f.) im Vergleich zum Wildtyp identifiziert werden. Die Mutanten, im Folgenden als *abcg11* und *shn1/2/3* bezeichnet, wurden als Knockdownlinien durch die verringerte Genexpression im Vergleich zum Wildtyp (Columbia 0) verifiziert. Die Expression des Gens *ABCG11* wurde bei den Überexpressionslinien, im Folgenden als *ABCG11-OE* bezeichnet, nicht geprüft. Die zu untersuchenden Sprossachsen, Blätter, Blüten, Schoten und Wurzeln wurden von adulten Pflanzen geerntet und im getrockneten Zustand bis zur Analyse gelagert.

#### **2.1.3.1 Generierung transgener ABCG11-Linien**

Zur Erzeugung der transgenen *ABCG11*-Linien wurde ein *ABCG11*-Genabschnitt (4418 bp) amplifiziert und zusammen mit einem Zwei-Komponenten Transaktivierungssystem, bestehend aus einem Promotor und einem Transkriptions-

faktor (*LHG4*) nach Moore et al. (1998), in einen Vektor, der eine Kanamycinresistenzgen beinhaltet, inseriert (Panikashvili et al. 2010). Zur Transformation wurden nach Clough und Bent (1998) Blütenstände von *A. thaliana* in einen *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm (GV3101), welches das Konstrukt beinhaltet, gedippt und transgene Pflanzen auf Kanamycin-enthaltenden Agarplatten selektioniert (Panikashvili et al. 2010).

### **2.1.3.2 Generierung transgener SHN1/2/3-Linien**

Zur Erzeugung der *shn1/2/3*-RNAi Linie wurde eine artifizielle microRNAi-Sequenz durch BIO S&T Inc. (Canada) erzeugt. Das Konstrukt wurde mit dem CaMV 35S Promotor fusioniert und in einen Vektor kloniert. Die Transformation und Selektion erfolgte wie in Kapitel 2.1.3.1 beschrieben (Shi et al. 2011).

## **2.2 Mikroskopische Untersuchung**

Um mögliche Auswirkungen des *DCR*-Knockdowns auf die Tomatenfruchtkutikula zu untersuchen, wurde diese makro- und mikroskopisch untersucht.

### **2.2.1 Untersuchungen unter dem Binokular und dem Lichtmikroskop**

Untersuchungen der Außen- und Innenseiten der Tomatenfruchtkutikula, der *Sldcr*-Linien und des Wildtyps, erfolgten mittels Binokular (SZ61, Olympus, Deutschland) mit integrierter Kamera (EOS 600D, Canon, Deutschland).

Des Weiteren wurden Querschnitte der Kutikula mit Hilfe eines Gefriermikrotoms angefertigt und unter dem Durchlichtmikroskop (AxioPlan, Carl Zeiss, Deutschland) mit integriertem Kamerasystem (DXM-1200, Nikon Corporation, Deutschland) im Hellfeld und unter Epifluoreszenz untersucht. Das Mikroskop ist mit einem Filtersystem ausgestattet, von dem Filter I (Anregungsfilter BP 365 nm, Strahlenteiler 395 nm, Sperrfilter LP 397 nm) zur Untersuchung der Autofluoreszenz genutzt wurde. Die Bildaufnahme erfolgte mit der Software (Software Act-1 Version 2.70, Nikon Corporation, Japan).

### **2.2.2 Anfertigung von Querschnitten mit dem Mikrotom**

Die getrockneten Kutikeln wurden vor dem Schneiden um der Sprödigkeit des Materials entgegenzuwirken für 12 h angefeuchtet über Papier gelagert. Die trocken getupften Gewebe wurden mit Pinzette und Schere in Stücke adäquater Größe (ca. 2 mm breit und 5 bis 10 mm lang) geschnitten, in Einbettmedium (Neg 50, Richard-Allen Scientific, USA) eingebettet und bei -30°C ausgehärtet. Die Präparate wurden auf Probehaltern mit Neg 50 fixiert und mit Hilfe des Mikrotom-Kryostat (Microm HM 500 M; Microm International, Deutschland) wurden bei -30°C Querschnitte mit einer Dicke von 8 bis 20 µm angefertigt.

### **2.2.3 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen**

Zur Untersuchung der Ultrastrukturen der Kutikeln wurde mit freundlicher Genehmigung der AG Prof. Bakker (Institut für Evolutionsbiologie und Zooökologie, Universität Bonn) das Rasterelektronenmikroskop (REM; Leitz AMR 1000, Leitz,

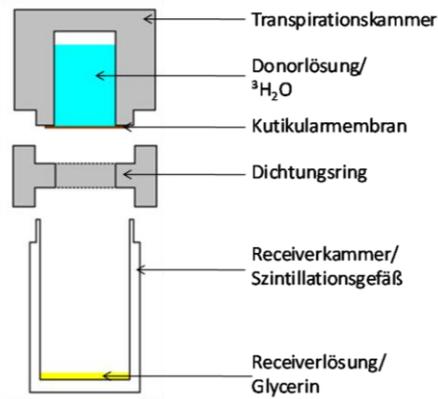
Deutschland) verwendet. Dazu wurden Freihandschnitte getrockneter Kutikeln mit doppelseitigen Haftklebern auf Probentellern fixiert. Durch eine zweiminütige Goldbedampfung der Proben, mit einem Sputtergerät (Polaron E5100, Polaron Equipment LTD., England) im Hochvakuum ( $6,7 \cdot 10^{-7}$  bar) bei einer Spannung von 2,4 kV und einer Stromstärke von 15 mA, wurde eine 72 nm dicke Goldschicht aufgetragen. Anschließend konnten die Präparate mit dem REM untersucht werden.

## 2.3 Transpirationsmessung

Um zu prüfen ob sich die Permeabilität der *Sldcr*-Kutikeln zu denen des Wildtyps unterscheiden wurde eine Transpirationsstudie durchgeführt.

### 2.3.1 Messaufbau

Für diesen Versuch wurden Edelstahl-Transpirationskammern verwendet (Abbildung 9). Diese bestehen aus einem Donorkompartiment, welches mit Tritium markiertem Wasser ( $^3\text{H}_2\text{O}$ ,  $3,7 \text{ MBq g}^{-1}$ ; Hartmann Analytik, Deutschland) ( $800 \mu\text{l}$ ;  $3 \cdot 10^3 \text{ DPM } \mu\text{l}^{-1}$ ) befüllt wurde. Darauf wurden die Kutikeln mit der physiologischen Innenseite zur Flüssigkeit platziert. Um ein dichtes System zu erhalten wurden zuvor die Kontaktflächen der Kammern mit Silikonfett (Wacker Chemie, München) eingepinselt. Um sicher zu stellen dass intakte Kutikeln eingesetzt werden wurden ein bis zwei Tropfen Ethanol auf die Kutikulaoberfläche appliziert, worauf sich Kutikeln mit Löchern rasch verdunkelten. Die Kammern wurden mit der Kutikulaaußenseite nach unten bündig auf Szintillationsgefäße gesetzt, welche mit  $250 \mu\text{l}$  Glycerin befüllt waren, und zur Äquilibrierung für 12 h bei  $25^\circ\text{C}$  gelagert. Die Äquilibrierung sorgt für einen gleichmäßigen Fluss des Wassers über die Kutikula. Das Wasser diffundiert von der Donorseite (100 % Feuchte) über die Kutikula, geht im Receiverkompartiment (nahezu 0 % Luftfeuchte) in die Dampfphase über und wird durch das hygroskopische Glycerin gebunden. Zum Start der Messung wurde die Kammer auf ein frisches mit Glycerin gefülltes Szintillationsgefäß gestellt. Die Messung verlief über vier Stunden und die Probenentnahme erfolgte nach 15, 30, 60, 120 und 240 min durch Austausch gegen frische Szintillationsgefäße mit Glycerin. Die Proben wurden zur Messung der Radioaktivität mit fünf ml Cocktail Ultima Gold XR (Perkin Elmer, Deutschland) versetzt, gevortext und zur Vermeidung von Messfehlern durch photochemisch bedingte Reaktionen für eine Stunde stehen gelassen. Die Zählung der Tritiummenge erfolgte mit einem Szintillationszähler (LSA Tri-Carb 2800TR, Perkin Elmer) und wurde in DPM (*disintegrations per minute*: Zerfälle pro Minute) gemessen.



**Abbildung 2-1 Versuchsaufbau der Transpirationsstudie**

Schematische Darstellung des apparativen Aufbaus der Transpirationmessung im Querschnitt. Die Einzelteile ergeben zusammengesteckt ein abschließendes System.

### 2.3.2 Auswertung

Die einzelnen Messwerte wurden für die jeweilige Kutikula aufsummiert, d.h. der 30 min-Wert ergibt sich aus der Summe des 15 und 30 min Messwerts, und graphisch als Funktion der Zeit dargestellt. Für einen Vergleich der Wasserdurchlässigkeit der Kutikeln wurden Leitwerte ( $P$  [ $\text{m s}^{-1}$ ]) mithilfe der Formel 2-1 errechnet (Geyer und Schönherr 1990). Dazu wurden Regressionen der Kinetiken erstellt und das Bestimmtheitsmaß ( $R^2 > 0,99$ ) geprüft. Die Flussrate ( $F$  [ $\text{kg s}^{-1}$ ]) des Wassers über die Kutikula ist proportional zur treibenden Kraft  $\Delta c$  [ $\text{kg m}^{-3}$ ] und zur Transpirationsfläche  $A$  [ $\text{m}^2$ ]). Die Flussrate ergibt sich aus der Steigung der Regressionsgeraden. Die treibende Kraft errechnet sich aus dem Konzentrationsgradienten ( $c_{\text{Donor}} - c_{\text{Receiver}}$ ) zwischen Donor- und Receiverseite. Solange sich die Konzentrationen nicht ändern, kann für die treibende Kraft die Dichte des Wassers ( $1000 \text{ kg m}^{-3}$ ) verwendet werden. Die Transpirationsfläche ( $2,83 \cdot 10^{-5} \text{ m}^2$ ) der Kutikula wird durch die Öffnung des Dichtungsringes der Transpirationskammern eingegrenzt. Da in dieser Studie mit Tritium-markiertem Wasser gearbeitet wurde ergibt sich für die Berechnung des Leitwerts folgende Änderung. Die Flussrate entspricht der über die Kutikula diffundierten Menge Tritium  $F$  [ $\text{DPM s}^{-1}$ ] und die treibende Kraft entspricht der Tritiumkonzentration im Donor, also  $\Delta c$  [ $\text{DPM m}^{-3}$ ].

#### Formel 2-1 Leitwertberechnung

Berechnung des Leitwerts  $P$  [ $\text{m s}^{-1}$ ]. Die Flussrate  $F$  [ $\text{kg s}^{-1}$ ] wird durch die treibende Kraft  $\Delta c$  [ $\text{kg m}^{-3}$ ] und der Transpirationsfläche  $A$  [ $\text{m}^2$ ] dividiert.

$$P = \frac{F}{\Delta c * A}$$

## 2.4 Analytische Studien

Für alle Arbeitsschritte zur Analyse der Lipidzusammensetzungen wurden mit Chloroform vorgereinigte Glasgefäße verwendet um Kontaminationen der Analytate durch lipophile Rückstände zu vermeiden. Gerätschaften wie Pinzetten, Scheren, etc. die in Kontakt mit dem Probenmaterial kamen, wurden ebenfalls gereinigt. Alle eingesetzten Chemikalien entsprachen analytischer Qualität. Die Chemikalien, deren Reinheit und Bezugsquellen sind im Text angegeben. Die internen Standardsubstanzen wurden volumetrisch als Lösung in Chloroform mit einer Konzentration von  $0,2 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  zugegeben. Einwaagen der Pflanzenmaterialien erfolgten mithilfe einer Analysenwaage (MC21S, Sartorius AG, Deutschland).

Die Gewinnung des Probenmaterials zur Analyse wird in den folgenden Kapiteln 2.4.1 ff. beschrieben. Die Proben zur Polyesteranalyse wurden zunächst umgeestert (Kapitel 2.5.1) und sowohl die umgeesterten Proben als auch die Wachsproben wurden vor der gaschromatographischen Analyse einer Derivatisierung unterzogen (Kapitel 2.5.2). Die Analyse zur Quantifizierung und Identifikation der Bestandteile erfolgte mittels Gaschromatographen (GC) (Kapitel 2.5.3) und Massenspektrometer (GC-MS) (Kapitel 2.5.4).

### 2.4.1 Wachs- und Kutinanalyse von Rapsantheren

Zur Wachsextraktion der Antherenkutikula wurden etwa 8 mg Rapsantheren eingewogen, mit 1 ml Chloroform versetzt und für 60 s gevortext. Durch eine kurze Extraktionsdauer soll eine Extraktion der Membran- und Speicherlipide vermieden werden. Der Überstand wurde in ein frisches Glasgefäß überführt. Dem Extrakt wurden  $10 \mu\text{g}$  Tetracosan ( $\text{C}_{24}$ -Alkan) als interner Standard zugesetzt und das Lösemittelvolumen im Stickstoffstrom bei  $60^\circ\text{C}$  auf etwa  $200 \mu\text{l}$  eingengt. Die Proben wurden derivatisiert (Kapitel 2.5.2) und gaschromatographisch analysiert (Kapitel 2.5.3ff.).

Zur Analyse des Kutins wurden die Rapsantheren aus der Wachsextraktion weiter verwendet. Die Antheren wurden dreimal mit 1,0 ml Chloroform für jeweils eine Stunde auf der Rollbank inkubiert um Membran- und Speicherlipide herauszulösen. Die Extrakte wurden verworfen und das Pflanzenmaterial getrocknet. Es wurde eine Umesterung (Kapitel 2.5.1) des getrockneten Pflanzenmaterials mit methanolischer

Salzsäure durchgeführt, wobei 10 µg Dotriacontan (C<sub>32</sub>-Alkan) als interner Standard eingesetzt wurde. Als Bezugsgröße wurde die Antherenoberfläche genutzt. Die Ermittlung der Oberfläche wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

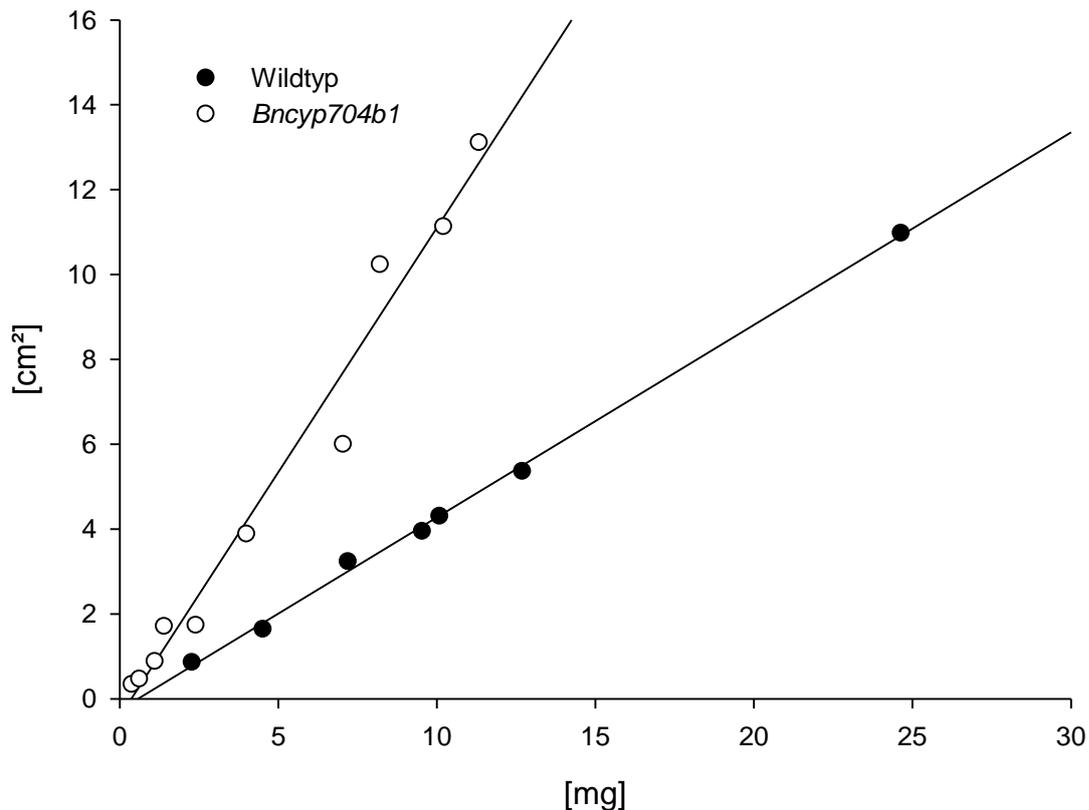
Um die Oberfläche der Antheren als Bezugsgröße für die Analyse nutzen zu können wurde eine Massen-Oberflächen-Korrelation der Mutanten- und Wildtypantheren durchgeführt. Dazu wurde die zweidimensionale Fläche, verschiedener Einwaagen, mithilfe eines Scanners gescannt und mit Adobe Photoshop (Ver. 7.0, Adobe Systems GmbH, Deutschland) die Pixelanzahl bestimmt. Aufgrund der annähernd zylindrischen Hohlmantelform der Antherenkutikula und der bekannten Pixelanzahl (bei einer Auflösung von 13950 Pixeln cm<sup>-2</sup>) konnte mithilfe der nachfolgend dargestellten Formel 2-2 die Antherenoberfläche (A [cm<sup>2</sup>]) ermittelt werden.

#### **Formel 2-2 Berechnung der Antherenoberfläche**

Formel zur Berechnung der Antherenoberfläche A [cm<sup>2</sup>] mithilfe der ermittelten Pixelanzahl und der bekannten Auflösung

$$A = \frac{\text{Pixelanzahl} * \pi}{13950 \text{ Pixel cm}^{-2}}$$

Es folgte die graphische Darstellung der errechneten Flächen in Abhängigkeit zu den jeweiligen Einwaagen (Abbildung 2-2). Über die Geradengleichungen der Regressionsgeraden (R<sup>2</sup> = >0,97) konnte nun zu jeder beliebigen Einwaage die zugehörige Antherenoberfläche bestimmt werden. Die Regressionsgerade für den Wildtyp hat ein Bestimmtheitsmaß von R<sup>2</sup>(WT) = 0,998 und die Geradengleichung lautet „Fläche(WT) = 0,453\*Masse-0,258“. Die Regressionsgerade für die *Bncyp704b1*-Linie hat ein Bestimmtheitsmaß von R<sup>2</sup>(WT) = 0,974 und die Geradengleichung lautet „Fläche(*Bncyp704b1*) = 1,151\*Masse-0,416“.



**Abbildung 2-2 Korrelation der Oberfläche zur Einwaage**

Dargestellt sind die Regressionsgeraden der Antherenoberflächen in Abhängigkeit zur Einwaage.

### 2.4.2 Wachs- und Kutinanalyse von Tomatenfruchtkutikeln

Jeweils eine isolierte Kutikula (Kapitel 2.2.2) der Mutanten- und Wildtyp-Tomatenfrucht wurde gewogen und zweimal mit 0,5 ml Chloroform/Methanol (1:1), auf dem Schüttler für 1 h bei 50°C, extrahiert. Die Überstände wurden quantitativ vollständig in einem frischen Glasgefäß gesammelt und nach Zugabe von 10 µg Tetracosan als internem Standard im Stickstoffstrom bei 60°C zur Trockene eingengt. Die vollständige Trocknung der Proben ist ein wichtiger Schritt, da das Methanol einerseits aufgrund der Hydroxylgruppe mit dem Derivatisierungsreagenz reagiert und andererseits schädigend auf das Säulenmaterial des Gaschromatographen wirken kann. Die Rückstände wurden in 150 µl Chloroform gelöst, derivatisiert und gaschromatographisch (Kapitel 2.5.2 ff.) analysiert.

Zur Analyse der Kutinmatrix wurden die zuvor extrahierten Kutikulascheiben mit einer Schere zerkleinert. Die Umesterung (Kapitel 2.5.1) erfolgte mit methanolischem

Bortrifluorid, nachdem 10 µg Dotriacontan als interner Standard zugegeben worden waren. Als Bezugsgröße für die Analysen wurde die kreisförmig ausgestanzte Fläche der Kutikeln (Durchmesser = 1 cm) verwendet.

### 2.4.3 Wachsanalyse von *A. thaliana* Pflanzenmaterialien

Zur Extraktion der Blüten-, Blatt- und Sprossachsenwaxse wurden die Pflanzenmaterialien jeweils zweimal für 30 s mit Hexan extrahiert. Den vereinten Extrakten wurde Tetracosan als interner Standard zugegeben. Die Mengen des eingesetzten Pflanzenmaterials und des internen Standards können der folgenden Tabelle 2-1 entnommen werden. Die Proben wurden im Stickstoffstrom bei 60°C auf etwa 200 µl eingengt, derivatisiert und gaschromatographisch analysiert (Kapitel 2.5.2 ff.). Als Bezugsgröße wurde bei den Blüten die eingesetzte Menge und bei den Blättern und Sprossachsen die mittels Scanner ermittelte Fläche verwendet.

**Tabelle 2-1 Pflanzenmaterialmenge zur Wachsextraktion**

Gewebe	Trockengewicht [mg]	Lösemittelvolumen [ml]	interner Standard Tetracosan [µg]
Blüte	~10	5	10
Blatt	~15	10	10
Sprossachse	~8	5	20

### 2.4.4 Polyesteranalyse von *A. thaliana* Pflanzenmaterialien

Zur Analyse der Polyester wurden die Pflanzenmaterialien zwei Wochen lang in 10 ml Chloroform/Methanol (1:1) extrahiert um Membranlipide zu entfernen und die Lösemittel täglich gewechselt. Die Depolymerisierungsreaktionen des getrockneten Blatt-, Sprossachsen-, Blüten- und Schotenkutins sowie des Wurzelsuberins erfolgte wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben. Zur Depolymerisierung der Kutinpolyester wurden 2,0 ml methanolische Salzsäure eingesetzt und für das Wurzelsuberin 2,0 ml methanolisches Bortrifluorid. Als interner Standard wurde den Analysaten Dotriacontan hinzugefügt. Die Mengen des eingesetzten Pflanzenmaterials und des internen Standards können der folgenden Tabelle 2-1 entnommen werden. Als Bezugsgröße wurde bei den Blättern und

Sprossachsen die Fläche gewählt. Die Flächen der Blätter und der Sprossachsen wurden mittels Scanner ermittelt. Bei den Blüten, Schoten und Wurzeln wurden die Einwaagen als Bezugsgröße verwendet.

**Tabelle 2-2 Pflanzenmaterialmenge zur Umesterung**

Die Mengenangaben des *A. thaliana* Pflanzenmaterials zur Polyester-Umesterung.

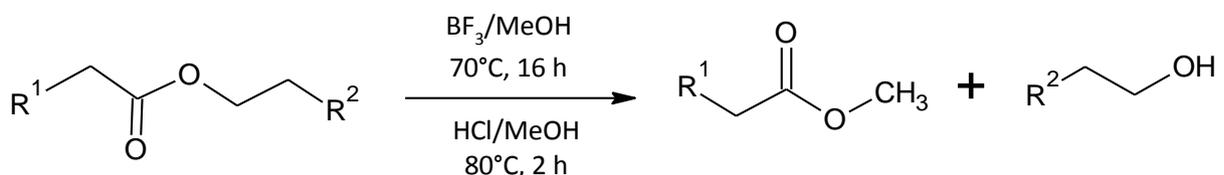
Gewebe	Trockengewicht [mg]	interner Standard Dotriacontan [µg]
Blatt	~15	10/5 <sup>a</sup>
Sprossachse	~8	5
Blüte	~10	10/20 <sup>a</sup>
Schote	~15	5
Wurzel	~7/3 <sup>a</sup>	10

<sup>a</sup>: Abweichungen bei den *ABCG11*-Linien

## 2.5 Gaschromatographie und Massenspektrometrie

### 2.5.1 Depolymerisierung der Polyester

Zur Depolymerisierung der Biopolyester wurden Umesterungsreaktionen mit Methanol durchgeführt. Dabei wurde 1 M methanolische Salzsäure (HCl/MeOH, Supelco, USA) oder, um aromatische Bestandteile besser nachweisen zu können, 1,3 M methanolisches Bortrifluorid (BF<sub>3</sub>/MeOH, Sigma-Aldrich, Deutschland) als Katalysator verwendet (Franke et al. 2005). Das Probenmaterial wurde mit ein bis zwei ml des jeweiligen Umesterungsreagens vollständig bedeckt und für zwei Stunden bei 80°C in HCl/MeOH bzw. 16 h bei 70°C in BF<sub>3</sub>/MeOH inkubiert. In der Reaktion werden Esterbindungen gespalten, wobei die Säuren anschließend als Methylester vorliegen und die Abspaltungsprodukte mit Hydroxygruppe liegen als freie Monomere vorliegen. Der Reaktionsmechanismus entspricht einer nukleophilen Substitution (Abbildung 2-3). Nach der Inkubationszeit wurde eine definierte Menge internen Standards (Dotriacontan) zugegeben, um auf dessen Grundlage eine Quantifizierung der Monomere zu ermöglichen. Der Lösung wurde, zum Stoppen der Umesterungsreaktion, eine gesättigte Natriumchlorid- (bei BF<sub>3</sub>/MeOH) oder Natriumhydrogencarbonatlösung (bei HCl/MeOH) gleichen Volumens zugesetzt. Um die lipophilen Monomere aus der Reaktionslösung herauszulösen wurde diese bei Raumtemperatur dreimal mit 1,0 ml Chloroform (bei BF<sub>3</sub>/MeOH) oder Hexan (bei HCl/MeOH) ausgeschüttelt. Die Chloroformextrakte wurden zweimal mit Wasser gewaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und in ein frisches Gefäß überführt. Die vereinten Lösemittelextrakte wurden auf ein Volumen von 100 bis 200 µl eingengt und derivatisiert (Kapitel 2.5.2).



**Abbildung 2-3 Schematische Darstellung der Umesterungsreaktion**

Esterbindungen des Polymers werden in der Umesterungsreaktion gelöst. Carbonsäuregruppen werden dabei mit Methanol verestert und die Alkohole liegen als freie Monomere vor. R1, R2: organische Reste, HCl/MeOH: methanolische Salzsäure, BF<sub>3</sub>/MeOH: methanolisches Bortrifluorid

## 2.5.2 Derivatisierung

Die Analysate, also die Wachsextrakte und die Extrakte aus den Umesterungsreaktionen, müssen vor der Analyse mit dem Gaschromatographen derivatisiert werden. Die Derivatisierung dient zur Maskierung freier funktioneller Gruppen was die Flüchtigkeit der Analyte erhöht, die Peakauflösung verbessert und die Reaktivität gegenüber dem Säulenmaterial verringert. Als Derivatisierungsreagenz wurde den Proben 20 µl N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA, Machery-Nagel, Deutschland) und 20 µl Pyridin als Katalysator zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wird für 40 min bei 70°C inkubiert, die Reaktion ist in Abbildung 2-4 schematisch dargestellt. Die Lösung kann anschließend zur gaschromatographischen Analyse (Kapitel 2.5.3 f.) eingesetzt werden.

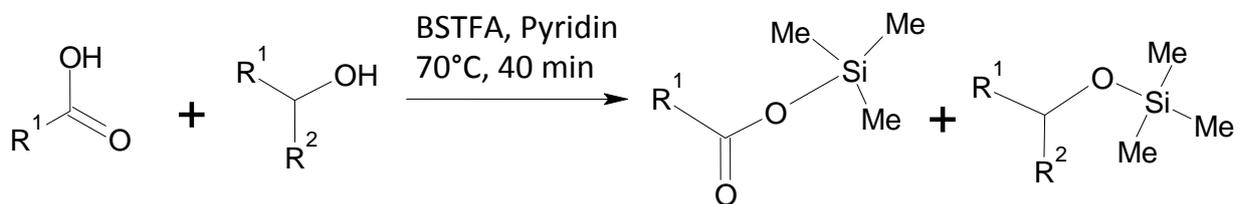


Abbildung 2-4 Schematische Darstellung der Derivatisierungsreaktion

Freie Carbonsäure- und Hydroxygruppen reagieren mit BSTFA zu Trimethylsilylethern und -estern, wobei Pyridin als Katalysator fungiert. R<sup>1</sup>: organischer Rest, R<sup>2</sup>: organischer Rest oder H, Me: Methylgruppe, BSTFA: N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid

## 2.5.3 Gaschromatographie

Die Analysate aus Kapitel 2.4.1 bis 2.4.4 wurden mittels Gaschromatographen (GC; Modell 6890N von Agilent Technologies, USA) aufgetrennt und mit einem dahinter geschalteten Flammen-Ionisationsdetektor (FID; Agilent Technologies, USA) detektiert. Als stationäre Phase wurde eine Kapillarsäule (DB-1, 30 m \* 0,32 mm; 0,1 µm; J&W, USA) verwendet, als mobile Phase diente Wasserstoff und als Inertgas für eine saubere und gleichmäßige Verbrennung Stickstoff. Die Trennmethoden (Temperatur, Druck, Gasfluss und Zeit) zur Auftrennung der Wachs-, Kutin- und Suberinproben können Tabelle 3 entnommen werden. Bei allen Analysaten wurde 1 µl der Probe *on-column*, also direkt auf die Säule, injiziert. Die Analysate werden basierend auf den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Analyte (molare Masse, Molekülvolumen und -struktur, etc.) und deren Interaktion mit dem Säulenmaterial aufgetrennt. So gelangen die Analyte hintereinander zum Detektor (FID). Dort werden sie quantitativ vollständig in einer Knallgasflamme (Wasserstoff und gefilterte Luft) verbrannt. Die Messung erfolgt über

den Stromfluss der oxidierenden Kohlenstoffatome welcher über eine angelegte Spannung des Detektors registriert wird und sich proportional zur verbrannten Kohlenstoffmenge verhält. Die Messdaten werden mittels Software (HP Chemstation, Hewlett Packard Corporation, USA) aufgezeichnet und als Chromatogramm (Stromfluss als Funktion der Zeit) dargestellt.

**Tabelle 2-3 Einstellungen der Gaschromatographen für die Wachs-, Kutin- und Suberinanalyse**

Die Trägergase Wasserstoff (beim GC-FID) und Helium (beim GC-MS) fließen mit einem konstanten Fluss von 2 ml min<sup>-1</sup>.

Kutin und Suberin	Wachs
<i>on column</i> Injektion bei 50°C	<i>on column</i> Injektion bei 50°C
2 min 50°C	2 min 50°C
10°C/min auf 150°C	40°C/min auf 200°C
1 min bei 150°C	2 min bei 200°C
3°C/min auf 310°C	3°C/min auf 310°C
15 min bei 310°C	15 min bei 310°C

#### 2.5.4 Massenspektrometrie

Das Massenspektrometer (MS; 5973 MS, Agilent Technologies, USA) unterscheidet sich vom GC-FID hauptsächlich durch die dahinter geschaltete Detektoreinheit. Die Auftrennung des injizierten Analysats (1 µl) beruht auf denselben Prinzipien die in Kapitel 2.5.3 beschrieben wurden. Als stationäre Phase wurde eine Kapillarsäule (DB-1 MS, 30 m \* 0,32 mm; 0,1 µm; J&W, USA) verwendet und als mobile Phase Helium. In der Detektoreinheit werden den Analyten durch Elektronenbeschuss (70 eV) Elektronen aus dem Molekül herausgeschlagen. Die positiv geladenen Ionen sind instabil und zerfallen in Fragmente mit für die Moleküle charakteristischen statistischen Verteilungen. Diese positiv geladenen Fragmente passieren ein elektromagnetisches Feld, welches durch einen Hexapol induziert wird. Dadurch werden sie nach ihrem Masse-Ladungsverhältnis separiert und durch die dahinter geschaltete Detektoreinheit registriert. Die Messdaten wurden mittels Software (HP Enhanced Chemstation

Software Ver. A.03.00, Hewlett Packard Corporation, USA) aufgezeichnet und als Chromatogramm und Massenspektren ausgegeben.

### 2.5.5 Auswertung

Zur Identifikation der Moleküle, die Peaks in den MS-Chromatogrammen verursachten, wurden die jeweiligen Massenspektren mit Fragmentationsmustern aus Labor-internen Datenbanken und Fragmentmassentabellen verglichen. Aufgrund der gleichen Auftrennmethode von GC-FID und GC-MS konnten die identifizierten Substanzen (Peaks) der MS-Chromatogramme auf die FID-Chromatogramme übertragen werden. Zur Quantifizierung der Substanzmengen wurden die Peakflächen der FID-Chromatogramme mithilfe der GC-Software (Chemstation, Agilent Technologies, USA) ermittelt. Anhand der Peakfläche ( $A_{IS}$ ) des den Proben zugegebenen internen Standards ( $m_{IS}$ ) Da den Proben eine definierte Menge interner Standard ( $m_{IS}$ ) zugegeben wurde, dessen Peakfläche ( $A_{IS}$ ) bekannt ist, lassen sich die Mengen unbekannter Substanzen ( $m_X$ ) über die zugehörigen Peakflächen ( $A_X$ ) mit Formel 2-3 errechnen.

#### Formel 2-3 Berechnung der Substanzmenge

Formel zur Gehaltsberechnung.  $m_X$ : Masse der gesuchten Substanz [ $\mu\text{g}$ ],  $m_{IS}$ : Masse interner Standard [ $\mu\text{g}$ ],  $A_X$ : Peakfläche der gesuchten Substanz,  $A_{IS}$ : Peakfläche des internen Standards.

$$m_X = \frac{m_{IS} * A_X}{A_{IS}}$$

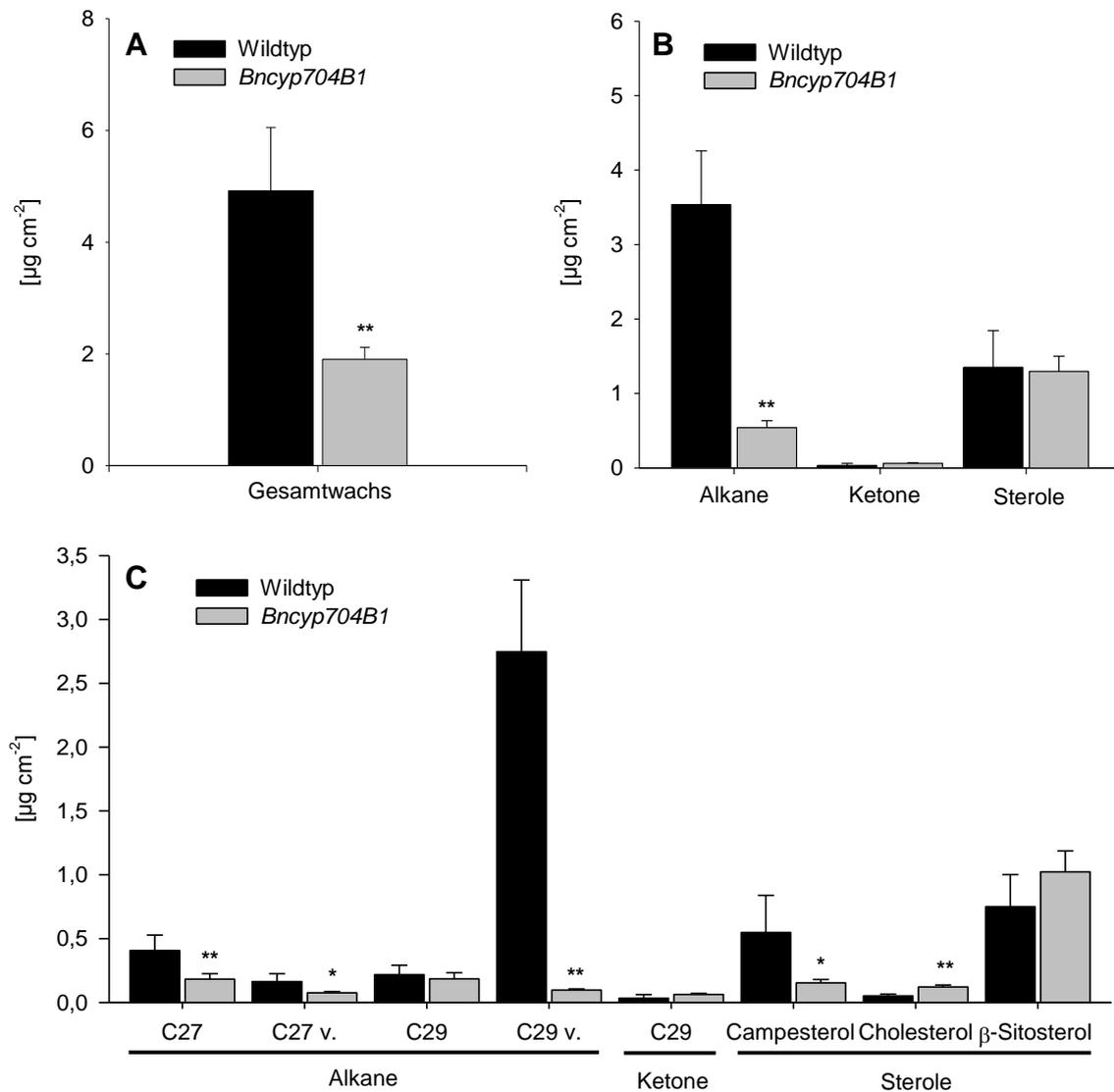
Die Substanzmengen wurden, abhängig von den untersuchten Geweben, durch eine Bezugsgröße dividiert. Da es sich bei den Polyestern um flächige Barrieren handelt wurde wenn möglich die Oberfläche als Bezugsgröße gewählt, andernfalls das Trockengewicht. Es wurden Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet und zum Prüfen signifikanter Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante zweiseitige Student's t-Tests mit ungleicher Varianz mit durchgeführt.

## **3 Ergebnisse**

### 3.1 Untersuchung der *Bncyp704b1* Antherenkutikeln

In der vorliegenden Studie wurde die Lipidzusammensetzung der Antherenkutikula der doppelt rezessiven Mutantenlinie (*Bncyp704b1*) im Vergleich zum Wildtyp (WT) untersucht. Ziel dieser Studie war es herauszufinden ob dem Gen *BnCYP704B1*, zusätzlich zur Beteiligung an der Pollenwandbildung, eine Beteiligung an der Kutinmatrixbildung zugeschrieben werden kann und durch die veränderte Lipidzusammensetzung auf die Enzymfunktion von BnCYP704B1 zu schließen (Kapitel 1.3.1).

Die Analyse des Antherenwachses der Mutantenlinie und des Wildtyps ergab Unterschiede in der Menge und Zusammensetzung. In der *Bncyp704b1*-Linie ist der Gesamtgehalt des Antherenwachses (Abbildung 3-1A) im Vergleich zum Wildtyp um 61 % signifikant geringer (WT:  $4,92 \pm 1,13 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $1,90 \pm 0,22 \mu\text{g cm}^{-2}$ ). Der Unterschied resultiert aus der signifikanten Reduktion der Alkane (Abbildung 3-1B) um 85 % (WT:  $3,54 \pm 0,72 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $0,54 \pm 0,09 \mu\text{g cm}^{-2}$ ). Das C<sub>29v</sub>-Alkan (v.: verzweigtes Derivat) bildet den Wachshauptbestandteil (Abbildung 3-1C) und liegt in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp um 96 % signifikant geringer vor (WT:  $2,75 \pm 0,56 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $0,10 \pm 0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$ ). Der C<sub>27v</sub>-Alkan (WT:  $0,16 \pm 0,06 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $0,08 \pm 0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) und der C<sub>27</sub>-Alkan (WT:  $0,41 \pm 0,12 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $0,18 \pm 0,04 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) liegen im Vergleich zum Wildtyp jeweils um 50 % und 56 % signifikant reduziert vor. Die relative Darstellung der Einzelbestandteile und die Resultate des statistischen Tests können dem Anhang (Kapitel 7.1) entnommen werden.



**Abbildung 3-1** Zusammensetzung des Antherenwachses der *Bncyp704b1*-Linie und des korrespondierenden Wildtyps

Wachsbestandteile geordnet nach (A) Gesamtgehalt, (B) Substanzklassen und (C) Einzelsubstanzen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus sechs Parallelen mit Standardabweichung beim Wildtyp und der Mutante. Mittels zweiseitigem *Student's t*-Test wurde auf statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante geprüft. \*: p-Werte 0,01-0,05, \*\*: p-Werte <0,01, v.: verzweigtes Derivat

Der Gesamtgehalt des Antherenkutins der Mutantenlinie (Abbildung 3-2A) ist um 32 % signifikant geringer als im Wildtyp (WT:  $2,79 \pm 0,69 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $1,90 \pm 0,48 \mu\text{g cm}^{-2}$ ). Eine signifikante Verminderung ist in den Substanzklassen (Abbildung 3-2B) der  $\omega$ -Hydroxysäuren um 37 % (WT:  $0,46 \pm 0,11 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $0,29 \pm 0,07 \mu\text{g cm}^{-2}$ ), der Disäuren um 80 % (WT:  $0,10 \pm 0,03 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $0,02 \pm 0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) und der mittkettig oxygenierten Säuren um 44 % anzutreffen (WT:  $1,09 \pm 0,31 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $0,61 \pm 0,26 \mu\text{g cm}^{-2}$ ). Innerhalb dieser Substanzklassen liegen alle Monomere im

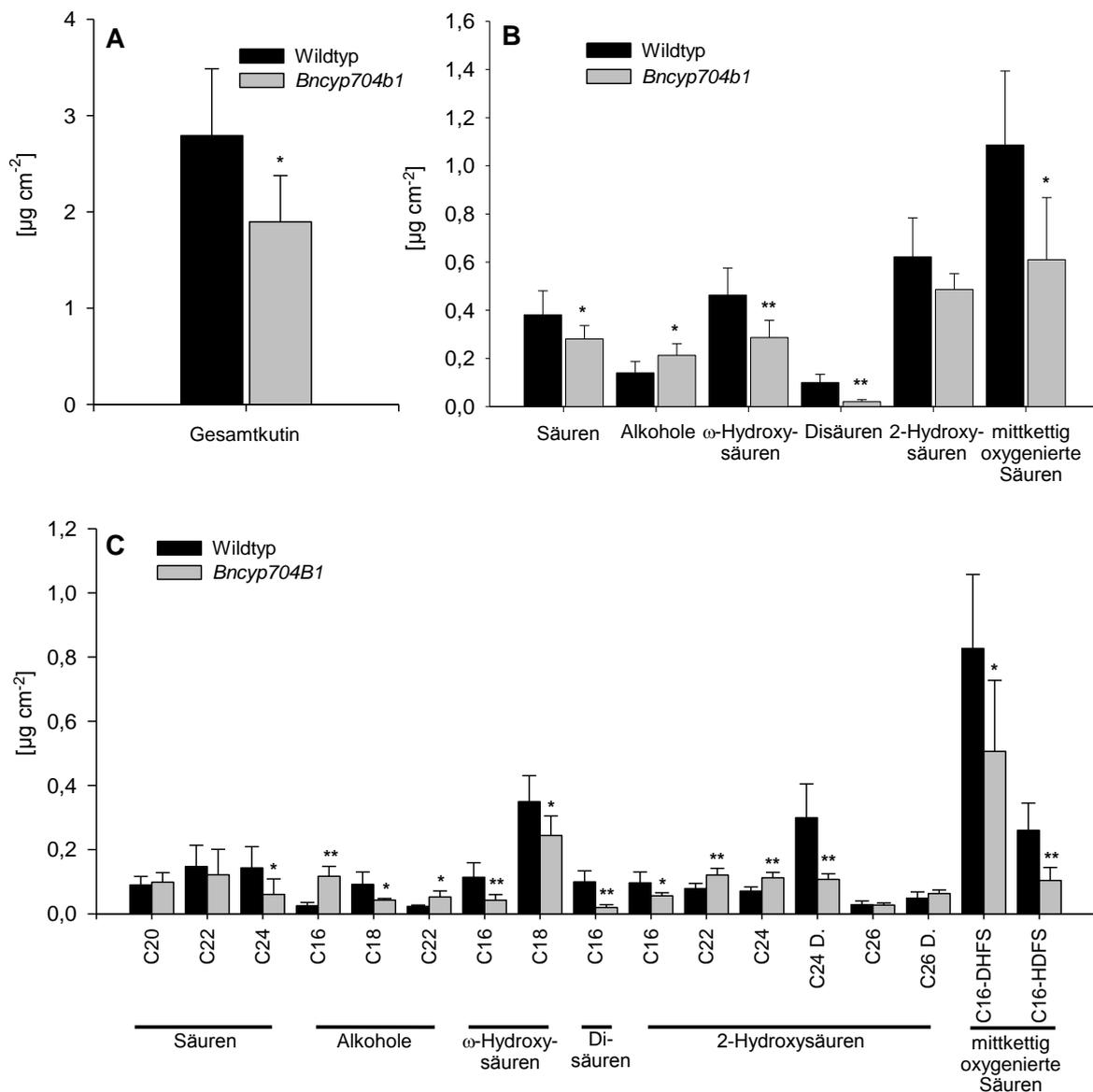
Vergleich zum Wildtyp mengenmäßig verringert vor (Abbildung 3-2C). Die C<sub>16</sub>-ω-Hydroxysäure (WT: 0,11 ± 0,05 µg cm<sup>-2</sup>, MT: 0,04 ± 0,02 µg cm<sup>-2</sup>) und C<sub>18</sub>-ω-Hydroxysäure (WT: 0,35 ± 0,08 µg cm<sup>-2</sup>, MT: 0,24 ± 0,06 µg cm<sup>-2</sup>) sind um 63 % bzw. 31 % und die C<sub>16</sub>-Disäure (WT: 0,10 ± 0,03 µg cm<sup>-2</sup>, MT: 0,02 ± 0,01 µg cm<sup>-2</sup>) um 80 % verringert. Zudem sind die C<sub>16</sub>-DHFS (C<sub>16</sub>-9/10-Dihydroxyfettsäure; WT: 0,83 ± 0,23 µg cm<sup>-2</sup>, MT: 0,51 ± 0,22 µg cm<sup>-2</sup>) und die C<sub>16</sub>-HDFS (C<sub>16</sub>-7/8-Hydroxydifettsäure; WT: 0,26 ± 0,08 µg cm<sup>-2</sup>, MT: 0,10 ± 0,04 µg cm<sup>-2</sup>) um 38 % bzw. um 61 % signifikant reduziert. Auch innerhalb der anderen Substanzklassen sind vereinzelte Substanzen im Vergleich zum Wildtyp mengenmäßig signifikant verändert. Die C<sub>24</sub>-Säure, der C<sub>18</sub>-Alkohol, die C<sub>16</sub>-2-Hydroxysäure und C<sub>24 v.</sub>-2-Hydroxysäure liegen im Vergleich zum Wildtyp signifikant verringert vor, wogegen der C<sub>16</sub>-, C<sub>22</sub>-Alkohol, die C<sub>22</sub>- und C<sub>24</sub>-2-Hydroxysäuren im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht vorliegen (Tabelle 3-1). Die relative Darstellung und die Ergebnisse des statistischen Tests können Kapitel 7.1 entnommen werden.

**Tabelle 3-1 Signifikant verschiedene Kutinmengen der Säuren, Alkohole und 2-Hydroxysäuren**

Aufgelistet sind die Mittelwerte (Mw) und die Standardabweichung (Stabw).

Monomer	Wildtyp [µg cm <sup>-2</sup> ]	<i>Bncyp704b1</i> [µg cm <sup>-2</sup> ]
	Mw ± Stabw	Mw ± Stabw
C <sub>24</sub> -Säure	0,14 ± 0,07	0,06 ± 0,05*
C <sub>16</sub> -Alkohol	0,02 ± 0,01	0,12 ± 0,03**
C <sub>18</sub> -Alkohol	0,09 ± 0,04	0,04 ± <0,01*
C <sub>22</sub> -Alkohol	0,02 ± <0,01	0,05 ± 0,02*
C <sub>16</sub> -2-Hydroxysäure	0,10 ± 0,03	0,06 ± 0,01*
C <sub>22</sub> -2-Hydroxysäure	0,08 ± 0,02	0,12 ± 0,02**
C <sub>24</sub> -2-Hydroxysäure	0,07 ± 0,01	0,11 ± 0,02**
C <sub>24 v.</sub> -2-Hydroxysäure	0,30 ± 0,11	0,11 ± 0,02**

\*: p-Wert 0,01-0,05, \*\*: p-Wert<0,01



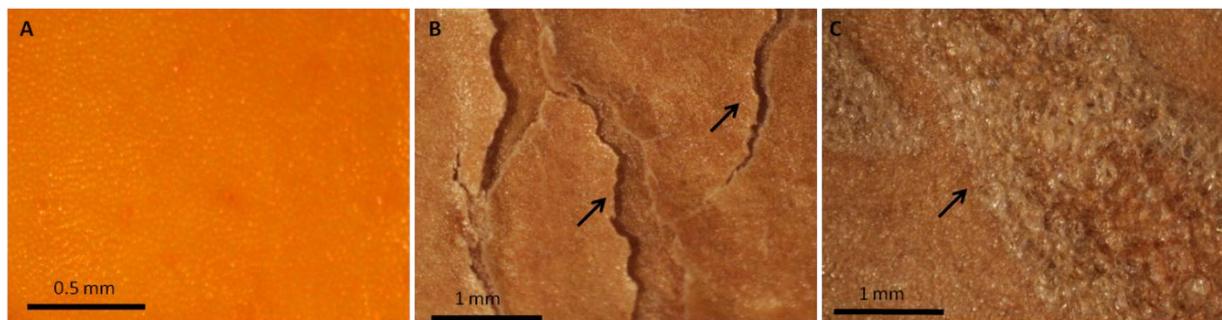
**Abbildung 3-2** Zusammensetzung des Antherenkutins der *Bncyp704b1*-Linie und des korrespondierenden Wildtyps

Kutinbestandteile geordnet nach (A) Gesamtgehalt, (B) Substanzklassen und den (C) Einzelsubstanzen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus sechs Parallelen beim Wildtyp und vier Parallelen bei der Mutante mit Standardabweichung. Mittels zweiseitigem *Student's t*-Test wurde auf statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante geprüft. \*: p-Werte 0,01-0,05, \*\*: p-Werte <0,01, D.: Derivat, C<sub>16</sub>-DHFS: Dihydroxyfettsäure, C<sub>16</sub>-HDFS: Hydroxydifettsäure

## 3.2 Untersuchung der *Sldcr* Tomatenfruchtkutikeln

In der gesamten Entwicklung der Tomatenfrucht wiesen die *SIDCR*-RNAi-Linien, folgend als *Sldcr* bezeichnet, im Vergleich zum Wildtyp eine geringere Expression des *SIDCR*-Gens auf. Im grünen Reifungsstadium der Tomatenfrüchte konnte im Wildtyp die maximale Expression nachgewiesen werden, wohingegen in den *Sldcr*-Linien die geringste Expression nachgewiesen wurde. Zum Ende dieser Reifungsphase wurden die Tomatenfrüchte des Wildtyps und der Mutante geerntet. Die *Sldcr*-Kutikeln weisen phänotypische Unterschiede zu den Wildtyp-Kutikeln auf. Die *Sldcr*-Kutikeln sind braun verfärbt und erscheinen wesentlich dicker und steifer als die Wildtyp-Kutikeln. Zwischen den Kutikeln der drei Linien *Sldcr-11*, *-13* und *-16* ist äußerlich kein Unterschied feststellbar. Zur genaueren Betrachtung wurden die Kutikeln zunächst makroskopisch mit Hilfe des Binokulars untersucht.

### 3.2.1 Makroskopische Untersuchung der Tomatenfruchtkutikeln



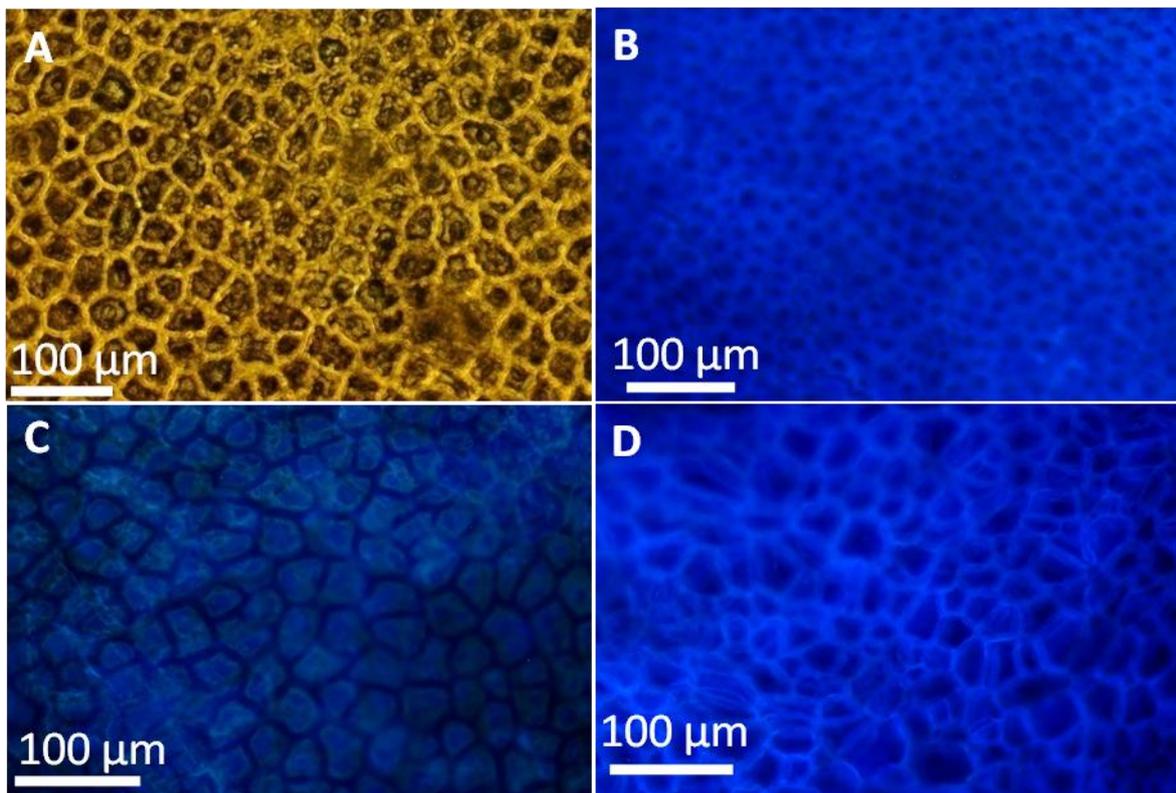
**Abbildung 3-3 Makroskopische Untersuchung der Tomatenfruchtkutikeln der *Sldcr*-Linien und des Wildtyps**

Makroskopische Aufnahmen isolierter Tomatenfruchtschalen. (A) Kutikulaaußenseite des Wildtyps und (B) der *Sldcr13*-Linie und (C) der Kutikulainnenseite der *Sldcr13*-Linie. Auf eine Aufnahme der Kutikulainnenseite des Wildtyps wurde verzichtet, da diese in dieser Vergrößerung optisch keinen Unterschied zur Außenseite aufweist. Die Abbildungen der *Sldcr13* Kutikeln sind repräsentativ für die *Sldcr*-Linien. Die Pfeile markieren Risse in der Kutikulaoberfläche.

Die Kutikeln der *Sldcr*-Linien (Abbildung 3-3B-C) unterscheiden sich von den Kutikeln des Wildtyps (Abbildung 3-3A). Die Wildtyp-Kutikeln sind intensiv orange-rot gefärbt, die *Sldcr*-Kutikeln hingegen dunkelbraun und die Außenfläche der Kutikula weist Risse und abblätternde Schichten auf. Diese Beobachtung setzt sich auf der Innenseite fort. Die phänotypischen Ausprägungen der *Sldcr*-Kutikeln erinnern an Wundperiderme von

Tomatenfrüchten. Die Braunfärbung ist außerdem ein Indiz für aromatische Einlagerungen. Zur eingehenderen Betrachtung wurden die Kutikeln von Wildtyp und *Sldcr*-Mutante wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben mikroskopisch untersucht.

### 3.2.2 Mikroskopische Untersuchung der Tomatenfruchtkutikeln

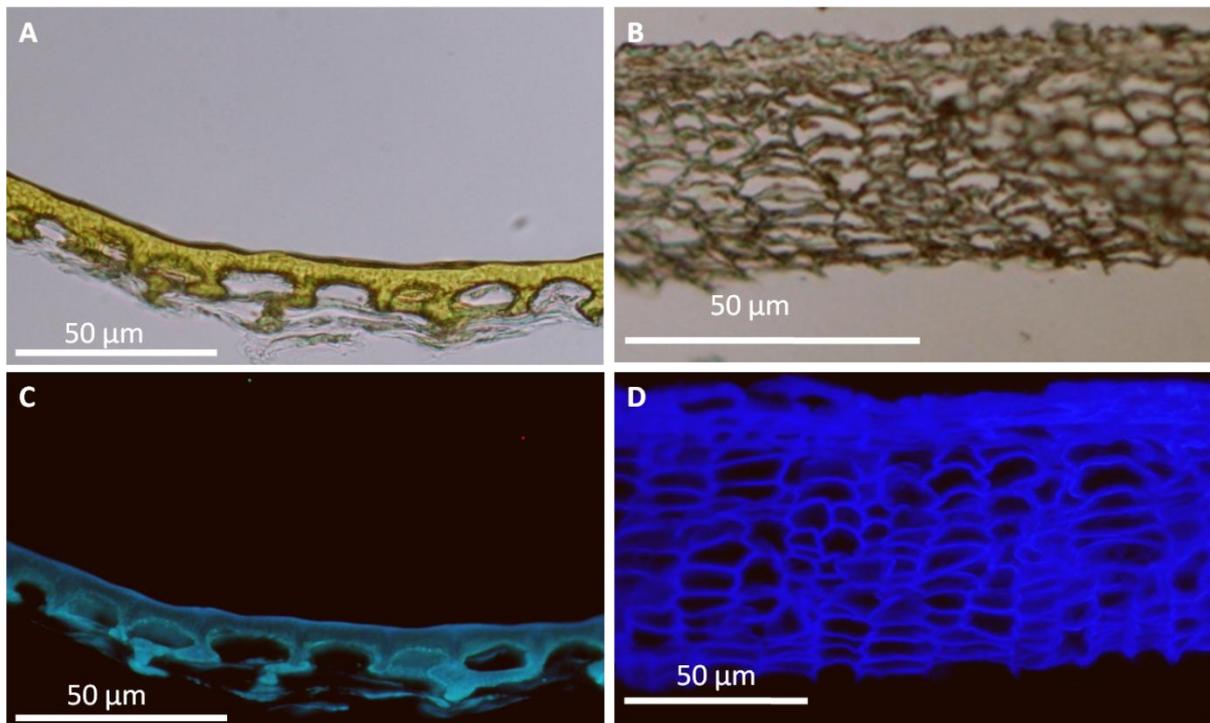


**Abbildung 3-4 Mikroskopische Untersuchung der Kutikulaoberflächen der *Sldcr*-Linien und des Wildtyps**

Aufnahmen der physiologischen (A-B) Außen- und (C-D) Innenseite der Tomatenfruchtkutikeln. Dargestellt sind (A, C) die Wildtyp- und (B, D) die *Sldcr11*-Kutikula. Mikroskopische Aufnahme (A) im Hellfeld und (B-D) Epifluoreszenz unter Anregung bei 365 nm.

In der Hellfeld-Aufnahme des Wildtyps (Abbildung 3-4A) sind die antiklinen Wände der Epidermiszellen zu erkennen. Aufgrund der Lichtundurchlässigkeit der *Sldcr*-Kutikeln wurden deren Oberflächen ausschließlich unter Epifluoreszenz mikroskopiert. Die Kutikulaaußenseite des Wildtyps zeigt unter UV-Licht keine Epifluoreszenz (Bilder nicht dargestellt) und geringe auf der Innenseite (Abbildung 3-4C). Die *Sldcr*-Kutikeln fluoreszieren intensiv auf beiden Seiten (Abbildung 3-4B, D). Unter UV-Licht fluoreszieren aromatische Bestandteile in pflanzlichen Geweben, wie beispielsweise Lignin oder andere Phenylpropanoid-Derivate. Daher ist anzunehmen, dass die *Sldcr*-

Linien aromatische Substanzen in die Kutikula eingelagert haben. Bei Aufsicht auf die Kutikulaaußenseite (Abbildung 3-4A, B) können die Abdrücke der Epidermiszellen beim Wildtyp und Mutante erkannt werden. Die Abdrücke erscheinen bei den *Sldcr*-Kutikeln runder geformt und kleiner als beim Wildtyp. Die Kutikulainnenseite des Wildtyps (Abbildung 3-4C) lässt deutlich die Fluoreszenz des Abdrucks einer Zelllage erkennen. Die Aufnahme der Kutikulainnenseite der *Sldcr*-Linie (Abbildung 3-4D) weist auf mehrere Zelllagen hin, was durch Mikroskopie der Querschnitte der Kutikeln bestätigt wurde. Die Wildtypkutikula (Abbildung 3-5A, C) lässt den Abdruck einer Zelllage mit einer schwächeren Fluoreszenz erkennen (trotz längerer Belichtungszeit) und weist eine Dicke von fünf bis zehn Mikrometern auf. Die *Sldcr*-Kutikula weist mehrere Zelllagen auf, welche unter UV-Licht intensiv fluoreszieren. Eine Auszählung der Zellschicht erfolgte anhand mehrerer Bilder und führte zu neun bis zehn Zelllagen mit einer Dicke von 30 bis 70  $\mu\text{m}$ . Der Querschnitt der *Sldcr*-Kutikula erinnert an Wundperiderme der Kartoffel (Abbildung 1-2), die ebenfalls aus mehreren Zelllagen bestehen. Um weiteren Aufschluss über die Unterschiede der *Sldcr*-Kutikeln im Vergleich zum Wildtyp zu erhalten wurden sie mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops (REM) untersucht.



**Abbildung 3-5 Mikroskopische Untersuchung der Kutikulaquerschnitte der *Sldcr*-Linien und des Wildtyps**

Querschnittsaufnahmen der Tomatenfruchtkutikeln von Wildtyp (A, C) und *Sldcr*-Linie (B, D) im Hellfeld (A-B) und unter Epifluoreszenz (C-D) bei 365 nm.

### 3.2.3 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Tomatenfruchtkutikeln

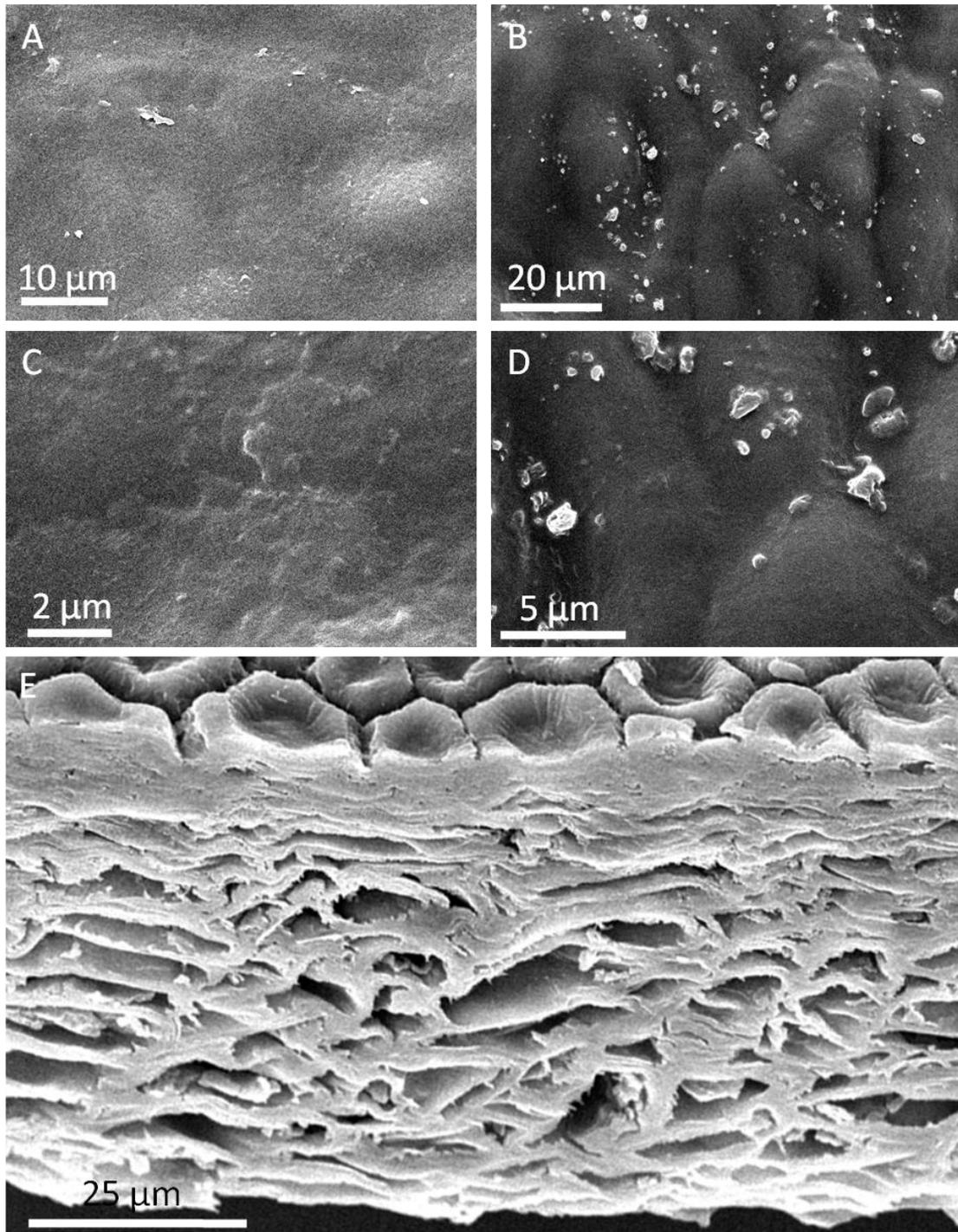


Abbildung 3-6 REM-Untersuchung der Tomatenfruchtkutikeln der *Sldcr*-Linien und des Wildtyps

REM-Aufnahmen der physiologischen Außenseite (A, C) der Wildtyp- und (B, D) *Sldcr16*-Kutikeln. (E) Querschnitt der *Sldcr11*-Kutikula, die physiologische Außenseite ist oben.

Die physiologische Außenseite der Wildtyp- (Abbildung 3-6A, C) und *Sldcr*-Kutikula (Abbildung 3-6B, D) lassen Wachse in amorph geschichteter und kristalliner Form

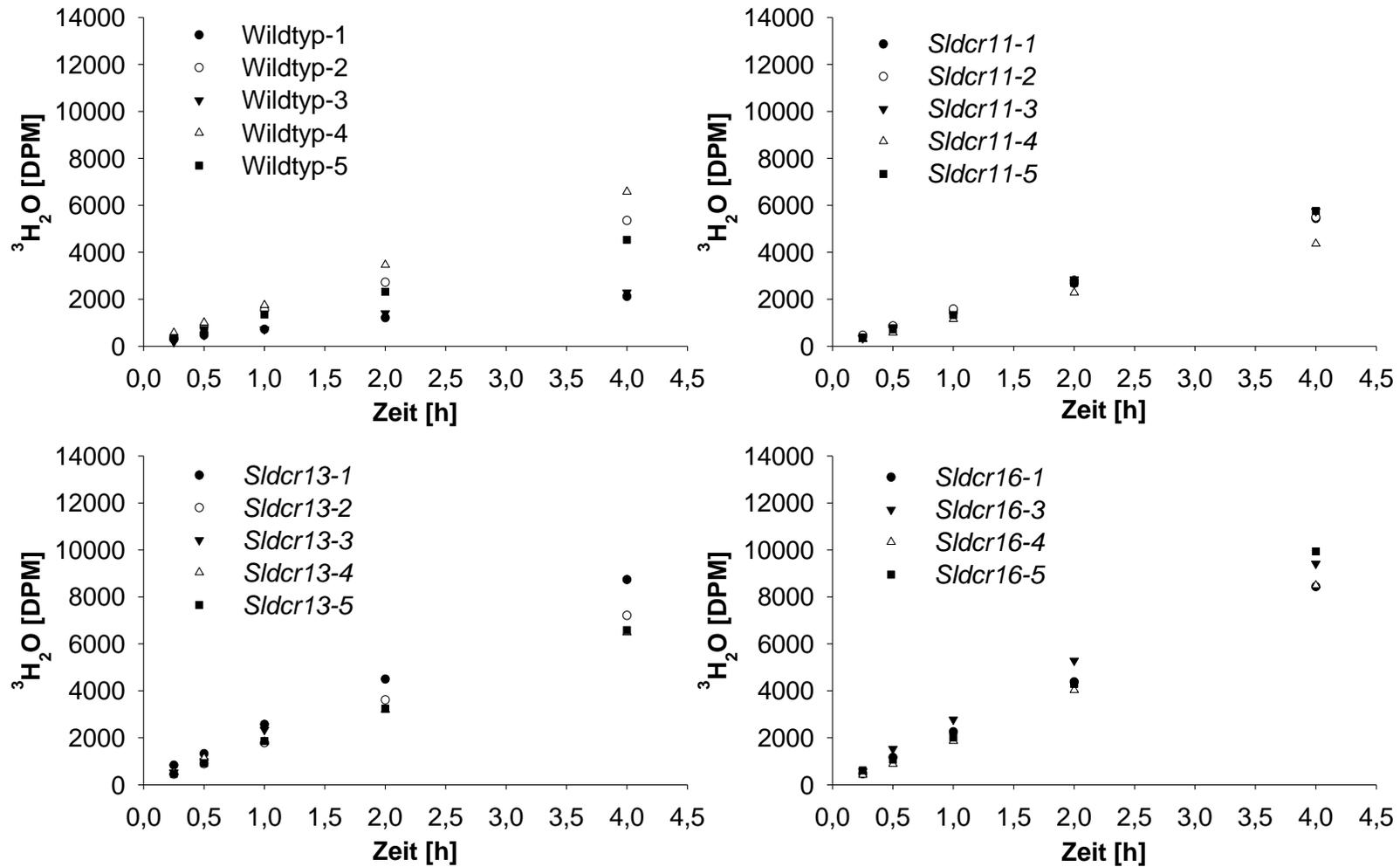
erkennen. Im Gegensatz zum Wildtyp sind auf der *Sldcr*-Kutikula mehr und größere kristalline Wachse vorhanden. Im Querschnitt der *Sldcr11*-Kutikeln sind mehrere Zelllagen erkennbar. Die Zellhohlräume sind kollabiert, was vermutlich auf die Probenpräparation im Hochvakuum zur Goldbeschichtung zurückzuführen ist.

Die beschriebenen phänotypischen Besonderheiten der *Sldcr*-Kutikeln führen zu der Fragestellung, ob die strukturellen Veränderungen Auswirkungen auf die Durchlässigkeit der Kutikula haben. Um diese Frage zu beantworten, wurde die Permeabilität von Wildtyp und *Sldcr*-Kutikeln durch Messung der Transpiration untersucht.

### **3.2.4 Transportstudie zur *Sldcr*-Linie**

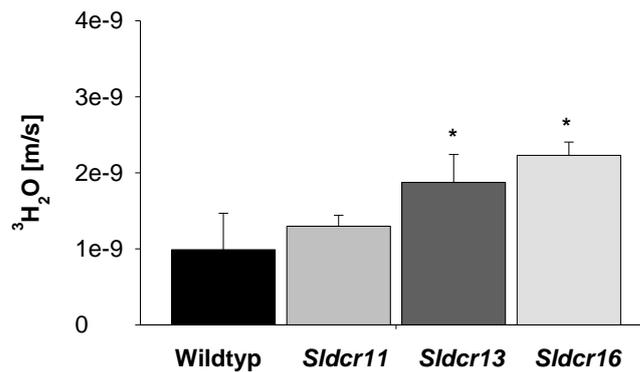
Um die Transpiration der Wildtyp- und *Sldcr*-Kutikeln zu untersuchen, wurden die Kutikeln wie in Kapitel 2.3 erläutert in Transportkammern eingespannt und mit Hilfe Tritium-markierten Wassers ( $^3\text{H}_2\text{O}$ ) die Transpiration ermittelt.

Es wurden die gemessenen Tritiummengen [DPM] gegen die Zeit [h] aufgetragen und die Steigungen ermittelt (Abbildung 3-7). Die  $^3\text{H}_2\text{O}$ -Flussraten zu den Wildtyp- und *Sldcr*-Kutikeln, welche durch die Steigungsgeraden repräsentiert werden, unterscheiden sich nur geringfügig voneinander. Die Flussraten der *Sldcr11*-Linie unterscheiden sich nicht vom Wildtyp, wogegen die Flussraten der *Sldcr13*- und *Sldcr16*-Linie geringfügig höher sind als beim Wildtyp. Zur besseren Beurteilung wurden die Leitwerte berechnet und auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk getestet. Der Test ergab eine Normalverteilung (Kapitel 7.2.1, Tabelle 7-3). Daher wurden Mittelwerte und Standardabweichungen der Leitwerte ermittelt, graphisch dargestellt (Abbildung 3-8) und mittels Student's t-Test auf Signifikanz im Unterschied zum Wildtyp getestet (Kapitel 7.2.1).



**Abbildung 3-7 Flussraten ermittelt an Kutikeln der Sldcr-Linien und des Wildtyps**

Dargestellt sind die gemessenen Gesamtmengen Tritium in DPM, die nach bestimmten Zeitpunkten über die Kutikeln (A) des Wildtyps und (B-D) der *Sldcr*-Linien diffundiert sind. Die Bestimmtheitsmaße der Steigungsgeraden betragen bei allen Kutikeln mindestens 0,98 (Kapitel 7.4, Tabelle 8). DPM (*Disintegrations per minute*: Zerfälle pro Minute)

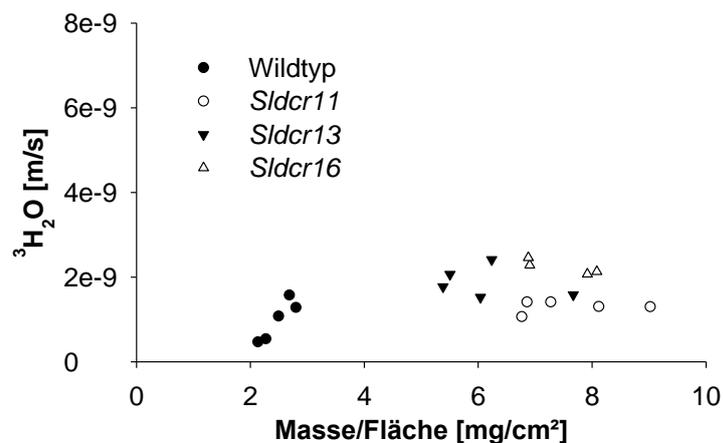


**Abbildung 3-8** Leitwerte der Tomatenfruchtkutikeln der *Sldcr*-Linien und des Wildtyps

Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus jeweils fünf Parallelen beim Wildtyp, *Sldcr11* und *Sldcr13* und vier Parallelen bei *Sldcr16* mit Standardabweichung. Es wurde nach Dunns Methode auf statistisch signifikante Unterschiede getestet. \*:p-Wert < 0,01

Die Leitwerte der *Sldcr*-Linien unterscheiden sich zum Teil von denen des Wildtyps. Der Leitwert der *Sldcr11*-Linie ( $1,3 \pm 0,1 \cdot 10^{-09} \text{ m s}^{-1}$ ) unterscheidet sich nicht signifikant vom Wildtyp ( $9,9 \pm 4,8 \cdot 10^{-10} \text{ m s}^{-1}$ ). Die Leitwerte der Linien *Sldcr13* und *Sldcr16* sind etwa doppelt so hoch (*Sldcr13*:  $1,9 \pm 0,4 \cdot 10^{-09} \text{ m s}^{-1}$ ; *Sldcr16*:  $2,2 \pm 0,2 \cdot 10^{-09} \text{ m s}^{-1}$ ) und signifikant verschieden gegenüber denen des Wildtyps.

Um eine Abhängigkeit der Leitwerte zum Massen-Flächenverhältnis der Kutikula festzustellen, wurden diese jeweilig gegeneinander aufgetragen.



**Abbildung 3-9** Leitwerte der *Sldcr*-Linien und des Wildtyps in Abhängigkeit des Massenflächen-Verhältnis

Dargestellt sind die Leitwerte der Kutikeln der *Sldcr*-Linien und des Wildtyps gegen die Masse pro Fläche der jeweiligen Kutikula.

Die Leitwerte des Wildtyps korrelieren mit dem Massen-Flächenverhältnis ( $R^2 = 0,85$ ) (Abbildung 3-9, Kapitel 7.2.1, Tabelle 7-4). Die Leitwerte der *Sldcr*-Linien dahingegen nicht (alle  $R^2 \leq 0,1$ ). Die *Sldcr*-Kutikeln weisen ein etwa zwei- bis viereinhalbmal höheres Massen-Flächenverhältnis im Vergleich zum Wildtyp auf. Insgesamt weichen die Leitwerte der *Sldcr*-Linien im Vergleich zum Wildtyp nur geringfügig voneinander ab.

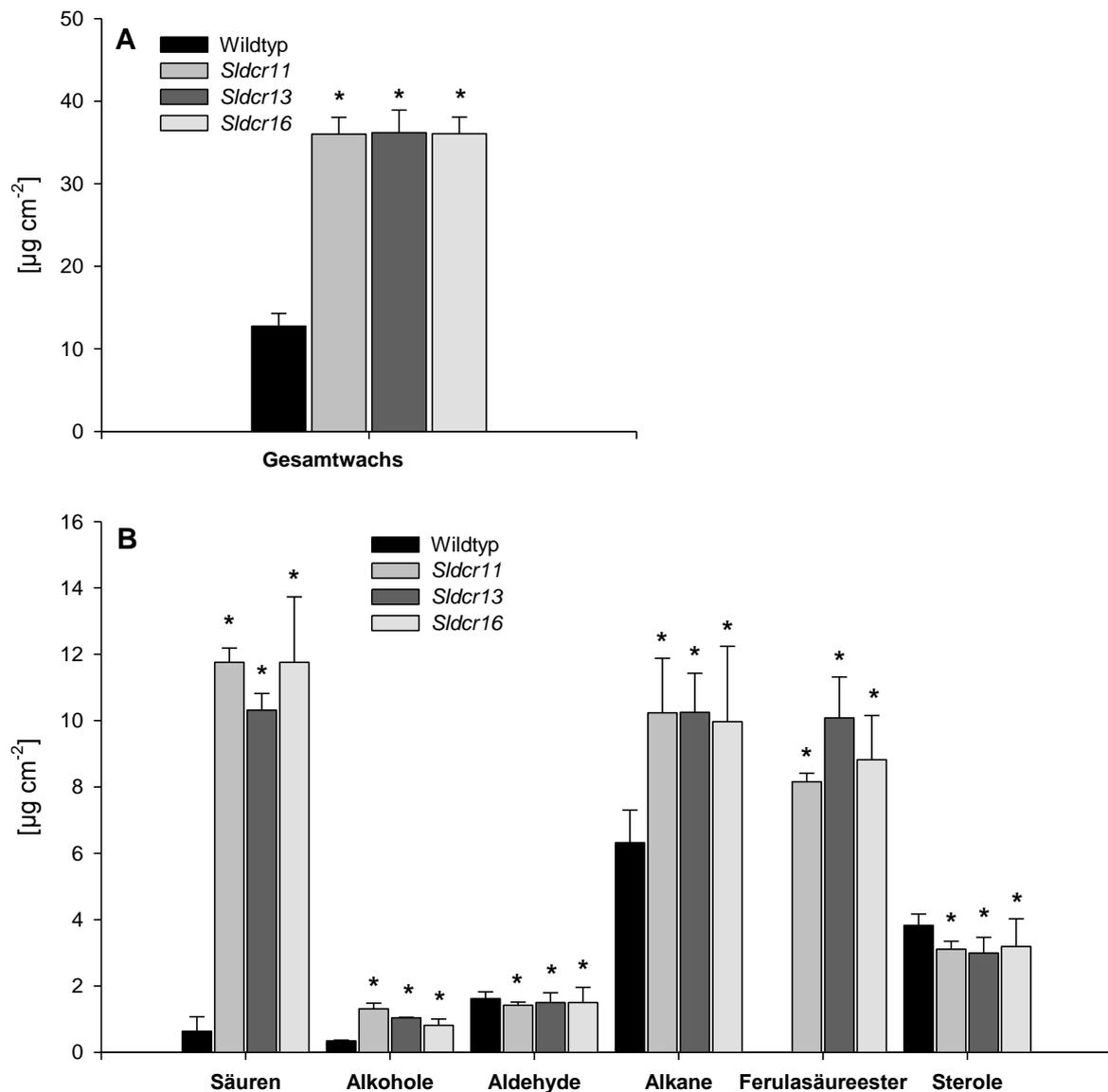
Um weiteren Aufschluss über die Beschaffenheit der *Sldcr*-Kutikeln zu erhalten wurde deren chemische Komposition quantitativ und qualitativ mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie im Vergleich zum Wildtyp untersucht.

### 3.2.5 Analyse des der *Sldcr* Tomatenfruchtwachses

In dieser Untersuchung wurde die Lipidzusammensetzung der löslichen Bestandteile der Tomatenfruchtkutikeln der drei RNAi-Linien, *Sldcr11*, *Sldcr13*, *Sldcr16* und des Wildtyps bestimmt.

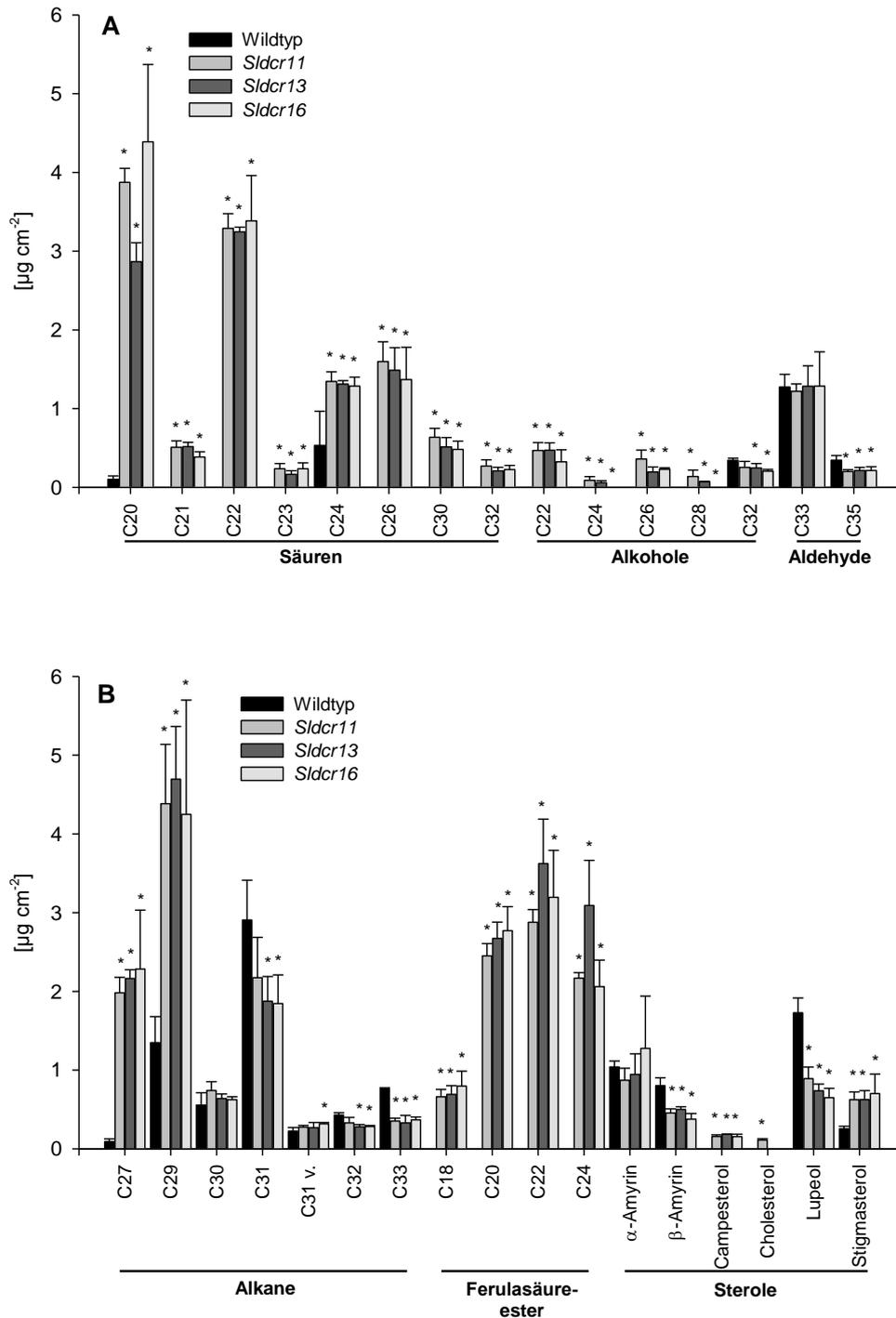
Die drei *Sldcr*-Linien unterscheiden sich drastisch vom Wildtyp, wogegen nur geringfügige Unterschiede der drei RNAi-Linien untereinander vorhanden sind (Abbildung 3-10, Abbildung 3-11). Der Gesamtgehalt des Wachses ist in den *Sldcr*-Linien auf 300 % signifikant erhöht (WT:  $12,8 \pm 1,5 \mu\text{g cm}^{-2}$ , *Sldcr11*:  $36,0 \pm 2,0 \mu\text{g cm}^{-2}$ , *Sldcr13*:  $36,2 \pm 2,7 \mu\text{g cm}^{-2}$ , *Sldcr16*:  $36,1 \pm 2,0 \mu\text{g cm}^{-2}$ ). Ein wesentlicher Unterschied, zwischen den *Sldcr*-Linien und dem Wildtyp, besteht im Auftreten der Ferulasäureester, die im Wildtyp praktisch nicht detektiert wurden (Abbildung 3-10B). Die Ferulasäureester, welche hier 25 % des Gesamtwachs ausmachen, wurden im Wildtyp nicht gefunden (WT:  $0,0 \pm 0,0 \mu\text{g cm}^{-2}$ , *Sldcr11*:  $8,2 \pm 0,3 \mu\text{g cm}^{-2}$ , *Sldcr13*:  $10,1 \pm 1,2 \mu\text{g cm}^{-2}$ , *Sldcr16*:  $8,8 \pm 1,3 \mu\text{g cm}^{-2}$ ). Die Säuren sind im Vergleich zum Wildtyp auf das 16- bis 18-fache signifikant erhöht (WT:  $0,6 \pm 0,4 \mu\text{g cm}^{-2}$ , *Sldcr11*:  $11,8 \pm 0,4 \mu\text{g cm}^{-2}$ , *Sldcr13*:  $10,3 \pm 0,5 \mu\text{g cm}^{-2}$ , *Sldcr16*:  $11,8 \pm 2,0 \mu\text{g cm}^{-2}$ ). In der Mutante sind die Alkane (WT:  $6,3 \pm 1,0 \mu\text{g cm}^{-2}$ , *Sldcr11*:  $10,2 \pm 1,6 \mu\text{g cm}^{-2}$ , *Sldcr13*:  $10,3 \pm 1,2 \mu\text{g cm}^{-2}$ , *Sldcr16*:  $10,0 \pm 2,3 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) und Alkohole (WT:  $0,3 \pm 0,0 \mu\text{g cm}^{-2}$ , *Sldcr11*:  $1,3 \pm 0,2 \mu\text{g cm}^{-2}$ , *Sldcr13*:  $1,0 \pm 0,0 \mu\text{g cm}^{-2}$ , *Sldcr16*:  $0,8 \pm 0,2 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls signifikant erhöht. Die Sterole weisen nur geringe und Aldehyde keine Änderungen in der Zusammensetzung auf (Abbildung 3-11). Der signifikante Anstieg im Gehalt der Säuren, Alkohole und Ferulasäureester betrifft fast alle Monomere innerhalb dieser Stoffklassen. Die relative Darstellung der Einzelbestandteile, die Resultate des

statistischen Tests und Werte zu den Graphiken können dem Anhang entnommen werden (Kapitel 7.2.2).



**Abbildung 3-10 Zusammensetzung des Tomatenfruchtwaxes der *Sldcr*-Linien und des korrespondierenden Wildtyps**

Wachsbestandteile der *Sldcr11/13/16* und des korrespondierenden Wildtyps in [ $\mu\text{g cm}^{-2}$ ] geordnet nach (A) Gesamtgehalt und (B) Substanzklassen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel und Standardabweichung aus drei Parallelen. Mittels *Student's t-Test* wurden die Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante auf Signifikanz geprüft. \*: p-Wert 0,01- 0,05, \*\*: p-Wert unter 0,01

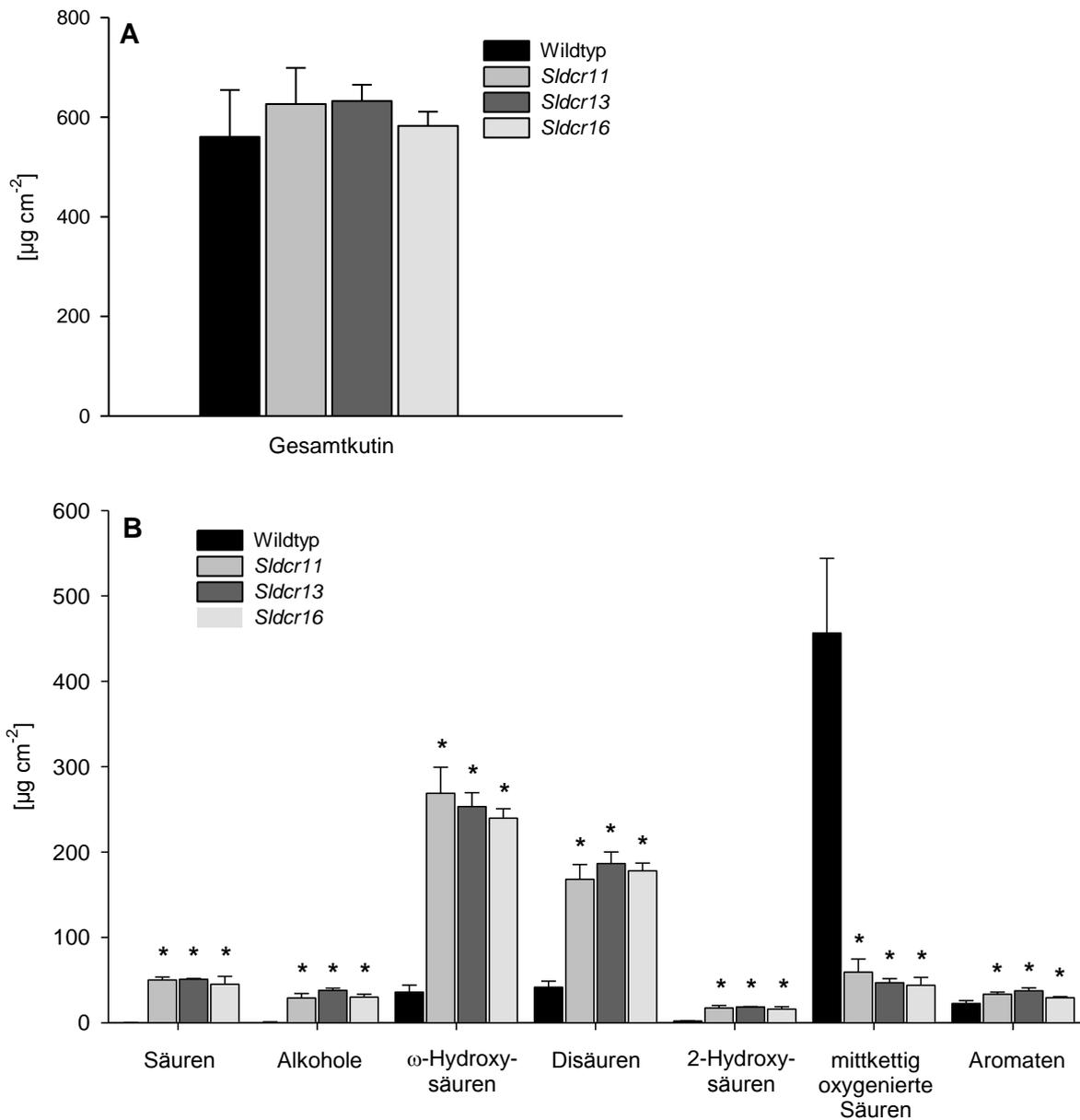


**Abbildung 3-11 Zusammensetzung des Tomatenfruchtwaxes der *Sldcr*-Linien und des korrespondierenden Wildtyps**

Darstellung der Einzelbestandteile (A, B) des Tomatenfruchtwaxes der *Sldcr*-Linien und des korrespondierenden Wildtyps. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus drei Parallelen und deren Standardabweichung. Mittels *Student's t*-Test wurde auf Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante getestet. Resultate der statistischen Analyse können Kapitel 7.5 entnommen werden. v.: verzweigtes Derivat, \*:  $p$ -Wert  $< 0,05$

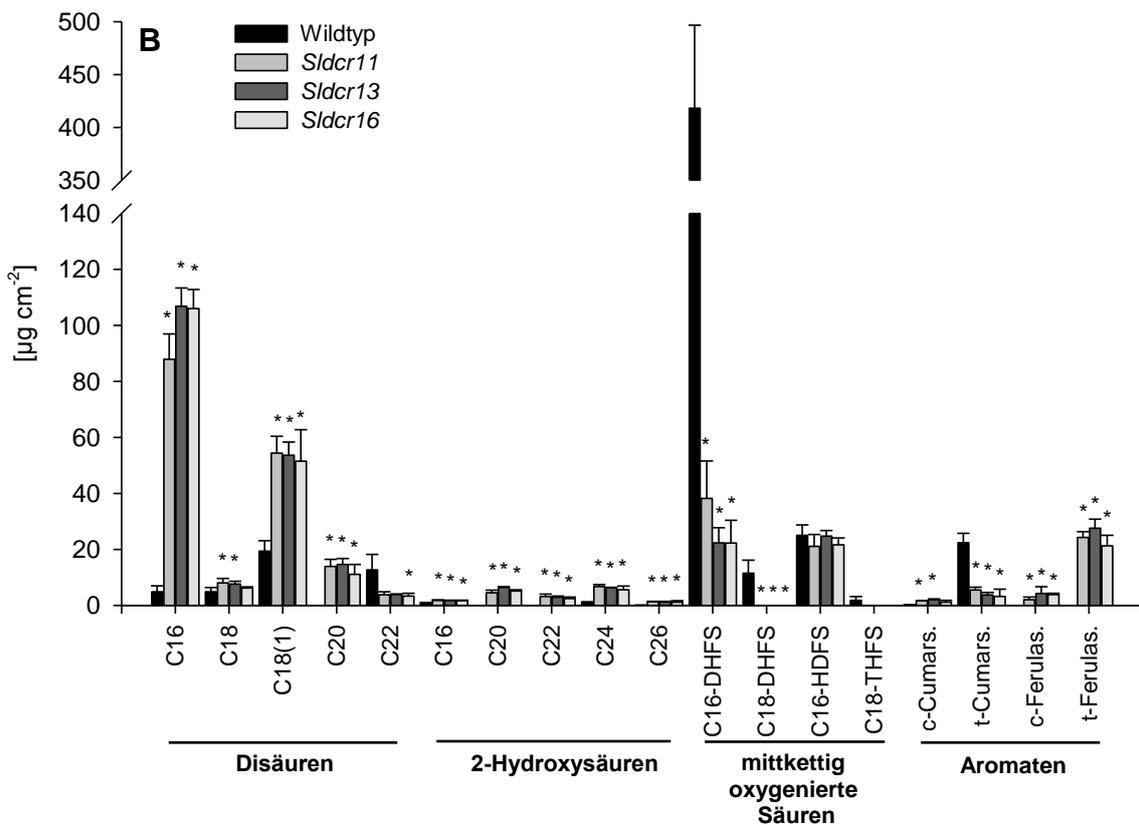
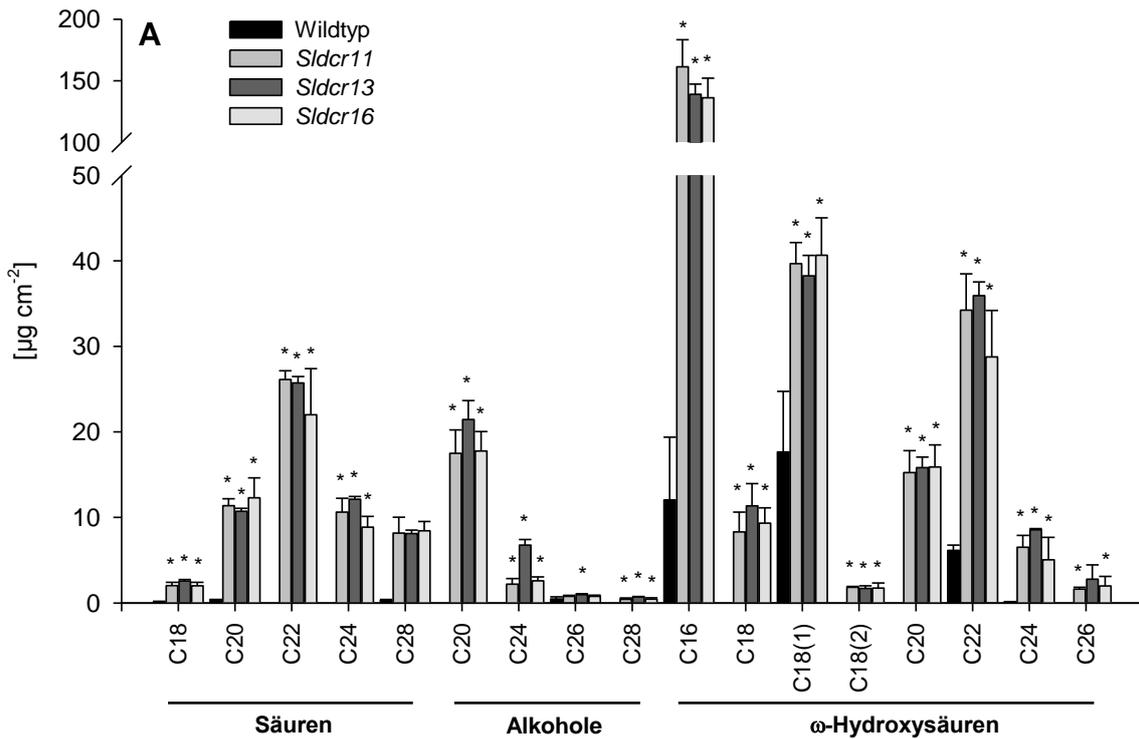
### 3.2.6 Analyse des *Sldcr* Tomatenfruchtkutins

Die Gesamtgehalte (Abbildung 3-12A) des Tomatenfruchtkutins der *Sldcr*-Linien unterscheiden sich nicht signifikant von dem des Wildtyps. Jedoch sind die Kutinzusammensetzungen der *Sldcr*-Linien im Vergleich zum Wildtyp drastisch in ihrer Komposition verändert (Abbildung 3-12B, Abbildung 3-13A-B). Zwischen den Kutinkompositionen der drei *Sldcr*-Linien sind keine nennenswerten Unterschiede vorhanden. Die mittkettig oxygenierten Säuren, als prominenteste Vertreter, machen 81,3 % des Tomatenfruchtkutins im Wildtyp aus und sind in der Mutante signifikant reduziert (WT:  $456,4 \pm 87,6 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT: *Sldcr11*:  $59,3 \pm 15,4 \mu\text{g cm}^{-2}$ , *Sldcr13*:  $47,0 \pm 4,8 \mu\text{g cm}^{-2}$ , *Sldcr16*:  $44,0 \pm 9,4 \mu\text{g cm}^{-2}$ ). Die C<sub>16</sub>-DHFS mit 74,5 % im Wildtyp und in der Mutante mit 3,5 - 6,0 % unterliegt der Reduktion am stärksten (WT:  $418,2 \pm 78,5 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT: *Sldcr11*:  $38,2 \pm 13,4 \mu\text{g cm}^{-2}$ , *Sldcr13*:  $22,3 \pm 5,4 \mu\text{g cm}^{-2}$ , *Sldcr16*:  $22,3 \pm 8,1 \mu\text{g cm}^{-2}$ ). Alle anderen Substanzklassen sind in den *Sldcr*-Linien im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht (Abbildung 3-12B). Die  $\omega$ -Hydroxysäuren sind auf das Siebenfache (WT:  $36,0 \pm 8,0 \mu\text{g cm}^{-2}$ , *Sldcr11*:  $268,9 \pm 30,4 \mu\text{g cm}^{-2}$ , *Sldcr13*:  $253,3 \pm 16,1 \mu\text{g cm}^{-2}$ , *Sldcr16*:  $239,7 \pm 11,1 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) und die Disäuren auf das Vierfache (WT:  $41,8 \pm 7,0 \mu\text{g cm}^{-2}$ , *Sldcr11*:  $168,1 \pm 17,4 \mu\text{g cm}^{-2}$ , *Sldcr13*:  $186,6 \pm 13,5 \mu\text{g cm}^{-2}$ , *Sldcr16*:  $178,1 \pm 9,0 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Die Säuren, Alkohole und 2-Hydroxysäuren sind im Kutinpolyester des Wildtyps mit insgesamt  $3,45 \mu\text{g cm}^{-2}$  (0,63 %)(Abbildung 3-12B) gering vertreten. In den *Sldcr*-Linien sind diese Substanzklassen mit insgesamt  $91,2 \mu\text{g cm}^{-2}$  bis  $107,8 \mu\text{g cm}^{-2}$  (15,4 bis 17,1 %) an der Kutinmatrix beteiligt. Die Aromaten liegen im Gehalt geringfügig aber signifikant erhöht vor (Abbildung 3-12B). Im Wildtyp ist die Cumarsäure mit  $22,6 \pm 3,4 \mu\text{g cm}^{-2}$  der einzige aromatische Vertreter, die in den *Sldcr*-Linien der Gehalt mit 4,3 bis  $7,2 \mu\text{g cm}^{-2}$  auf ein Viertel gesunken ist (Abbildung 3-13A-B). Dagegen sind die Ferulasäuren, welche im Wildtyp nicht detektiert wurden, mit 25,1 bis  $31,2 \mu\text{g cm}^{-2}$  in den *Sldcr*-Linien vertreten. Die Daten zu den Abbildung 3-12 und Abbildung 3-13, sowie die relative Darstellung und die dazugehörigen Daten, sind im Anhang (Kapitel 7.2.2) aufgelistet.



**Abbildung 3-12 Zusammensetzung des Tomatenfruchtkutins der *Slcra*-Linien und des korrespondierenden Wildtyps**

Darstellung des Tomatenfruchtkutins der *Slcra*-Linien und des korrespondierenden Wildtyps geordnet nach (A) Gesamtgehalt und (B) Substanzklassen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus drei Parallelen und deren Standardabweichung. Mittels *Student's t-Test* wurde auf Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante getestet.



**Abbildung 3-13** Zusammensetzung des Tomatenfruchtkutins der *Sldcr*-Linien und des korrespondierenden Wildtyps

Darstellung der Einzelbestandteile (A, B) des Tomatenfruchtkutins der *Sldcr*-Linien und des korrespondierenden Wildtyps. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus drei Parallelen und deren Standardabweichung. C<sub>18</sub>-THFS: 9,10,18-Trihydroxyfettsäure, C<sub>16</sub>-DHFS: Dihydroxyfettsäure bzw. C<sub>18</sub>-DHFS: C<sub>18</sub>-9/10,18-Dihydroxyfettsäure, C<sub>16</sub>-HDFS: Hydroxydifettsäure, \*: p-Wert <0,05

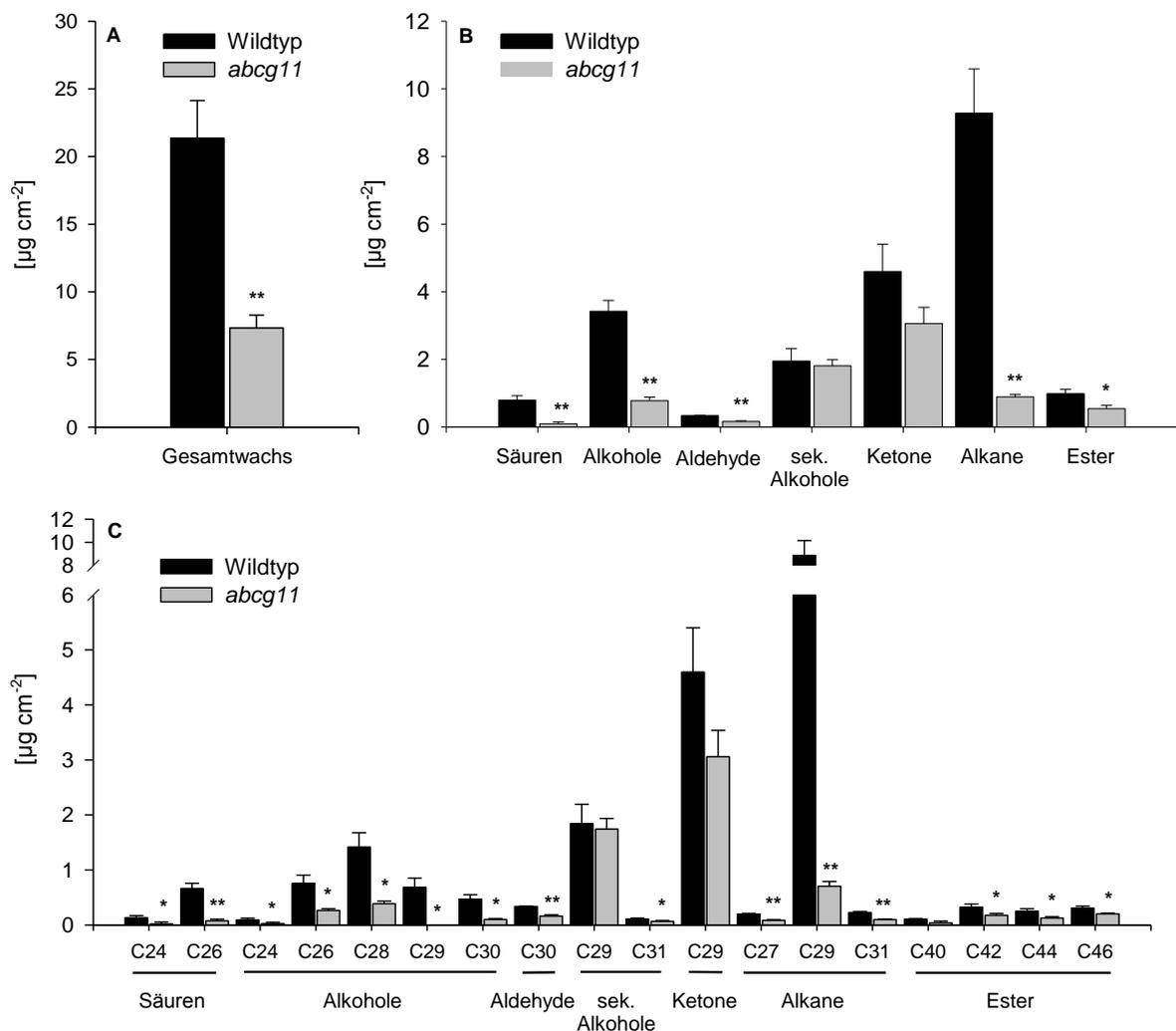
### 3.3 Untersuchung der transgenen ABCG-Linien

In dieser Studie wurden transgene *ABCG11*-Linien in *A. thaliana* in Hinblick auf die Beteiligung an der Assemblierung der Biopolymere Kutin und Suberin untersucht. Die Pflanzen der Knockdownlinien weisen im Vergleich zu vollständigen Knockoutlinien geringere phänotypische Auswirkungen im vegetativen Wachstum auf und ermöglichen eine vollständige Entwicklung der Fortpflanzungsorgane (Panikashvili et al. 2010). Die *abcg11*-Pflanzen sind kleiner als der Wildtyp und weisen eine glänzende Oberfläche der Sprossachse auf. Es treten Organfusionen zwischen Blättern und zwischen Blütenblättern auf. Die Schoten der Mutante sind deformiert und enthalten weniger und zum Teil miteinander fusionierte Samen. Außerdem wurden lipophile Einschlüsse, wie in Kapitel 1.3.3 beschrieben, im Cytoplasma der Epidermiszellen der oberirdischen Organe beobachtet. Die Expression des *ABCG11*-Gens war in allen untersuchten Geweben der Knockdownlinien verringert. Mittels qRT-PCR (*quantitative realtime-poylmerase chain reaction*) konnte die verminderte Expression verschiedener Gene der Wachs- und Kutinbiosynthese in Sprossachsen und Blättern nachgewiesen werden (Panikashvili et al. 2010). Wie in der Einleitung beschrieben wurden von den Knockdownlinien, im Folgenden als *abcg11*-Linie bezeichnet, die Wachszusammensetzung der Sprossachse (Kapitel 3.3.1) und die Polyesterzusammensetzungen der Sprossachsen, Blätter, Blüten, Schoten und Wurzeln (Kapitel 3.3.2 ff.) untersucht. Des Weiteren wurden von den Überexpressionslinien, im Folgenden als *ABCG11-OE*-Linie bezeichnet, die Polyesterzusammensetzungen der Sprossachse, der Blätter und der Wurzel untersucht. Die relativen Darstellungen der Wachs-, Kutin- und Suberinzusammensetzungen und die Resultate der statistischen Tests können dem Anhang (Kapitel 7.3) entnommen werden.

#### 3.3.1 Analyse der Sprossachsenwachse der *abcg11*-Linie

Die Gesamtmenge des Sprossachsenwachses (Abbildung 3-14A) ist in der Knockdownlinie *abcg11* im Vergleich zum Wildtyp um 65 % signifikant reduziert (WT:  $21,4 \pm 2,8 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $7,3 \pm 1,0 \mu\text{g cm}^{-2}$ ). In allen Substanzklassen (Abbildung 3-14B), außer dem der sekundären Alkohole, sind mengenmäßige Verringerungen feststellbar. Die Betrachtung der Einzelsubstanzen (Abbildung 3-14C) verdeutlicht, dass in der Mutante alle Wachsbestandteile, mit Ausnahme der sekundären Alkohole, einer signifikanten Reduktion im Vergleich zum Wildtyp unterliegen. Die Hauptbestandteile des Wachses zeigen die höchsten Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp. In der Mutante ist

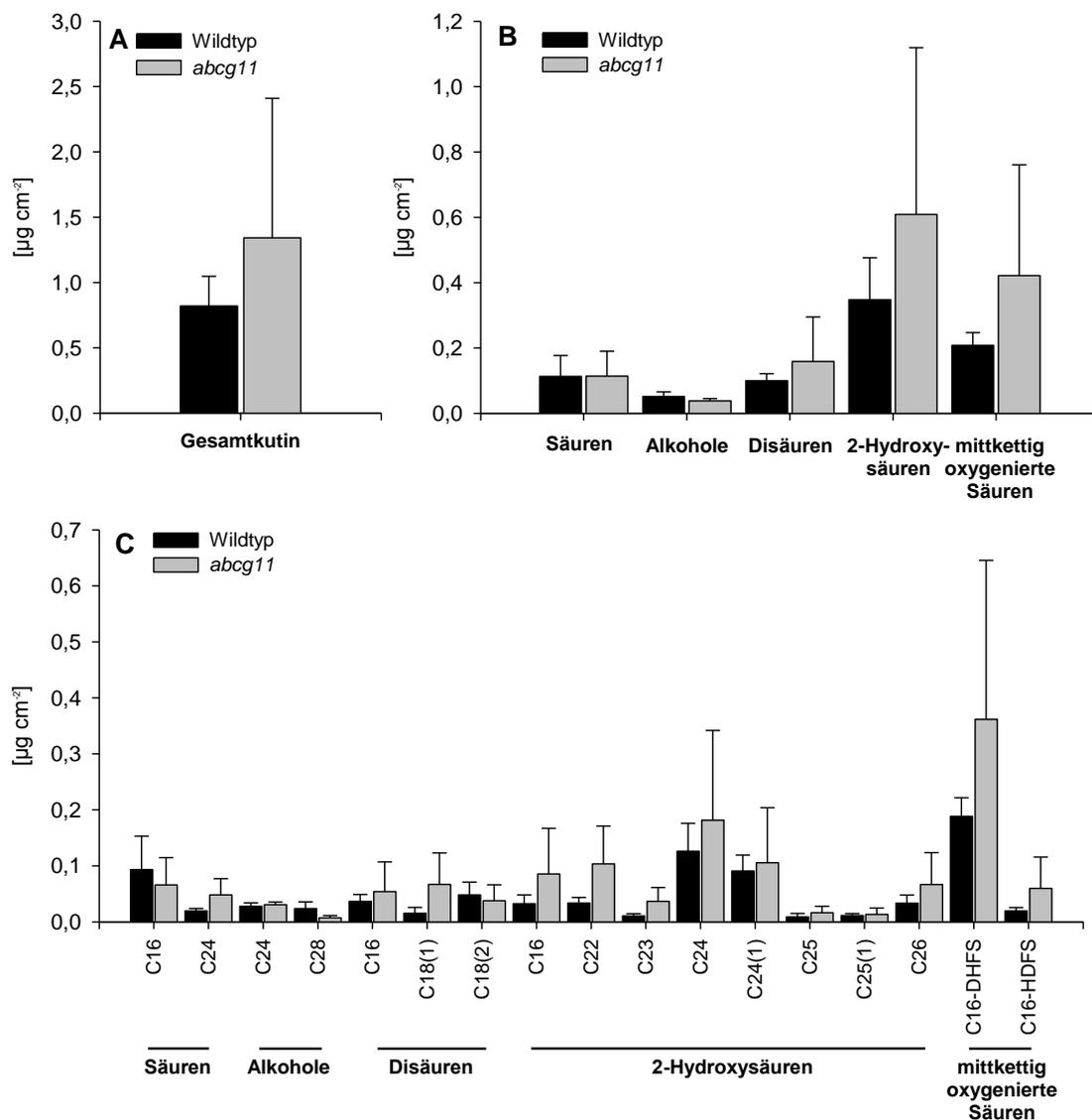
Nonacosan ( $C_{29}$ -Alkan) um 92 % (WT:  $8,86 \pm 1,29 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $0,71 \pm 0,09 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) und Nonacosanon ( $C_{29}$ -Keton) um 33 % reduziert (WT:  $4,60 \pm 0,81 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $3,06 \pm 0,48 \mu\text{g cm}^{-2}$ ). In der relativen Darstellung der Wachsbestandteile (Abbildung 7-5, Kapitel 7.3), fallen die Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp geringer aus, wobei das Nonacosan auf 1/4 reduziert (WT:  $41,40 \pm 0,69 \%$ , MT:  $9,65 \pm 0,47 \%$ ) ist, aber das sek. Nonacosanol (sek.  $C_{29}$ -Alkohol) (WT:  $8,58 \pm 0,69 \%$ , MT:  $23,82 \pm 0,88 \%$ ) und das Nonacosanon (WT:  $21,43 \pm 1,17 \%$ , MT:  $41,58 \pm 1,30 \%$ ) sich anteilig etwa verdoppelt haben.



**Abbildung 3-14 Zusammensetzung des Sprossachsenwachses der abcg11-Linie und des korrespondierenden Wildtyps**

Wachsbestandteile geordnet nach (A) Gesamtgehalt, (B) Substanzklassen und (C) Einzelbestandteilen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus drei Parallelen mit Standardabweichungen. Es wurde ein zweiseitiger *Student's t*-Test mit ungleicher Varianz auf statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante durchgeführt. \*: p-Werte zwischen 0,01-0,05, \*\*: p-Wert < 0,01

### 3.3.2 Analyse des Sprossachsenkutins der *abcg11*- Linie



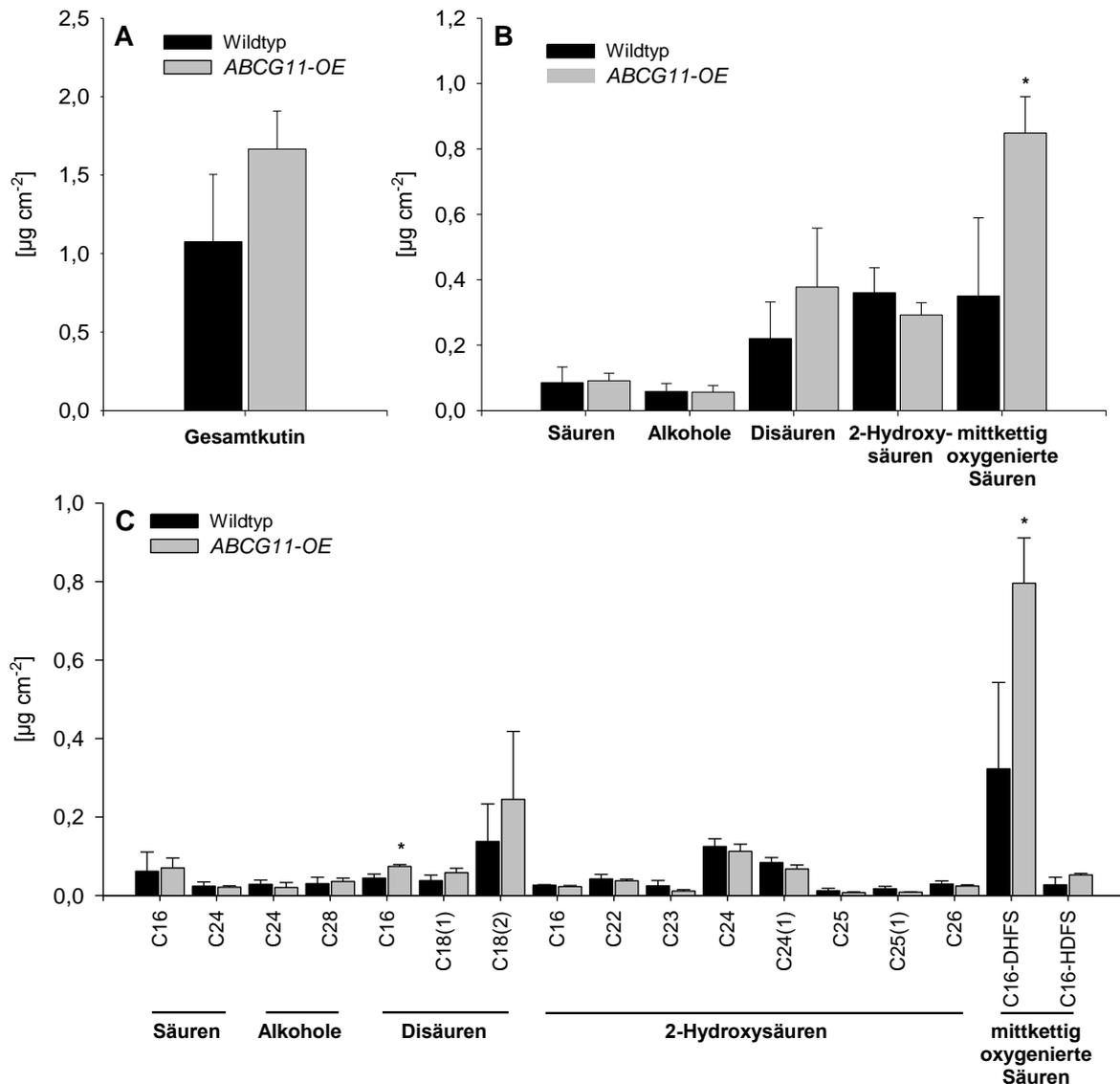
**Abbildung 3-15** Zusammensetzung des Sprossachsenkutins der *abcg11*-Linie und des korrespondierenden Wildtyps

Kutinbestandteile geordnet nach (A) Gesamtgehalt, (B) Substanzklasse und (C) der absoluten Verteilung der Einzelmonomere. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus drei Parallelen mit Standardabweichung. Mittels zweiseitigen *Student's t*-Test wurde die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante geprüft. \*: *t*-Test < 0,05. Die Anzahl der Doppelbindungen wurde in Klammern gesetzt. C<sub>16</sub>-DHFS: Dihydroxyfettsäure, C<sub>16</sub>-HDFS: Hydroxyfettsäure

Die Gesamtmenge des Sprossachsenkutins der Knockdownlinie *abcg11* (Abbildung 3-15A) ist im Vergleich zum Wildtyp um 63 % nicht signifikant erhöht (WT:  $0,82 \pm 0,23 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $1,34 \pm 1,07 \mu\text{g cm}^{-2}$ ). Die Erhöhung liegt in den nicht signifikanten Steigerungen der 2-Hydroxysäuren um 74 % (Abbildung 3-15B, WT:  $0,35 \pm 0,13 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $0,61 \pm 0,51 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) und den der mittkettig oxygenierten Säuren um 100 % begründet (WT:  $0,21 \pm 0,04 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $0,42 \pm 0,34 \mu\text{g cm}^{-2}$ ). In diesen

Substanzklassen findet man in der Mutante ausschließlich nicht signifikant erhöhte Einzelbestandteile (Abbildung 3-15C).

### 3.3.3 Analyse des Sprossachsenkutins der ABCG11-OE-Linie



**Abbildung 3-16** Zusammensetzung des Sprossachsenkutins der ABCG11-OE-Linie und des korrespondierenden Wildtyps

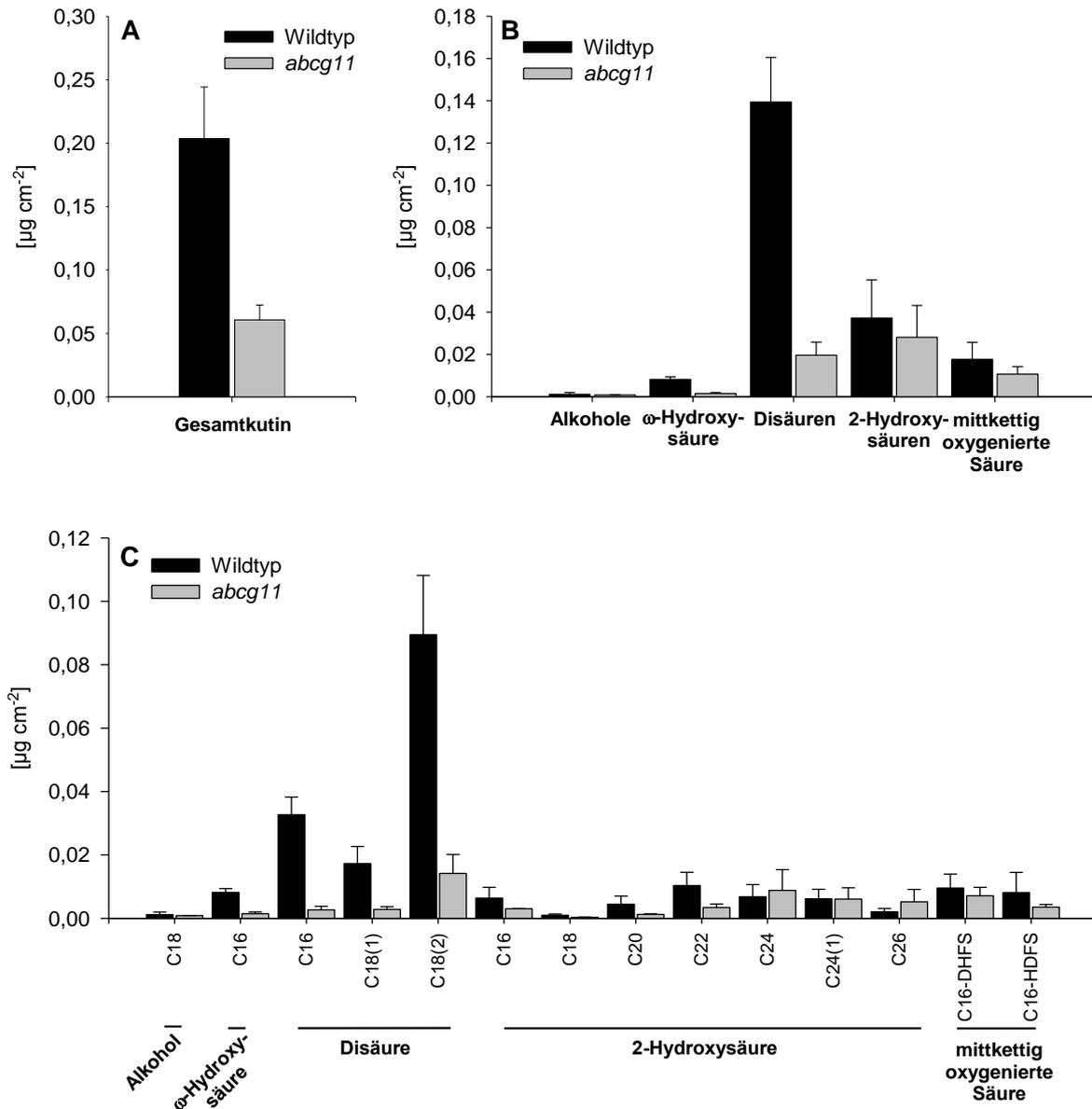
Kutinbestandteile geordnet nach (A) Gesamtgehalt, (B) Substanzklassen und (C) Einzelbestandteilen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus drei Parallelen und die Standardabweichungen. Es wurde ein zweiseitiger *Student's t*-Test mit ungleicher Varianz auf statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante durchgeführt. \*: p-Werte < 0,05 Die Anzahl der Doppelbildungen wurde in Klammern gesetzt. C<sub>16</sub>-DHFS: Dihydroxyfettsäure, C<sub>16</sub>-HDFS: Hydroxydifettsäure

Der Gesamtgehalt des Sprossachsenkutins (Abbildung 3-16A) ist in der Überexpressionslinie *ABCG11-OE* im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant um 56 % erhöht (WT:  $1,07 \pm 0,43 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $1,67 \pm 0,24 \mu\text{g cm}^{-2}$ ). Dies beruht auf der

signifikanten Steigerung der mittkettig oxygenierten Säuren auf 240 % (Abbildung 3-16B; WT:  $0,35 \pm 0,24 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $0,85 \pm 0,11 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) und der nicht signifikanten Steigerung der Disäuren auf 170 % (WT:  $0,22 \pm 0,11 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $0,38 \pm 0,18 \mu\text{g cm}^{-2}$ ). Die Betrachtung der einzelnen Monomere (Abbildung 3-16C) zeigt einen höheren Gehalt aller Monomere der genannten Substanzklassen. In der Mutante liegen im Vergleich zum Wildtyp die  $C_{16}$ -Disäure um 75 % (WT:  $0,04 \pm 0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $0,07 \pm <0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) und die  $C_{16}$ -DHFS um 150 % (WT:  $0,32 \pm 0,22 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $0,80 \pm 0,12 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) signifikant erhöht vor. Auch die  $C_{18:1}$ -Disäure (WT:  $0,04 \pm 0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $0,06 \pm 0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$ ),  $C_{18:2}$ -Disäure (WT:  $0,14 \pm 0,10 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $0,25 \pm 0,17 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) und  $C_{16}$ -HDFS (WT:  $0,03 \pm 0,02 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $0,05 \pm <0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) weisen in der Mutante einen tendenziell höheren Gehalt im Vergleich zum Wildtyp auf.

### 3.3.4 Analyse des Blattkutins der *abcg11*-Linie

Die angegebenen Gehalte entsprechen beim Wildtyp dem Mittelwert mit Standardabweichung und bei der Mutante dem Mittelwert und der Ober-/Untergrenze. Der Gesamtgehalt des Blattkutins in der Knockdownlinie *abcg11* (Abbildung 3-17A) ist im Vergleich zum Wildtyp auf 37,5 % reduziert (WT:  $0,16 \pm 0,02 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $0,06 \pm 0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$ ). Im Wildtyp stellen die Disäuren mit 85 % die Hauptbestandteile des Blattkutins dar (Abbildung 3-17B) welche in der Mutante auf 33 % reduziert sind (WT:  $0,14 \pm 0,02 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $0,02 \pm 0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$ ). Auch die  $\omega$ -Hydroxysäuren (WT:  $8,17 \cdot 10^{-3} \pm 1,21 \cdot 10^{-3} \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $1,47 \cdot 10^{-3} \pm 0,54 \cdot 10^{-3} \mu\text{g cm}^{-2}$ ) und mittkettig oxygenierten Säuren (WT:  $0,02 \pm 0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $0,01 \pm <0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) liegen gegenüber dem Wildtyp mit 82 % bzw. 61 % in der Mutante in geringerer Menge vor. Die Betrachtung der Einzelmonomere (Abbildung 3-17C) verdeutlicht, dass in der Mutante alle Monomere der Disäuren,  $\omega$ -Hydroxysäuren, mittkettig oxygenierten Säuren und der 2-Hydroxysäuren mit Kettenlängen kleiner  $C_{24}$  einen geringeren Gehalt im Vergleich zum Wildtyp aufweisen.



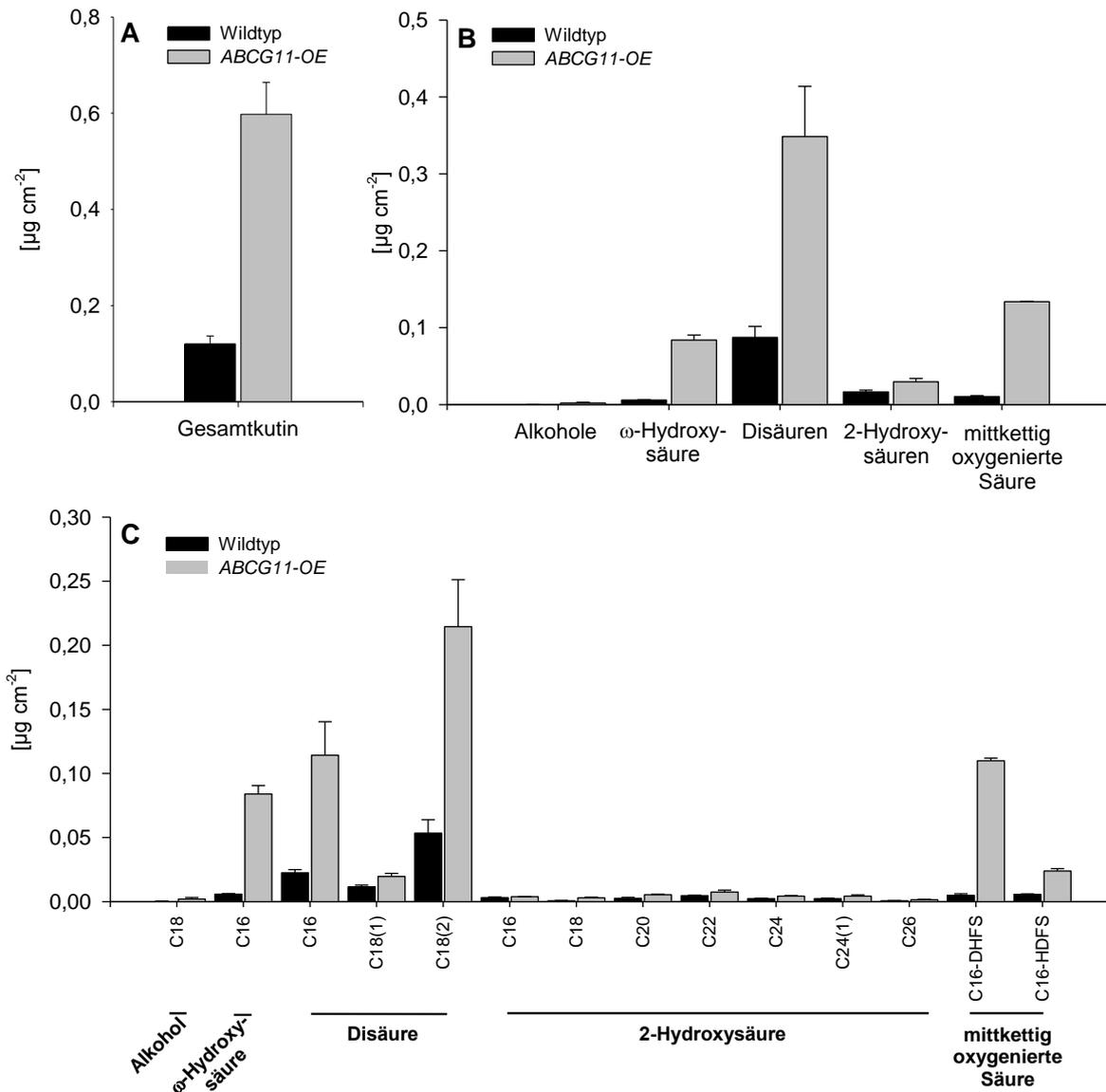
**Abbildung 3-17** Zusammensetzung des Blattkutins der *abcg11*-Linie und des korrespondierenden Wildtyps

Kutinbestandteile geordnet nach (A) Gesamtgehalt, (B) Substanzklassen und (C) den Einzelbestandteilen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel des Wildtyps aus drei Parallelen mit Standardabweichungen und der Mutante aus zwei Parallelen mit Ober-/Untergrenze. Die Anzahl der Doppelbindungen wurde in Klammern gesetzt. C16-DHFS: Dihydroxyfettsäure, C16-HDFS: Hydroxydifettsäure

### 3.3.5 Analyse des Blattkutins der ABCG11-OE-Linie

Die angegebenen Gehalte entsprechen beim Wildtyp dem Mittelwert mit Standardabweichung und bei der Mutante dem Mittelwert und der Ober-/Untergrenze. Die Gesamtmenge des Blattkutins ist in der Überexpressionslinie *ABCG11-OE* im Vergleich zum Wildtyp um das Vierfache erhöht (Abbildung 3-18A) (WT:  $0,12 \pm 0,02 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $0,60 \pm 0,07 \mu\text{g cm}^{-2}$ ). Diese Änderung beruht hauptsächlich darauf, dass die Menge der

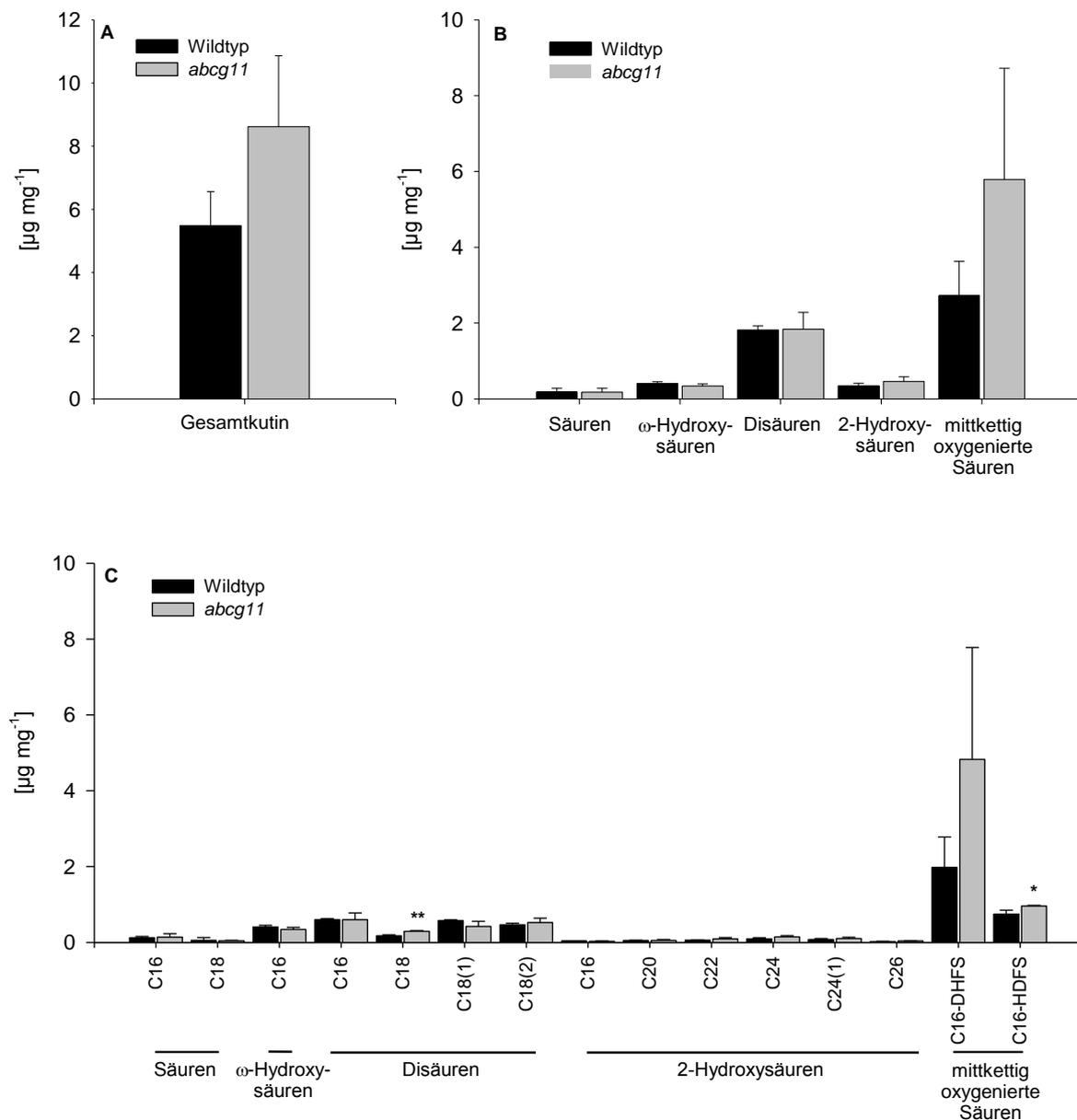
Disäuren (Abbildung 3-18B) auf das Vierfache (WT:  $0,09 \pm 0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $0,35 \pm 0,07 \mu\text{g cm}^{-2}$ ), der  $\omega$ -Hydroxysäuren auf das 14-fache (WT:  $5,9 \cdot 10^{-3} \pm 0,4 \cdot 10^{-3} \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $0,08 \pm 0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$ ) und der mittkettig oxygenierten Säuren auf das 13-fache erhöht ist (WT:  $0,01 \pm <0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$ , MT:  $0,13 \pm <0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$ ). Die Darstellung der Einzelmonomere (Abbildung 3-18C) zeigt, dass die Mengen aller Monomere dieser Substanzklassen im Vergleich zum Wildtyp erhöht sind.



**Abbildung 3-18** Zusammensetzung des Blattkutins der Überexpressionslinie ABCG11-OE und des korrespondierenden Wildtyps

Kutinbestandteile geordnet nach (A) Gesamtgehalt, (B) Substanzklassen und (C) den Einzelbestandteilen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel des Wildtyps aus drei Parallelen mit Standardabweichung und der Mutante aus zwei Parallelen mit Ober-/Untergrenze. C<sub>16</sub>-DHFS: Dihydroxyfettsäure, C<sub>16</sub>-HDFS: Hydroxydifettsäure

### 3.3.6 Analyse des Blütenkutins der *abcg11*-Linie



**Abbildung 3-19 Zusammensetzung des Blütenkutins der *abcg11*-Linie und des korrespondierenden Wildtyps**

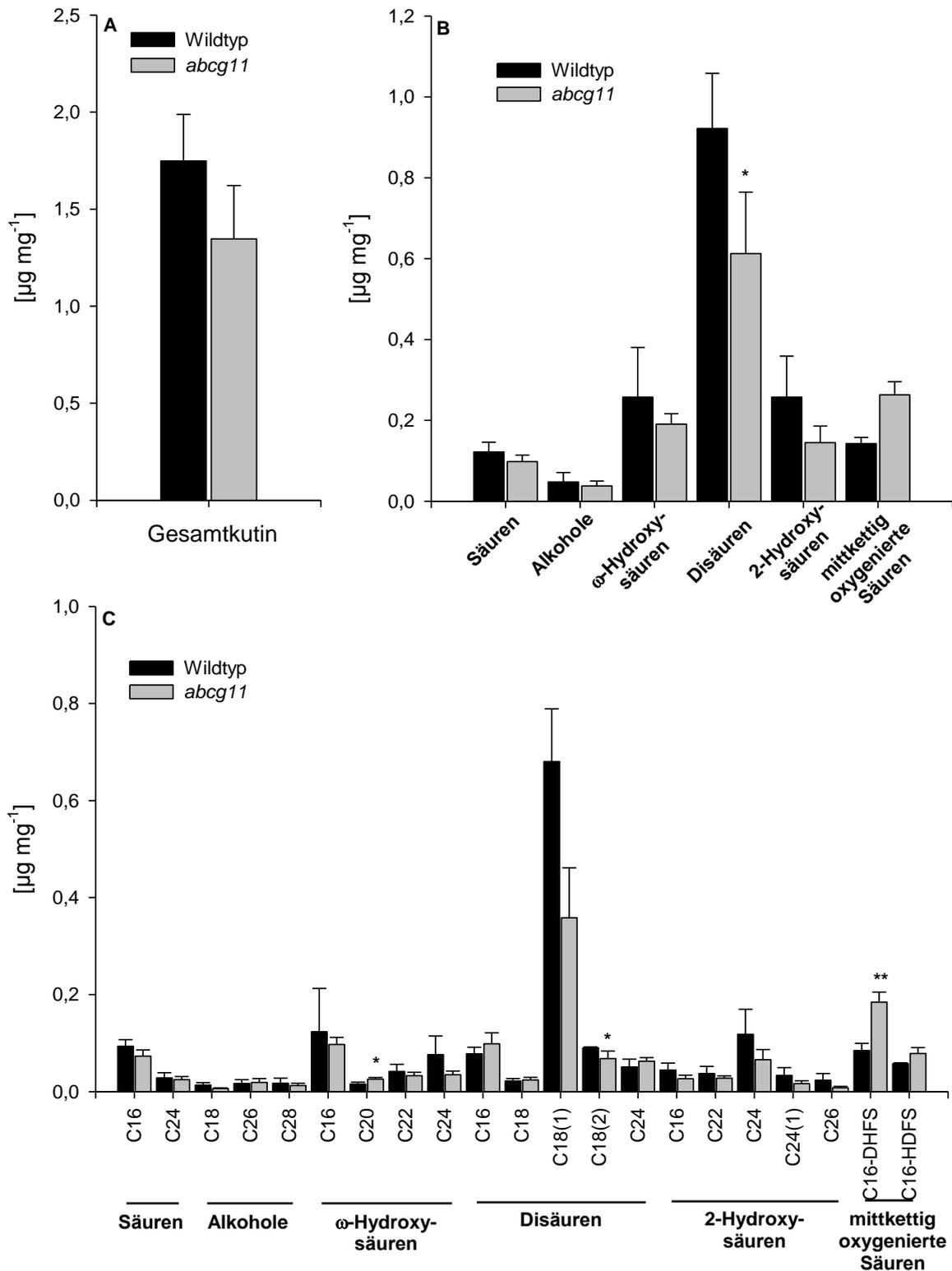
Kutinbestandteile geordnet nach (A) Gesamtgehalt, (B) Substanzklassen und (C) den Einzelbestandteilen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei Parallelen. Es wurde ein zweiseitiger *Student's t*-Test mit ungleicher Varianz auf Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante durchgeführt. \*: p-Werte zwischen 0,01 – 0,05, \*\*: p-Werte <0,01, C<sub>16</sub>-DHFS: Dihydroxyfettsäure, C<sub>16</sub>-HDFS: Hydroxydifettsäure

Der Gesamtgehalt des Blütenkutins der Knockdownlinie *abcg11* (Abbildung 3-19A) ist im Vergleich zum Wildtyp tendenziell erhöht (WT:  $5,48 \pm 1,09 \mu\text{g mg}^{-1}$ , MT:  $8,61 \pm 2,25 \mu\text{g mg}^{-1}$ ). Der Unterschied basiert hauptsächlich auf einer Akkumulation der mittkettig oxygenierten Säuren (Abbildung 3-19B). In der Mutante ist die Menge an C<sub>16</sub>-DHFS (Abbildung 3-19C) auf 250 % des Wildtypniveaus erhöht

(WT:  $1,98 \pm 0,80 \mu\text{g mg}^{-1}$ ,  $4,83 \pm 2,95 \mu\text{g mg}^{-1}$ ). Außerdem konnten signifikant höhere Gehalte an C<sub>18</sub>-Disäure (WT:  $0,18 \pm 0,03 \mu\text{g mg}^{-1}$ , MT:  $0,29 \pm 0,02 \mu\text{g mg}^{-1}$ ) und C<sub>16</sub>-HDFS (WT:  $0,74 \pm 0,11 \mu\text{g mg}^{-1}$ , MT:  $0,96 \pm 0,02 \mu\text{g mg}^{-1}$ ) gemessen werden.

### 3.3.7 Analyse des Schotenkutins der *abcg11*-Linie

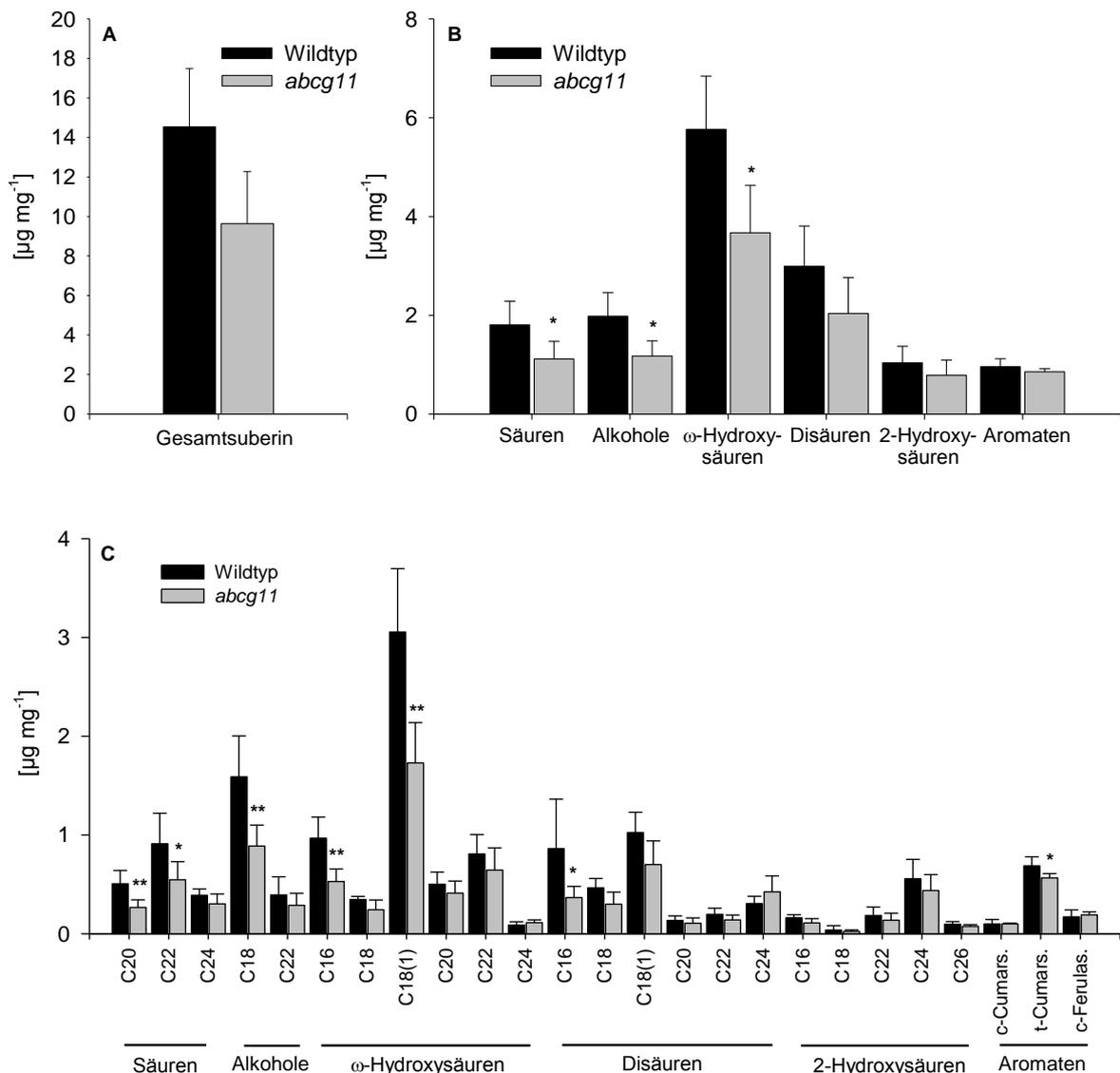
Der Menge des Schotenkutins in der Knockdownlinie *abcg11* (Abbildung 3-20A) ist im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant reduziert (WT:  $1,75 \pm 0,24 \mu\text{g mg}^{-1}$ , MT:  $1,35 \pm 0,28 \mu\text{g mg}^{-1}$ ). Diese Änderung beruht auf der signifikanten Reduktion der Disäuren (Abbildung 3-20B, WT:  $0,92 \pm 0,14 \mu\text{g mg}^{-1}$ , MT:  $0,61 \pm 0,15 \mu\text{g mg}^{-1}$ ). In dieser Substanzklasse sind hauptsächlich das Hauptmonomer, die C<sub>18:1</sub>-Disäure (Abbildung 3-20C, WT:  $0,09 \pm <0,01 \mu\text{g mg}^{-1}$ , MT:  $0,07 \pm 0,02 \mu\text{g mg}^{-1}$ ) und geringfügig die C<sub>18:2</sub>-Disäure (WT:  $0,68 \pm 0,11 \mu\text{g mg}^{-1}$ , MT:  $0,36 \pm 0,10 \mu\text{g mg}^{-1}$ ) verringert. In der Mutantenlinie sind die mittkettig oxygenierten Säuren im Vergleich zum Wildtyp signifikant akkumuliert (Abbildung 3-20B, C). Die Menge der C<sub>16</sub>-DHFS ist doppelt so hoch (WT:  $0,08 \pm 0,01 \mu\text{g mg}^{-1}$ , MT:  $0,18 \pm 0,02 \mu\text{g mg}^{-1}$ ) und die Menge der C<sub>16</sub>-HDFS um 33 % erhöht (WT:  $0,06 \pm <0,01 \mu\text{g mg}^{-1}$ , MT:  $0,08 \pm 0,01 \mu\text{g mg}^{-1}$ ).



**Abbildung 3-20** Zusammensetzung des Schotenkutins der *abcg11*-Linie und des korrespondierenden Wildtyps

(A) Darstellung der Kutinbestandteile geordnet nach Substanzklassen, Gesamtgehalt und (B) einzelnen Monomeren. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus drei Parallelen mit Standardabweichung. Es wurde ein zweiseitiger *Student's t*-Test auf Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante durchgeführt. \*:p-Wert 0,01 bis 0,05, \*\*: Werte <0,01, C<sub>16</sub>-DHFS: Dihydroxyfettsäure, C<sub>16</sub>-HDFS: Hydroxydifettsäure

### 3.3.8 Analyse des Wurzelsuberins der *abcg11*-Linie



**Abbildung 3-21 Zusammensetzung des Wurzelsuberins der *abcg11*-Linie und des korrespondierenden Wildtyps**

Darstellung der Suberinbestandteile geordnet nach (A) Gesamtgehalt, (B) Substanzklasse und (C) einzelnen Monomeren. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus fünf Parallelen des Wildtyps und drei Parallelen bei der Mutante, jeweils mit Standardabweichung. Es wurde ein zweiseitiger *Student's t-Test* auf Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante durchgeführt. \*: p-Wert 0,01 bis 0,05, \*\*: p-Wert < 0,01, c-/t-Cumars.: cis-/trans-Cumarsäure, c-Ferulas.: cis-Ferulasäure

Die Gesamtmenge des Wurzelsuberins ist in der Knockdownlinie im Vergleich zum Wildtyp um 34 % signifikant reduziert (Abbildung 3-21A, WT: 14,54 ± 2,94  $\mu\text{g mg}^{-1}$ , MT: 9,64 ± 2,63  $\mu\text{g mg}^{-1}$ ). Dies basiert auf der signifikanten Reduktion der  $\omega$ -Hydroxysäuren um 36 % (Abbildung 3-21B, WT: 5,76 ± 1,08  $\mu\text{g mg}^{-1}$ , MT: 3,67 ± 0,96  $\mu\text{g mg}^{-1}$ ), der Säuren um 38 % (WT: 1,81 ± 0,48  $\mu\text{g mg}^{-1}$ , MT: 1,11 ± 0,35  $\mu\text{g mg}^{-1}$ ) und der Alkohole um 40 % (WT: 1,98 ± 0,48  $\mu\text{g mg}^{-1}$ , MT: 1,18 ± 0,31  $\mu\text{g mg}^{-1}$ ), sowie der nicht signifikanten

Verringerung der Disäuren um 30 % (WT:  $2,99 \pm 0,82 \mu\text{g mg}^{-1}$ , MT:  $2,04 \pm 0,73 \mu\text{g mg}^{-1}$ ). In diesen Substanzklassen sind vereinzelte Suberinmonomere (Abbildung 3-21C) signifikant verringert. Die  $\text{C}_{16}$ - $\omega$ -Hydroxysäure,  $\text{C}_{18:1}$ - $\omega$ -Hydroxysäure,  $\text{C}_{16}$ -Disäure,  $\text{C}_{18}$ -Alkohol, sowie die  $\text{C}_{20}$ - und  $\text{C}_{22}$ -Säure weisen einen signifikant geringeren Gehalt zum Wildtyp auf, die Werte können der folgenden Tabelle 3-2 entnommen werden.

**Tabelle 3-2 Signifikant unterschiedliche Suberinmengen**

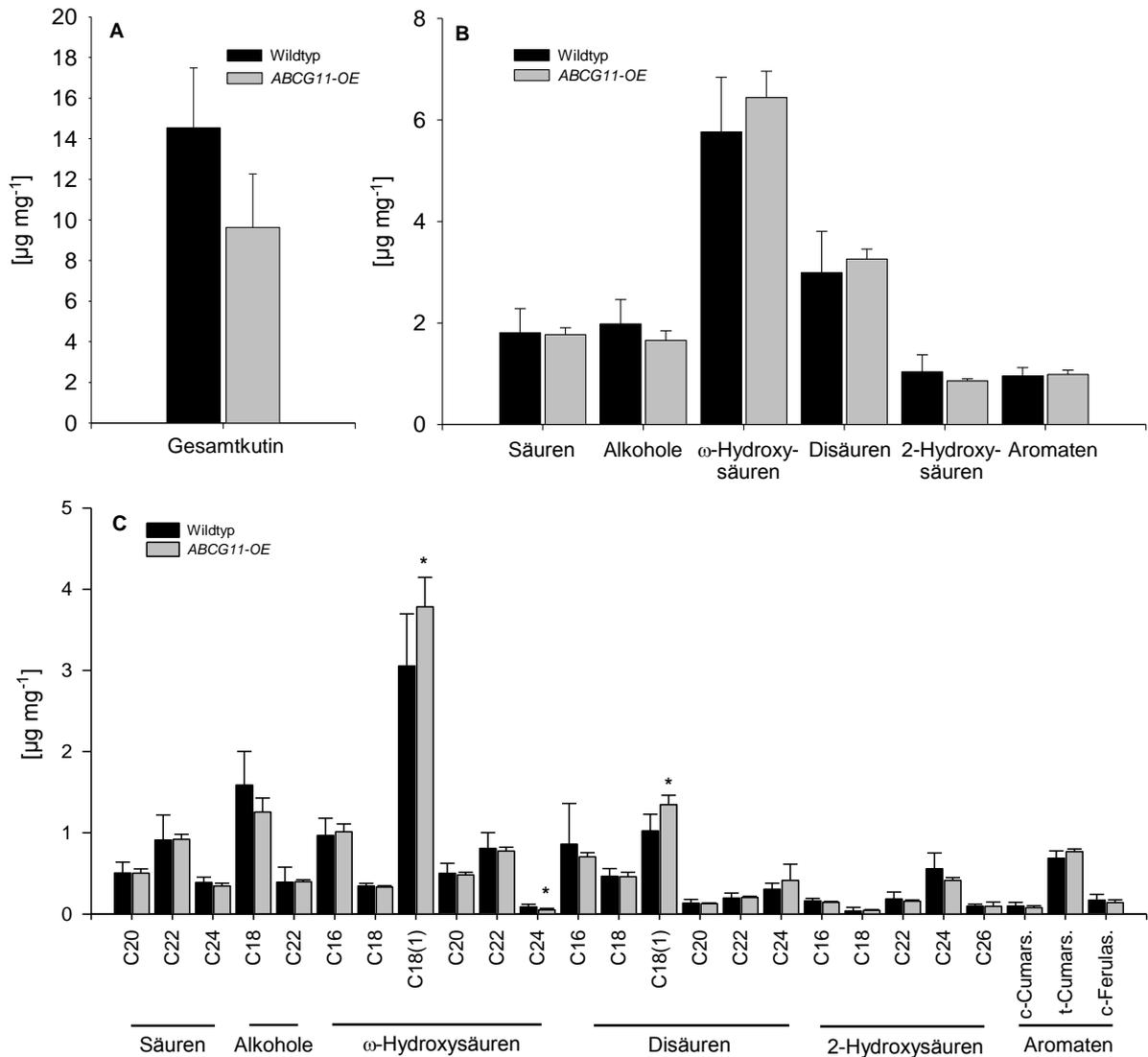
Aufgelistet sind die Mittelwerte (Mw) und die Standardabweichung (Stabw).

Monomer	Wildtyp [ $\mu\text{g mg}^{-1}$ ]	<i>abcg11</i> [ $\mu\text{g mg}^{-1}$ ]
	Mw $\pm$ Stabw	Mw $\pm$ Stabw
$\text{C}_{16}$ - $\omega$ -Hydroxysäure	$0,97 \pm 0,21$	$0,53 \pm 0,13^{**}$
$\text{C}_{18:1}$ - $\omega$ -Hydroxysäure	$3,05 \pm 0,64$	$1,73 \pm 0,41^*$
$\text{C}_{16}$ -Disäure	$0,86 \pm 0,50$	$0,37 \pm 0,11^*$
$\text{C}_{18}$ -Alkohol	$1,59 \pm 0,41$	$0,89 \pm 0,21^{**}$
$\text{C}_{20}$ -Säure	$0,51 \pm 0,13$	$0,27 \pm 0,08^{**}$
$\text{C}_{22}$ -Säure	$0,91 \pm 0,31$	$0,55 \pm 0,13^*$

\*: p-Wert 0,01-0,05, \*\*: p-Wert < 0,01

### 3.3.9 Analyse des Wurzelsuberins der ABCG11-OE-Linie

In der Überexpressionslinie *ABCG11-OE* sind sowohl in der Gesamtmenge als auch in der Stoffklassenverteilung des Wurzelsuberins (Abbildung 3-22A, B), keine Änderungen im Vergleich zum Wildtyp feststellbar. Die Darstellung der Einzelbestandteile (Abbildung 3-22C) zeigt signifikant höhere Mengen vereinzelter Suberinmonomere in der Mutante. Im Vergleich zum Wildtyp sind in der Überexpressionslinie die  $\text{C}_{18:1}$ - $\omega$ -Hydroxysäure (WT:  $3,05 \pm 0,64 \mu\text{g mg}^{-1}$ , MT:  $3,78 \pm 0,36 \mu\text{g mg}^{-1}$ ) und die  $\text{C}_{18:1}$ -Disäure (WT:  $1,02 \pm 0,21 \mu\text{g mg}^{-1}$ , MT:  $1,35 \pm 0,12 \mu\text{g mg}^{-1}$ ) signifikant erhöht, wogegen die  $\text{C}_{24}$ - $\omega$ -Hydroxysäure (WT:  $0,09 \pm 0,03 \mu\text{g mg}^{-1}$ , MT:  $0,05 \pm 0,02 \mu\text{g mg}^{-1}$ ) signifikant verringert vorliegt.



**Abbildung 3-22 Zusammensetzung des Wurzelsuberins der Überexpressionslinie ABCG11-OE und des korrespondierenden Wildtyps**

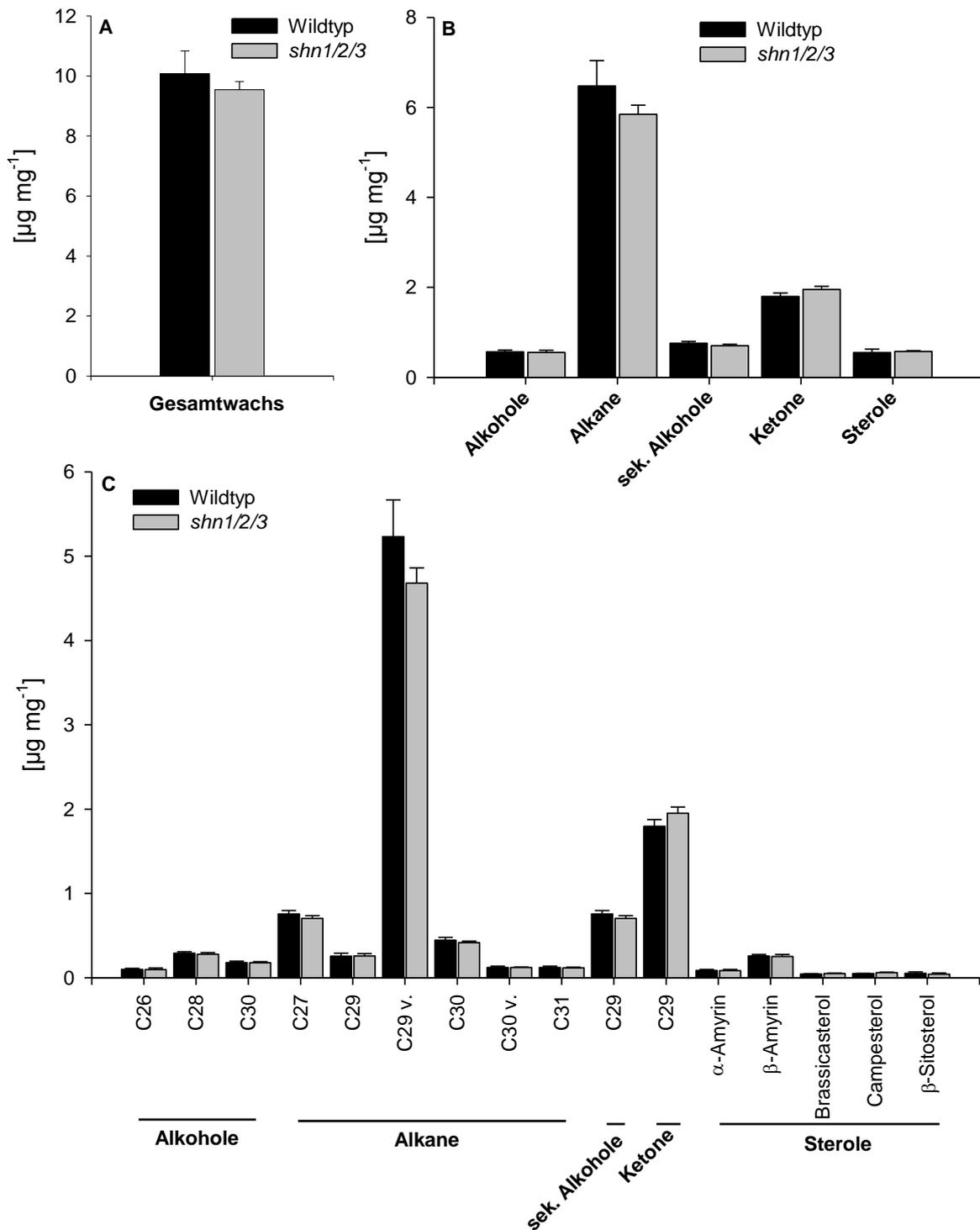
Darstellung der Suberinbestandteile geordnet nach (A) Gesamtgehalt, (B) Substanzklasse und (C) einzelnen Monomeren. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf Parallelen des Wildtyps, sowie drei Parallelen der Mutante, jeweils mit Standardabweichung. Es wurde ein zweiseitiger *Student's t*-Test auf Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante durchgeführt. \*: p-Werte zwischen 0,01 – 0,05, \*\*: p-Werte <0,01, c-/t-Cumars.: cis-/trans-Cumarsäure, c-Ferulas.: cis-Ferulasäure

### **3.4 Untersuchung der transgenen *shn1/2/3*-Linie**

Um den Einfluss der *SHINE*-Transkriptionsfaktoren auf die Lipidbiosynthese festzustellen wurden die Lipidzusammensetzungen ausgewählter Pflanzenorgane der Tripelknockdownlinie *shn1/2/3* in *A. thaliana* untersucht (Kapitel 1.3.4). Es wurden gaschromatographische Analysen der Wachse und des Kutins von Blüten und Blättern und des Wurzeluberins der *shn1/2/3*-Linie und des Wildtyps durchgeführt. Es folgt die graphische Darstellung der Lipidzusammensetzung des Blütenwachs (Kapitel 3.4.1), des Blütenkutins (Kapitel 3.4.2), des Blattwachs (Kapitel 3.4.3), des Blattkutins (Kapitel 3.4.4) und des Wurzeluberins (Kapitel 3.4.5). Die relativen Darstellungen der Wachs-, Kutin- und Suberinbestandteile können dem Anhang (Kapitel 7.4.2) entnommen werden.

#### **3.4.1 Analyse der Blütenwachse der *shn1/2/3*-Linie**

Die Blütenwachs zusammensetzung der *shn1/2/3*-Linie weist sowohl im Gesamtgehalt (Abbildung 3-23A, B, WT:  $10,40 \pm 0,80 \mu\text{g mg}^{-1}$ , MT:  $9,88 \pm 0,28 \mu\text{g mg}^{-1}$ ) als auch in den Substanzklassen keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp auf. Auch die Mengen der einzelnen Wachsbestandteile (Abbildung 3-23C) unterscheiden sich nicht signifikant zwischen Mutante und Wildtyp.



**Abbildung 3-23** Zusammensetzung des Blütenwachses der *shn1/2/3*-Linie und des korrespondierenden Wildtyps

Darstellung der Wachsbestandteile geordnet nach (A) Gesamtgehalt, (B) Substanzklassen und (C) der Einzelsubstanzen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus vier Parallelen mit Standardabweichung. Mittels zweiseitigem *Student's t-Test* wurde auf die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante geprüft. \*: p-Werte <0,01, sek.: sekundär, v.: verzweigt.

### 3.4.2 Analyse des Blütenkutins der *shn1/2/3*-Linie

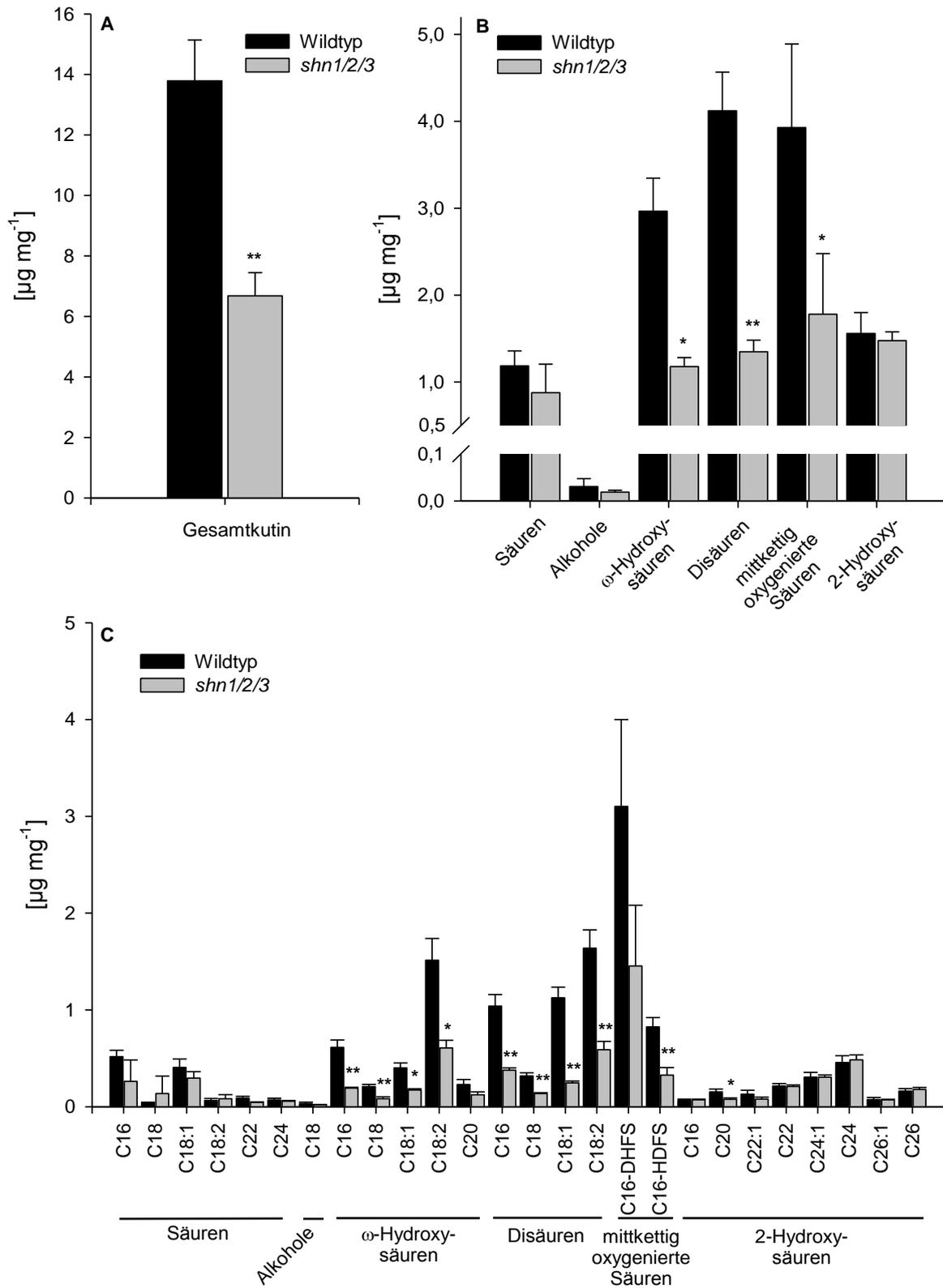
In der *shn1/2/3*-Linie ist der Gesamtgehalt (Abbildung 3-24A, WT:  $13,79 \pm 1,35 \mu\text{g mg}^{-1}$ , MT:  $6,68 \pm 0,77 \mu\text{g mg}^{-1}$ ) des Blütenkutins im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp signifikant um 51 % reduziert. Diese Reduktion resultiert aus der Verminderung der  $\omega$ -Hydroxysäuren (Abbildung 3-24A, WT:  $2,97 \pm 0,38 \mu\text{g mg}^{-1}$ , MT:  $1,18 \pm 0,10 \mu\text{g mg}^{-1}$ ), der Disäuren (WT:  $4,12 \pm 0,45 \mu\text{g mg}^{-1}$ , MT:  $1,35 \pm 0,13 \mu\text{g mg}^{-1}$ ) und der mittkettig oxygenierten Säuren (WT:  $3,93 \pm 0,96 \mu\text{g mg}^{-1}$ , MT:  $1,78 \pm 0,70 \mu\text{g mg}^{-1}$ ). Alle Monomere innerhalb dieser Substanzklassen (Abbildung 3-24C), mit Ausnahme der  $\text{C}_{20}$ - $\omega$ -Hydroxysäure und der  $\text{C}_{16}$ -DHFS, sind im Vergleich zum Wildtyp signifikant stark vermindert, die Werte können der folgenden Tabelle 3-3 entnommen werden. Die Bestandteile der Säuren, Alkohole und 2-Hydroxysäuren weisen, außer der  $\text{C}_{20}$ -2-Hydroxysäure, keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp auf.

**Tabelle 3-3 Signifikant verschiedene Kutinmengen**

Aufgelistet sind die Mittelwerte (Mw) und die Standardabweichung (Stabw) der Disäuren,  $\omega$ -Hydroxysäuren und mittkettig oxygenierten Säuren.

Monomer	Wildtyp [ $\mu\text{g mg}^{-1}$ ]	<i>shn1/2/3</i> [ $\mu\text{g mg}^{-1}$ ]
	Mw $\pm$ Stabw	Mw $\pm$ Stabw
$\text{C}_{16}$ -Disäure	$1,039 \pm 0,12$	$0,38 \pm 0,02^*$
$\text{C}_{18}$ -Disäure	$0,32 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,01^*$
$\text{C}_{18:1}$ -Disäure	$1,12 \pm 0,11$	$0,25 \pm 0,02^*$
$\text{C}_{18:2}$ -Disäure	$1,64 \pm 0,19$	$0,59 \pm 0,09^*$
$\text{C}_{16}$ - $\omega$ -Hydroxysäure	$0,61 \pm 0,08$	$0,19 \pm 0,01^*$
$\text{C}_{16}$ - $\omega$ -Hydroxysäure	$0,21 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,02^*$
$\text{C}_{18:1}$ - $\omega$ -Hydroxysäure	$0,40 \pm 0,05$	$0,17 \pm 0,01^*$
$\text{C}_{18:2}$ - $\omega$ -Hydroxysäure	$1,51 \pm 0,22$	$0,61 \pm 0,08^*$
$\text{C}_{20}$ - $\omega$ -Hydroxysäure	$0,23 \pm 0,05$	$0,12 \pm 0,03$
$\text{C}_{16}$ -HDFS	$0,83 \pm 0,10$	$0,33 \pm 0,08^*$
$\text{C}_{16}$ -DHFS	$3,10 \pm 0,90$	$1,45 \pm 0,63$

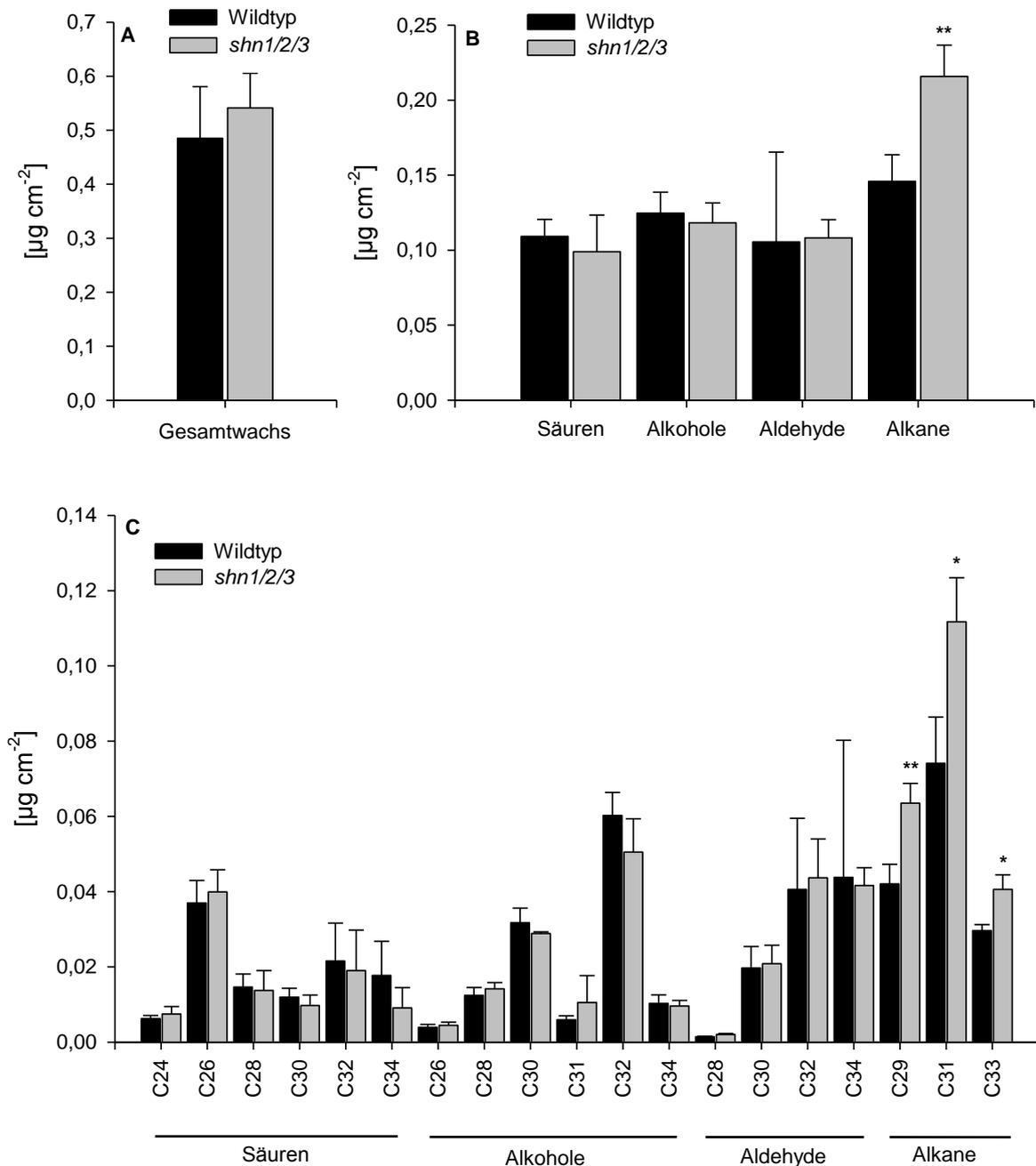
\*: p-Wert <0,05



**Abbildung 3-24** Zusammensetzung des Blütenkutins der *shn1/2/3*-Linie und des korrespondierenden Wildtyps

Darstellung der Kutinbestandteile geordnet nach (A) Gesamtgehalt, (B) Substanzklassen und (C) den Einzelsubstanzen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus drei Parallelen mit Standardabweichung. Mittels zweiseitigem *Student's t*-Test mit ungleicher Varianz wurde auf statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante geprüft. \*: p-Werte kleiner 0,05, DHFS: Dihydroxyfettsäure, HDFS: Hydroxydifettsäure

### 3.4.3 Analyse der Blattwache der *shn1/2/3*-Linie



**Abbildung 3-25 Zusammensetzung des Blattwaxes *shn1/2/3*-Linie und des korrespondierenden Wildtyps**

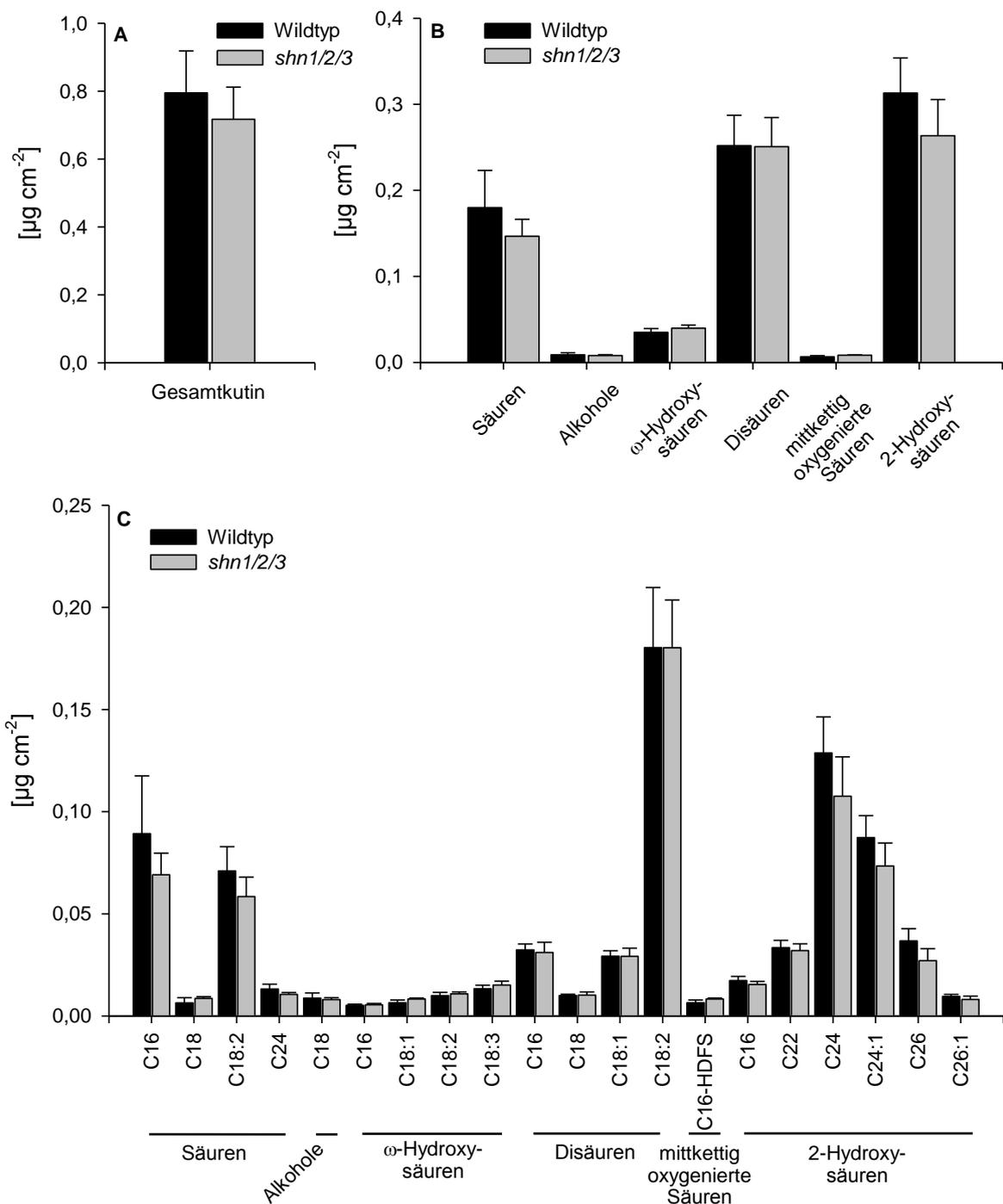
Darstellung der Wachsbestandteile geordnet nach (A) Gesamtgehalt, (B) Substanzklassen und (C) Einzelbestandteile. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus drei Parallelen mit Standardabweichung. Mittels zweiseitigem *Student's t*-Test wurde auf statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante geprüft. \*: p-Werte 0,01-0,05, \*\*: p-Werte <0,01.

In der Knockdownlinie *shn1/2/3* unterscheidet sich der Gesamtgehalt des Blattwaxes (Abbildung 3-25A, WT:  $0,49 \pm 0,10 \mu\text{g mg}^{-1}$ , MT:  $0,54 \pm 0,06 \mu\text{g mg}^{-1}$ ) nicht signifikant zum Wildtyp. In der Mutante sind die Alkane (Abbildung 3-25B, WT:  $0,15 \pm 0,02 \mu\text{g mg}^{-1}$ , MT:  $0,22 \pm 0,02 \mu\text{g mg}^{-1}$ ) im Vergleich zum Wildtyp signifikant um 50 % erhöht.

Innerhalb der Alkane (Abbildung 3-25C) sind alle Bestandteile der Mutante im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht. Das Nonacosan (WT:  $0,04 \pm 0,01 \mu\text{g mg}^{-1}$ , MT:  $0,06 \pm 0,01 \mu\text{g mg}^{-1}$ ) sowie das Hentriacontan ( $\text{C}_{31}$ -Alkan) (WT:  $0,07 \pm 0,01 \mu\text{g mg}^{-1}$ , MT:  $0,11 \pm 0,01 \mu\text{g mg}^{-1}$ ) sind um 50 % erhöht und das Tritriacontan ( $\text{C}_{33}$ -Alkan) (WT:  $0,03 \pm <0,01 \mu\text{g mg}^{-1}$ , MT:  $0,04 \pm <0,01 \mu\text{g mg}^{-1}$ ) um 37 %.

#### **3.4.4 Analyse des Blattkutins der *shn1/2/3*-Linie**

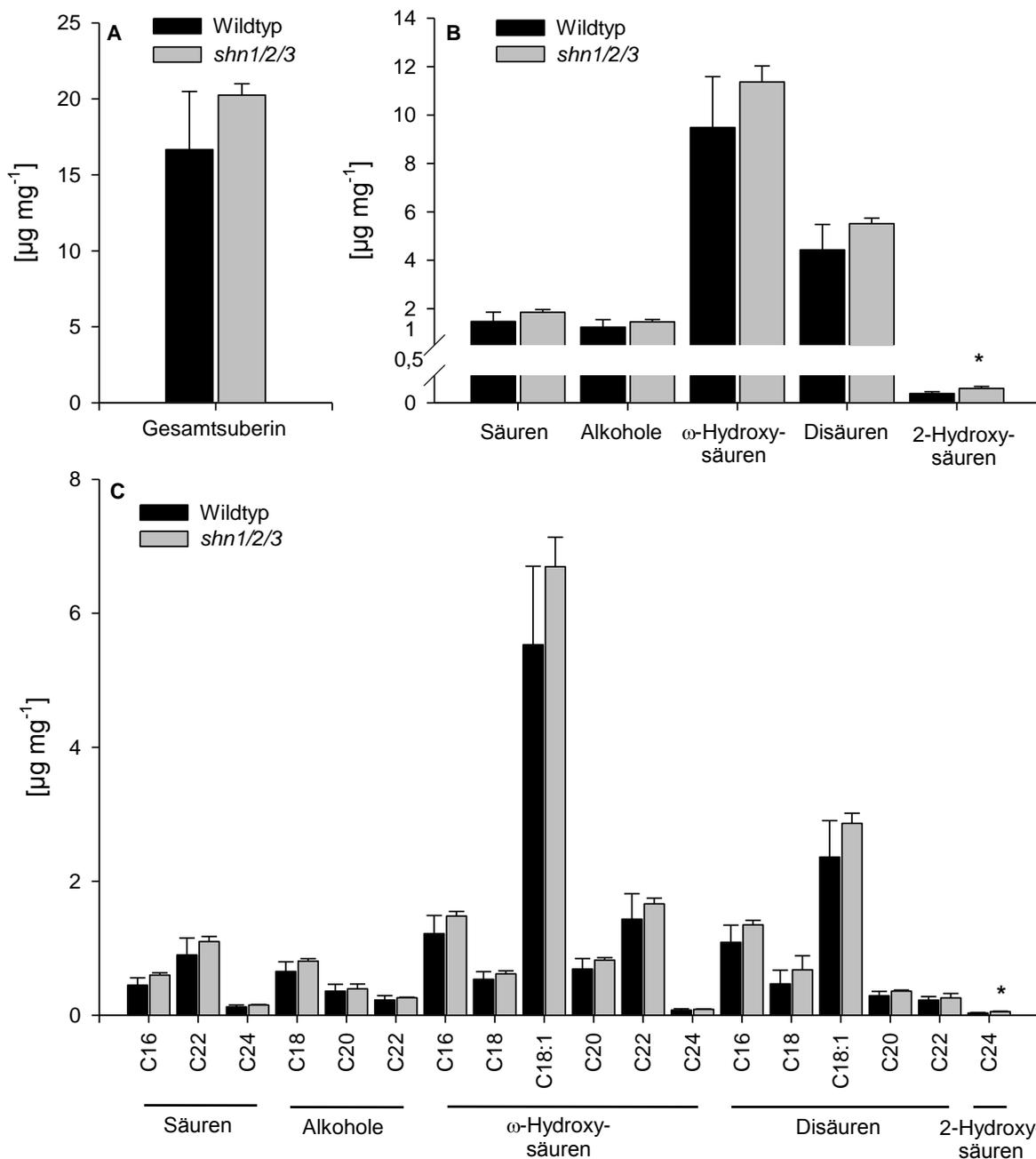
In der *shn1/2/3*-Linie ist kein signifikanter Unterschied des Blattkutins im Gesamtgehalt (Abbildung 3-26A, WT:  $0,79 \pm 0,12 \mu\text{g mg}^{-1}$ , MT:  $0,72 \pm 0,09 \mu\text{g mg}^{-1}$ ) und den Substanzklassen (Abbildung 3-26B) verglichen mit dem Wildtyp feststellbar. Auch die Betrachtung der Einzelbestandteile (Abbildung 3-26C) zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp auf.



**Abbildung 3-26 Zusammensetzung des Blattcutins der *shn1/2/3*-Linie und des korrespondierenden Wildtyps**

Darstellung der Cutinbestandteile geordnet nach (A) Gesamtgehalt, (B) Substanzklassen und (C) Einzelbestandteile. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus drei Parallelen mit Standardabweichung. Mittels zweiseitigem *Student's t*-Test mit ungleicher Varianz wurde auf statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante geprüft. p-Werte \*:<0,05, DHFS: Dihydroxyfettsäure, HDFS: Hydroxydifettsäure.

### 3.4.5 Analyse des Wurzelsuberins der *shn1/2/3*-Linie



**Abbildung 3-27** Zusammensetzung des Wurzelsuberins der *shn1/2/3*-Linie und des korrespondierenden Wildtyps

Darstellung der Suberinbestandteile geordnet nach (A) Gesamtgehalt, (B) Substanzklassen und (C) der Einzelbestandteile. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus vier Parallelen mit Standardabweichung. Mittels zweiseitigem *Student's t*-Test mit ungleicher Varianz wurde auf statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante geprüft. \*:  $p$ -Wert  $< 0,01$

In der *shn1/2/3*-Linie ist kein signifikanter Unterschied des Wurzelsuberins im Gesamtgehalt (Abbildung 3-27A, WT:  $17,16 \pm 3,95 \mu\text{g mg}^{-1}$ , MT:  $20,78 \pm 0,75 \mu\text{g mg}^{-1}$ ) und den Substanzklassen (Abbildung 3-27B) im Vergleich zum Wildtyp feststellbar. Die

Betrachtung der Einzelbestandteile (Abbildung 3-27C) zeigt in der Mutante eine geringfügige signifikante Erhöhung der C<sub>24</sub>-2-Hydroxysäure (WT: 0,03 ± 0,01 µg mg<sup>-1</sup>, MT: 0,05 ± 0,01 µg mg<sup>-1</sup>) im Vergleich zum Wildtyp.

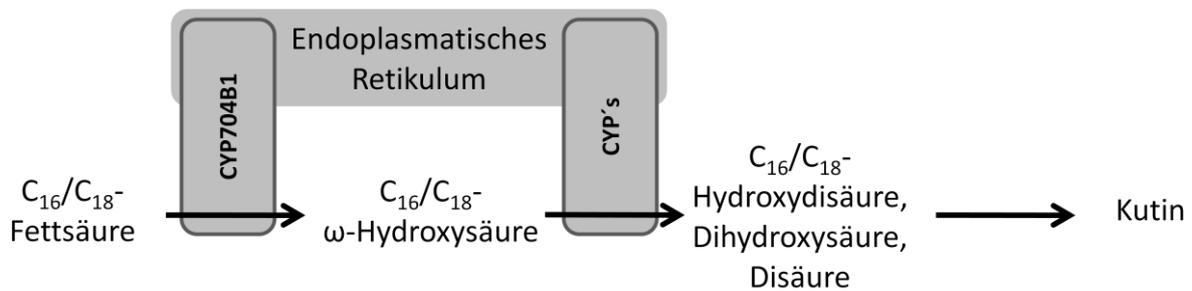
## **4 Diskussion**

## 4.1 Beteiligung des Gens BnCYP704B1 an der Entwicklung der Antherenkutikula

Die Wachs- und Kutinzusammensetzung der *B. napus* Antherenkutikula wurde bisher nicht publiziert. *B. napus* gehört ebenso wie *A. thaliana* den *Brassicaceae* an und beide weisen den gemeinsamen Unterschied auf, dass Disäuren als prominente Bestandteile im Blattkutin vorkommen, welche eher als typische Suberinbestandteile betrachtet werden (Kapitel 1.2). Auch das Antherenkutin von Raps weist, ähnlich wie das Blütenkutin von *A. thaliana*, eine eher typische Kutinzusammensetzung auf, indem mittkettig oxygenierte Fettsäuren die Hauptbestandteile bilden (Tabelle 1-1; Li und Beisson 2009). Die in dieser Studie untersuchte Rapsmutante *Bncyp704b1* (Kapitel 3.1) weist im Vergleich zum Wildtyp Änderungen der kutikulären Lipid-Komposition im Antherenwachs und -kutin auf.

Die Gesamtwachsmenge der *Bncyp704b1*-Antheren ist geringer, wobei die Reduktion hauptsächlich aus der starken Verminderung des verzweigten Nonacosans resultiert. Wie in der Einleitung erwähnt, wird für das Enzym BnCYP704B1, aufgrund der hohen Sequenzhomologie zu AtCYP704B1 und OsCYP704B2, eine  $\omega$ -Hydroxylasefunktion angenommen. Eine Veränderung der Wachskomposition ist aber nicht im Kontext einer  $\omega$ -Hydroxylasemutante erwartet. Möglicherweise liegt hier ein indirekter Effekt vor, bei dem die veränderte Kutinzusammensetzung oder -biosynthese die Wachsbiosynthese beeinflusst.

Der Gesamtgehalt des Kutins ist in der Mutante signifikant geringer als im Wildtyp. Dazu tragen hauptsächlich die Verminderungen der Säuren,  $\omega$ -Hydroxysäuren, Disäuren und mittkettig oxygenierten Säuren bei. Die Reduktion der C<sub>16</sub>- und C<sub>18</sub>- $\omega$ -Hydroxysäuren, die im Antherenkutin der *Bncyp704b1*-Linie vorgefunden wurde, passen zum Knockdown eines  $\omega$ -Hydroxylasegens. Die C<sub>16</sub>-Disäure, C<sub>16</sub>-DHFS und C<sub>16</sub>-HDFS sind stoffwechselphysiologisch betrachtet die Folgeprodukte der C<sub>16</sub>- $\omega$ -Hydroxysäure (Abbildung 1-7). Eine spezifische Reduktion der C<sub>16</sub>-Disäure, der C<sub>16</sub>-DHFS und der C<sub>16</sub>-HDFS könnte somit aus der verminderten Synthese der C<sub>16</sub>- $\omega$ -Hydroxysäure resultieren (Abbildung 4-1). Die Antherenkutinzusammensetzung der *Bncyp704b1*-Linie stimmt insoweit mit der Erwartung an einen  $\omega$ -Hydroxylasegenknockdown, spezifisch für C<sub>16</sub>- und C<sub>18</sub>-Körper, überein.



**Abbildung 4-1 Rolle der BnCYP704B1 ω Hydroxylase in der Kutinbiosynthese**

Die veränderte Kutinzusammensetzung deutet darauf hin, dass BnCYP704B1 im Lipid-Stoffwechsel eine Rolle vor oder in der Synthese der C<sub>16</sub>-ω-Hydroxysäure spielt. Findet an dieser Stelle ein Knockdown statt werden die C<sub>16</sub>-ω-Hydroxysäure und die Folgeprodukte in ihrer Menge reduziert.

In der Kutinzusammensetzung der *Bncyp704b1*-Linie sind auch Bestandteile weiterer Substanzklassen von Änderungen betroffen. Während die Bestandteile der ω-Hydroxysäuren, Disäuren und mittkettig oxygenierten Säuren alle verringert sind, liegen die Bestandteile der Säuren, Alkohole und 2-Hydroxysäuren zum Teil erhöht und zum Teil vermindert vor (Abbildung 3-2). Ein Muster bezüglich der Änderungen oder ein funktionaler Zusammenhang mit dem Knockdown einer ω-Hydroxylase ist nicht erkennbar. Wie auch bei der veränderten Wachszusammensetzung liegt hier möglicherweise ein indirekter Effekt vor. Ähnliches wurde bei dem Knockdown des Gens *OsCYP704B2* beobachtet, nach dem alle Monomere des Antherenkutins drastisch reduziert vorliegen, was ebenfalls als indirekter Effekt interpretiert wurde (Li et al. 2010).

Wie in der Einleitung beschrieben konnte dem Gen *BnCYP704B1* die Beteiligung an der Pollenwandbildung nachgewiesen werden (Kapitel 1.3.1; Yi et al. 2010). Unterstützt wird die Hypothese durch Expressionsstudien des Gens. Diese ergaben, dass die Expression räumlich und zeitlich maximal in den Tapetumzellen im Tetrastadium der Pollenentwicklung ist. Das Tapetum ist ein hochsekretorisches Gewebe welches in engem Kontakt zu den Pollen steht. Im Tetrastadium beginnt die Synthese der Vorläufermoleküle des Exins in den Tapetumzellen, dem Sporopollenin, die zum Pollen transferiert werden (Ariizumi und Toriyama 2011). Ein vesikulärer Transport, ausgehend von den Tapetumzellen zu den Mikrosporen, konnte durch Yi et al. (2010) nachgewiesen werden. Die Vesikel könnten Pollenwandvorstufen enthalten, welche auch als *Ubisch bodies* bezeichnet werden (Ariizumi und Toriyama 2011). Ein Vesikeltransport zur Antherenepidermis wurde nicht beobachtet. Möglicherweise werden Kutinvorstufen oder das Protein per se anders zur Epidermis transferiert. Der

Genknockout der antherenspezifisch exprimierten *OsCYP704B2*  $\omega$ -Hydroxylase in Reis führte zu Pollenwanddefekten und Defiziten der Kutinbestandteile, insbesondere der  $\omega$ -Hydroxysäuren (Li et al. 2010). Aufgrund dessen erstellte Li ein Modell in dem das Protein *OsCYP704B2* in der Lipid-Biosynthese einen Pool von  $C_{16}$ -/ $C_{18}$ - $\omega$ -Hydroxysäuren bereitstellt. Diese Bausteine können nach entsprechender Modifikation zur Bildung des Kutins oder des Sporopollenin-/Exingerüsts genutzt werden. Auch für das Gen *BnCYP704B1* konnte eine Beteiligung an der Kutikula- und Pollenwandbildung nachgewiesen werden. Die Ähnlichkeit der phänotypischen Auswirkungen zwischen den beiden Mutanten führt zu der Hypothese, dass dem Gen *BnCYP704B1* in *B. napus* eine ähnliche Rolle in der Kutikula- und Pollenwandentwicklung zugesprochen werden kann, wie dem Gen *OsCYP704B2* in *O. sativa*.

Die Funktion des Proteins *BnCYP704B1* wurde aufgrund der hohen Sequenzhomologie zu den Proteinen *OsCYP704B2* und *AtCYP704B1*, deren Enzymfunktionen in vitro nachgewiesen wurde, ebenfalls als  $\omega$ -Hydroxylase eingestuft (Dobritsa et al. 2009, Li et al. 2010). Die putative  $\omega$ -Hydroxylasefunktion wird auch durch die Resultate dieser Studie unterstützt. Wie in der Einleitung erwähnt, beinhaltet die  $\omega$ -Hydroxysäuresynthese auch die Aktivität weiterer Enzyme (Kapitel 1.2, Abbildung 1-6), deren Beeinträchtigung ebenfalls zur verminderten Synthese von  $\omega$ -Hydroxysäuren und Folgeprodukte führen würde. Eine biochemische Studie zur Enzymfunktion könnte weiteren Aufschluss zur Rolle des Proteins in der Kutinbiosynthese geben.

## 4.2 Beteiligung des Gens SIDCR an der Bildung der Tomatenfruchtkutikula

Die Tomatenfruchtkutikeln des Wildtyps entsprechen in Aussehen, Morphologie und chemischer Zusammensetzung bereits veröffentlichten Daten der Wildtyplinie M82 (Isaacson et al. 2009; Yeats et al. 2011). Die Tomatenfruchtkutikeln der drei *Sldcr*-Linien weisen im Vergleich zum Wildtyp enorme Änderungen in ihrer Morphologie auf. Die *Sldcr*-Kutikeln sind braun gefärbt, dicker und zeigen höhere Transpirationsraten auf (Kapitel 3.2.1 ff.). Die chemische Komposition der kutikulären Lipide ist in den *Sldcr*-Linien, sowohl in den Wachsen als auch im Kutinpolyester, im Vergleich zum Wildtyp drastisch verändert (Kapitel 3.2.5 f.). In den folgenden Abschnitten werden mögliche Ursachen für die phänotypischen Auswirkungen in den Mutantenlinien diskutiert.

Die Transportstudie (Kapitel 3.2.4) ergab für die Linien *Sldcr13* und *Sldcr16* mit etwa doppelt so hohen Leitwerten im Vergleich zum Wildtyp einen signifikanten Unterschied, wogegen sich die *Sldcr11*-Linie nicht signifikant vom Wildtyp unterscheidet. Bedenkt man die phänotypischen Veränderungen der Kutikula, erscheint die Erhöhung des Leitwerts um den Faktor 2 sehr niedrig. Die geringe Abweichung der Transpiration in der Mutante kann verschiedene Ursachen haben. In den *Sldcr*-Kutikeln ist ein bis zu viereinhalbmal erhöhtes Massenflächen-Verhältnis (Abbildung 3-9) und eine erhöhte Kutikuladicke (Abbildung 3-5) festgestellt worden. Des Weiteren ist die Wachsmenge erhöht und die Kutinkomposition verändert (Kapitel 3.2.5 f.). Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Kombination dieser Modifikationen zum Erhalt der physiologischen Stabilität der Tomatenfrucht dient und zu der relativ geringen Transpirationserhöhung in den *Sldcr*-Kutikeln führt.

Das vermehrte Auftreten kristalliner Wachsablagerungen auf der physiologischen Außenseite der *Sldcr*-Kutikeln (Abbildung 3-6) könnte auf die erhöhten Wachsgehalte zurückzuführen sein. Möglicherweise ist auch die veränderte Wachskomposition für die Bildung der Kristalle ausschlaggebend, denn im Wildtyp stellen die Alkane die Hauptwachsbestandteile dar, wogegen in den *Sldcr*-Linien neben den Alkanen die Säuren und Ferulasäureester prominent auftreten. Das hohe Aufkommen von Ferulasäureestern ist in mehrfacher Hinsicht interessant. Einerseits erklärt es die intensive Braunfärbung und Epifluoreszenz, welche in beiden Fällen auf eine Einlagerung von Aromaten hindeutet, andererseits sind Ferulasäureester keine

regulären Komponenten des Tomatenfruchtwachses. Ferulasäureester treten beispielsweise in hohen Mengen in Suberin assoziierten Wachsen der Kartoffelperiderme auf (Serra et al. 2010). Sie sind als Suberin assoziierte Wachse auch in Wurzeln und in Wundperidermen höherer Pflanzen vertreten (Kolattukudy 2001; Schreiber et al. 2005). Die mögliche Rolle der veränderten Wachszusammensetzung der *Sldcr*-Tomatenfruchtkutikula wird später erörtert.

Das Kutin der *Sldcr*-Linien unterscheidet sich im Gesamtgehalt nicht signifikant vom Wildtyp. Jedoch ist die Komposition maßgeblich verändert. Das Hauptmonomer C<sub>16</sub>-DHFS, welches 75 % im Wildtyp ausmacht, ist auf 3 bis 6 % reduziert. Dagegen sind die C<sub>16</sub>- $\omega$ -Hydroxysäure und C<sub>16</sub>-Disäure im Vergleich zum Wildtyp stark angestiegen. Dieser Effekt ist vermutlich auf eine verminderte C<sub>16</sub>-DHFS-Synthese zurückzuführen, wodurch eine Akkumulation der Vorstufe, der C<sub>16</sub>- $\omega$ -Hydroxysäure, und Umleitung zu einem alternativen Oxidationsprodukt, der C<sub>16</sub>-Disäure, führt. Diese Änderungen ähneln denen des Blütenkutins der *Atdcr*-Linie (Panikashvili et al. 2009). Dort wurden ebenfalls die starke Reduktion der C<sub>16</sub>-DHFS und die Erhöhung der C<sub>16</sub>- $\omega$ -Hydroxysäure und C<sub>16</sub>-Disäure festgestellt. Allerdings war der Gesamtgehalt des Blütenkutins bei *Atdcr* stark reduziert, was bei den *Sldcr*-Linien nicht der Fall ist.

Basierend auf der veränderten Kutin-Komposition der *Atdcr*-Linie wurde die Beteiligung des Gens an der Inkorporation der C<sub>16</sub>-DHFS in das Blütenkutin belegt (Panikashvili et al. 2009). Die hier beschriebenen Effekte des *Sldcr*-Knockdowns auf die Kutinkomposition bestätigen diesen Befund auch für das Ortholog der *AtDCR* in der Tomate. Um Aufschluss über die Funktion des Proteins SIDCR im Lipid-Stoffwechselweg zu erhalten müssen zunächst folgende Punkte festgehalten werden.

Die bisher charakterisierten Enzyme der BAHD-Familie nutzen CoA-aktivierte Säuregruppen zur Veresterung mit Hydroxylgruppen (Kapitel 1.2.3). Rani et al. (2010) demonstrierte in vitro mit isolierter *AtDCR* die Funktionalität des Enzyms als Acyltransferase mit aktivierten Fettsäurederivaten in Form von Acyl-CoA's und Glycerinderivaten. Eine hohe Substrat-Spezifität wurde bei Oleoyl-CoA (C<sub>18</sub>-(9)-ensäure) und 1,2-Diacylglycerin auf die *sn*-3 (*stereospecific number*-3) Position zur Bildung von Triacylglycerin festgestellt. Des Weiteren führte Rani ein Assay mit überexprimiertem *AtDCR*-Gen in Hefen durch, wobei C<sub>16</sub>- $\omega$ -Hydroxysäure als Substrat angeboten wurde. In den Hefen gebildete Acylglycerine enthielten als Baustein die C<sub>16</sub>- $\omega$ -Hydroxysäure.

Anhand dieser Indizien lassen sich mit Vorbehalt verschiedene Modelle zur Funktion und Einordnung des Proteins SIDCR in der Lipidbiosynthese erschließen. Vorstellbar wäre, dass die C<sub>16</sub>- $\omega$ -Hydroxysäure als CoA aktivierte Vorstufe durch SIDCR (Abbildung 1-6) mit Glycerin oder dessen Derivat (Acylglycerine) verestert wird und folgend eine Mittketten-Oxygenierung des Aliphats zur C<sub>16</sub>-DHFS stattfindet. Alternativ könnte C<sub>16</sub>- $\omega$ -Hydroxysäure (frei oder als CoA) erst mittkettig oxygeniert werden und folgend durch SIDCR als C<sub>16</sub>-DHFS-CoA an Glycerin oder dessen Derivat verestert werden. Beide Möglichkeiten würden die mengenmäßige Verringerung der C<sub>16</sub>-DHFS erklären. Die Fähigkeit des Enzyms die C<sub>16</sub>- $\omega$ -Hydroxysäure auf Glycerinderivate zu transferieren spricht für die erste Möglichkeit. Bei diesen Beobachtungen muss bedacht werden, dass es sich bei den Enzymatikstudien um die AtDCR handelte und der SIDCR, trotz hoher Aminosäuresequenzhomologie zur AtDCR, eine andere Funktion zugrunde liegen könnte.

Es konnte gezeigt werden, dass der Knockdown des *SIDCR*-Gens zum Fehlen der C<sub>16</sub>-DHFS in der Kutinmatrix führt. Anzunehmen ist, dass die Synthese des Monomers oder des Bausteins (Acylglycerinderivate) betroffen ist. Als Resultat entsteht eine Kutinmatrix die hauptsächlich aus  $\omega$ -Hydroxysäuren und Disäuren der Kettenlänge C<sub>16</sub> besteht. Die Frage warum nicht lediglich ein Monomer in der Kutinmatrix fehlt, sondern viele andere Monomere sich in ihrem Gehalt verändert haben bleibt noch offen. Auch hierbei können verschiedene Szenarien die Ursachen und Auswirkungen erklären. Es kann sein, dass die gestörte Synthese von C<sub>16</sub>-DHFS zu einer Umleitung der Monomersynthese in andere Stoffwechselwege führt. Dies würde in die nächsten Zweige der C<sub>16</sub>-DHFS-Synthese führen (Abbildung 1-7), d.h. die Akkumulation von C<sub>16</sub>- $\omega$ -Hydroxysäure und Umleitung zu C<sub>16</sub>-Disäure, was auch beobachtet wurde (Abbildung 3-12 f.). Jedoch sind in den betreffenden Substanzklassen auch die einfach ungesättigten C<sub>18</sub>-Bestandteile stark erhöht was nicht durch eine Umleitung des C<sub>16</sub>-DHFS-Synthesewegs erklärt werden kann. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das fehlende Hauptmonomer durch andere Kutinbestandteile kompensiert wird. Dafür könnten Monomere ähnlicher Struktur, mit zwei endständigen funktionellen Gruppen, in Frage kommen. Darunter fallen die Disäuren,  $\omega$ -Hydroxysäuren und die Aromaten, welche aufsummiert in annähernd gleichgroßer Menge wie das Hauptmonomer vorhanden sind. Auch dies würde das enorme Auftreten verschiedener Monomere der bifunktionalen Substanzklassen erklären. Jedoch sind auch die Wachse in der Menge und

Komposition stark verändert. Eine gegenseitige Beeinflussung der Wachs- und Kutinbiosynthese kann nicht ausgeschlossen werden und wurde auch bei anderen Mutanten beobachtet (Nawrath 2002). Möglicherweise sind die Defekte der Kutikula so dramatisch, dass die Stoffwechsel-Maschinerie zur Wundperidermbildung während der Kutikulabildung tätig ist. Dies würde das Auftreten der typischen Suberinmonomere, wie Ferulasäuren, Disäuren und  $\omega$ -Hydroxysäuren, in hohen Mengen in der Kutinmatrix und das verstärkte Erscheinen der Ferulasäureester im Wachs erklären. Für diese Erklärung sprechen verschiedene Indizien. Dean und Kolattukudy (1976) verletzte Tomatenfrüchte (*S. lycopersicum*) und analysierte die aliphatische Zusammensetzung der gebildeten Wundperiderme. Sowohl Disäuren als auch  $\omega$ -Hydroxysäuren mit Kettenlängen von C<sub>16</sub> und einfach ungesättigten C<sub>18</sub> bildeten die Hauptbestandteile des Wundperiderms, ähnlich wie bei den Fruchtschalen der *Sldcr*-Linien. Des Weiteren wurden mehrere Zelllagen bei den *Sldcr*-Kutikeln beobachtet (Kapitel 3.2.2 f.) die aromatische Einlagerungen enthalten. Bei der Wundperidermbildung der Kartoffel konnte ebenfalls die Bildung mehrzelllagiger suberinisierter Gewebe zum Wundverschluss beobachtet werden (Abbildung 1-2). Schreiber et al. (2005) konnte außerdem nachweisen, dass das Wundperiderm in der Kartoffel eine ebenso effektive Barriere gegen die Transpiration darstellt wie das Kartoffelperiderm, was bei der *Sldcr*-Kutikula ebenfalls beobachtet wurde (Kapitel 3.2.4). Diese Indizien und die unerwartete Änderung der Wachskomposition, welche in keinem offensichtlichen Kontext zur putativen Funktion der SIDCR stehen, sprechen für die Wundperidermbildung als Erklärung für den chemischen und morphologischen Phänotyp der *Sldcr*-Linie. Womit, wie oben erwähnt, die physiologische Stabilität der Tomatenfrucht gewährleistet bleibt. Wie bereits erwähnt, wurde die Funktion des Enzyms SIDCR aufgrund der Sequenzhomologie zur AtDCR als BAHD-Acyltransferase angenommen. Um die Hypothese zu untermauern bzw. weiteren Aufschluss über die Rolle des *SIDCR*-Gens in der Kutikulaentwicklung zu erhalten sind fortführende Untersuchungen notwendig. Die Überprüfung der SIDCR-Enzymfunktion und der spezifischen Substrate würde die Einordnung des Enzyms in die Lipidsynthese ermöglichen und die Vergleichbarkeit mit *A. thaliana* steigern. Außerdem könnte ein schwächerer Genknockdown zu einem milderem chemischen Phänotyp führen und sekundäre Effekte auf die Wachsbildung, etc. verringern, sodass eine konkretere Ergebnisinterpretation ermöglicht wird.

### 4.3 Beteiligung des Gens ABCG11 an der Kutikula- und Suberinbildung

Die Zusammensetzungen der Sprossachsenwachse, des Kutins der Sprossachse, Blatt und Blüte, sowie des Wurzelsuberins der Wildtypen (Kapitel 3.3.1 ff.) entsprechen in Menge und Zusammensetzung der Hauptkomponenten bereits publizierten Analysen der jeweiligen Gewebe (Franke et al. 2005; Li et al. 2007; Li-Beisson et al. 2009b; Luo et al. 2007; Panikashvili et al. 2007). Geringfügige Abweichungen können durch unterschiedliche Anzuchtbedingungen und durch verschiedene Entwicklungsstadien der Pflanzen bei Probenahme resultieren. In allen Analysen wiesen die Mutantenlinien des *ABCG11*-Gens Unterschiede zum Wildtyp auf. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird zunächst auf den chemischen Wachstyp und folgend, den der Polymere eingegangen.

Die Gesamtmenge und Zusammensetzung des Sprossachsenwachses der Knock-downlinie *abcg11* ist im Vergleich zum Wildtyp stark verändert. Nicht alle Wachsbestandteile sind gleichermaßen von der Reduktion betroffen. Diese Beobachtung bleibt auch in der relativen Verteilung (Abbildung 7-5) erhalten. Von der Reduktion der Wachsbestandteile sind nahezu alle Substanzklassen betroffen, besonders jedoch die Alkane und darin speziell das Nonacosan. Die Beobachtungen lassen den Rückschluss zu, dass die Defizite aus der fehlenden Beteiligung des Transporters an der Wachsschichtbildung resultieren und Nonacosan ein Substrat des ABCG11-Transporters darstellt. Es ist nicht auszuschließen, dass dem Nonacosandefizit eine verringerte Monomersynthese zugrunde liegt. Das Nonacosan stammt aus dem Decarboxylierungs-Stoffwechselweg, in dem elongierte Fettsäure-CoAs durch eine Aldehyd-formende Fettsäureacyl-CoA-Reduktase zunächst zu Aldehyden und anschließend durch eine Aldehyd-Decarboxylase zu Alkanen umgewandelt werden (Cheesbrough und Kolattukudy 1984; Goodwin et al. 2005; Kunst und Samuels 2009; Vioque und Kolattukudy 1997). Die Alkane können durch eine Mittketten-Alkan-Hydroxylase (MAH1: *mid-chain alkane hydroxylase1*, CYP96A15) zu sekundären Alkoholen und weiterführend zu Ketonen umgewandelt werden. Daher würde man bei einer verringerten Nonacosansynthese auch die mengenmäßige Reduktion der Folgeprodukte, also des sekundären Nonacosanols und des Nonacosanons, erwarten. Das ist hier nicht der Fall und spricht gegen die Annahme einer verringerten

Nonacosansynthese als ausschließliche Ursache für die verminderte Wachsmenge. Die Tatsache, dass bestimmte Substanzklassen und speziell vereinzelte Monomere, insbesondere das Nonacosan (C<sub>29</sub>-Alkan), reduziert sind lässt darauf schließen, dass ABCG11-Transporter nicht am Export aller Monomere beteiligt sind.

Es ist bekannt, dass ABCG11 nicht nur als Homodimer, sondern auch als Heterodimer mit einem anderen half-size-Transporter, dem ABCG12, fusionieren kann (Bird 2008; McFarlane et al. 2010). Knockoutlinien des *ABCG11* und *ABCG12*-Gens zeigen in den Sprossachsen- und Blattepidermiszellen jeweils ähnliche subzelluläre cytoplasmatische Agglomerate mit Einstülpungen in die Zentralvakuole (Bird et al. 2007; Luo et al. 2007; Panikashvili et al. 2007; Panikashvili et al. 2010; Pighin et al. 2004; Ukitsu et al. 2007). Auch die Analysen der epidermalen Wachszusammensetzungen beider Mutanten weisen hervorragende Übereinstimmungen in den Defiziten auf (Bird 2008; Pighin et al. 2004). Dagegen ergaben Totalextraktionen der Sprossachsenwachse der *abcg12*-Linie keine Unterschiede zum Wildtyp (Pighin et al. 2004). Daraus schloss man, dass die zellulären Lipideinschlüsse das Defizit der epidermalen Wachse repräsentieren, die durch den defekten ABCG12-Transporter nicht exportiert wurden. Außerdem zeigten Doppelknockoutlinien *abcg11 abcg12* in der Sprossachse keinen additiven Effekt bezüglich des chemischen Phänotyps der Sprossachsenwachse (Bird 2008). Diese Umstände deuten darauf hin, dass die veränderte Wachszusammensetzung der Sprossachse der *abcg11*-Linie auf den Mangel des Heterodimers ABCG11/12 zurückgeführt werden kann. Eine Analyse der Lipideinschlüsse der *abcg11*-Knockdownmutanten könnte Aufschluss darüber geben ob es sich möglicherweise um nicht abtransportierte Wachsbestandteile bei unveränderter Synthese handelt und weitere Indizien zur Substratspezifität des Transporters liefern.

Die Änderungen der Lipidzusammensetzungen des Blüten-, Blatt-, Sprossachsen- und Schotenkutins sowie des Wurzelsuberins betreffen meist Monomere, die den Disäuren,  $\omega$ -Hydroxysäuren oder den mittkettig oxygenierten Säuren angehören.

Das Sprossachsenkutin der Knockdownlinie *abcg11* weist keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp auf, vereinzelt Bestandteile liegen tendenziell erhöht vor (Kapitel 3.3.2). Dies steht im Gegensatz zu Beobachtungen der *desperado 3*-Linie (*dso3*-Linie), einer anderen Knockdownlinie des *ABCG11*-Gens. Dort wurden signifikante Verringerungen aller Monomere des Kutinpolymers um über 50 %

nachgewiesen (Panikashvili et al. 2007; Panikashvili et al. 2010). Die Expression des Gens *ABCG11* ist in der Sprossachse, ebenso wie in der Wurzel, auf ein Viertel des Wildtypniveaus reduziert, während die Expression im Blatt auf 1/400 reduziert ist. Die schwache Verminderung der Expression in der Sprossachse reicht eventuell nicht aus um einen chemischen Phänotyp im Kutinpolyester herbeizuführen, die fast gänzlich unterdrückte Genexpression im Blatt dagegen schon. In der Überexpressionslinie von *ABCG11* (Kapitel 3.3.3) sind im Sprossachsenkutin tendenziell höhere Mengen aller Monomere, die den Disäuren und mittkettig oxygenierten Säuren angehören, vorhanden. In diesen Stoffklassen sind die Mengen der C<sub>16</sub>-Disäure und der C<sub>16</sub>-DHFS im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht.

Im Blattkutin verursacht der Knockdown die Reduktion aller  $\omega$ -Hydroxysäuren und Disäuren. Wobei die Reduktion am stärksten die C<sub>16</sub>- $\omega$ -Hydroxysäure, die C<sub>16</sub>-Disäure, die C<sub>18:1</sub>-Disäure, sowie die C<sub>18:2</sub>-Disäure betrifft, die in der Überexpressionslinie *ABCG11-OE* (Kapitel 3.3.5) am stärksten erhöht vorliegen. Hinzu kommt eine Akkumulation der mittkettig oxygenierten Säuren C<sub>16</sub>-DHFS und C<sub>16</sub>-HDFS, welche in der Knockdownlinie geringfügig verringert vorliegen.

Im Blütenkutin der Knockdownlinie sind die Mengen der C<sub>16</sub>-DHFS tendenziell und die Mengen der C<sub>16</sub>-HDFS und der C<sub>18</sub>-Disäure signifikant erhöht. (Kapitel 3.3.6). Hier wurde keine Erhöhung der Kutinbestandteile erwartet, da das Gen *ABCG11* in der Blüte geringer exprimiert vorliegt (Panikashvili et al. 2010). Möglicherweise liegt hier ein ähnlicher Effekt wie beim Sprossachsenkutin der Knockdownlinie vor, wo trotz verminderter Genexpression das Kutin tendenziell erhöht vorliegt.

Im Schotenkutin der Knockdownlinie sind im Vergleich zum Wildtyp die Menge der C<sub>18:1</sub>-Disäure tendenziell und die der C<sub>18:2</sub>-Disäure signifikant vermindert, dagegen sind die Mengen der C<sub>20</sub>- $\omega$ -Hydroxysäure, der C<sub>16</sub>-DHFS und der C<sub>16</sub>-HDFS signifikant erhöht (Kapitel 3.3.7).

Auch in der Wurzel der Knockdownlinie sind die Mengen der C<sub>16</sub>- $\omega$ -Hydroxysäure, der C<sub>18:1</sub>- $\omega$ -Hydroxysäure und der C<sub>16</sub>-Disäure im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert (Kapitel 3.3.8). Des Weiteren liegen auch Monomere der Säuren, Alkohole und Aromaten signifikant verringert vor. In der Überexpressionslinie *ABCG11-OE* sind die Menge der C<sub>18:1</sub>- $\omega$ -Hydroxysäure und der C<sub>18:1</sub>-Disäure im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht (Kapitel 3.3.9).

Die Änderungen in den Biopolymeren belegen zum Einen die Beteiligung des *ABCG11*-Gens an der Bildung der Kutinmatrix in der Sprossachse, Blüte, Blatt und Schote, und der Suberinmatrix in der Wurzel. Zum Anderen ermöglichen die Ergebnisse wie erwartet Rückschlüsse auf mögliche Substrate des ABCG11-Transporters.

Wie oben aufgeführt sind hauptsächlich aliphatische Bestandteile der Kohlenstoffkettenlängen  $C_{16}$  und  $C_{18}$  mengenmäßig verändert, die den  $\omega$ -Hydroxysäuren, Disäuren und mittkettig oxygenierten Säuren angehören. Dabei sind die Monomere dieser Substanzklassen in den Knockdownlinien gemeinsam verringert (Blatt, Wurzel) und in den Überexpressionslinien gemeinsam erhöht (Sprossachse, Blatt, Wurzel). Die Substratspezifität des ABCG11-Transporters kann daher auf die genannten Monomere eingegrenzt werden. Eine Ausnahme bildet die veränderte Zusammensetzung des Schotenkutins. Dort liegen die Disäuren verringert, die mittkettig oxygenierten Säuren erhöht und die  $\omega$ -Hydroxysäuren unverändert vor, was die Substratspezifität des ABCG11-Transporters auf  $C_{16}$ - und  $C_{18}$ -Disäuren einengt. Damit wären Änderungen der  $\omega$ -Hydroxysäuren und mittkettig oxygenierten Säuren im Biopolymer auf andere Ursachen zurückzuführen. Die Änderungen von Polyesterbestandteilen anderer Substanzklassen, der Säuren, Alkohole, 2-Hydroxysäuren und Aromaten, folgen keinem erkennbaren Muster und sind vermutlich Folgen eines indirekten Effekts. Ähnliches wurde bei der *dso3*-Linie beobachtet, wo alle Kutinmonomere der Sprossachse und des Blattes um 50 % reduziert vorlagen (Panikashvili et al. 2007).

Unter der Voraussetzung, dass in der Knockdownlinie weniger und in der Überexpressionslinie mehr ABCG11-Transporter vorliegen als im Wildtyp, kann folgende Überlegung angestellt werden. Ist eine geringere Anzahl an Transportern vorhanden, werden die Disäuren, als direkter Effekt, in geringerer Menge im Polymer vertreten sein. Eine Akkumulation der nicht-exportierten Monomere könnte sich direkt oder indirekt auf den Stoffwechsel bewirken. Beispielsweise könnte die Synthese der Disäuren oder der Vorstufe, die  $\omega$ -Hydroxysäuren, eingeschränkt werden. Damit würden die Disäuren oder die  $\omega$ -Hydroxysäuren und dessen Folgeprodukte (mittkettig oxygenierte Säuren und Disäuren, Abbildung 1-7) in geringerer Menge im Polymer auftreten. Dieses Szenario würde die simultane Verringerung der Disäuren, der  $\omega$ -Hydroxysäuren im Wurzelsuberin und bzw. zusätzlich der mittkettig oxygenierten

Säuren im Blattkutin erklären. Eine verminderte Disäuresynthese könnte auch die Akkumulation der Vorstufe oder Umleitung der Vorstufe zur Synthese anderer Monomere bewirken (Abbildung 1-7). Das könnte die Steigerung der mittkettig oxygenierten Säuren bei gleichzeitiger Verringerung der Disäuren im Schotenkutin erklären. In den Überexpressionslinien könnte eine höhere Anzahl an ABCG11-Transportern, als direkter Effekt, den schnelleren Export der Disäuren bewirken. Dies sollte jedoch nicht die regulär gebildete Menge der Disäuren im Polymer steigern. Möglicherweise verursacht ein schnellerer Abtransport der Disäurebausteine eine Senke im Lipidstoffwechsel, die durch eine gesteigerte Disäuresynthese ausgeglichen wird. Auch hierbei könnten die Synthesen der Vorstufe und Folgeprodukte der Disäure betroffen sein und dementsprechend mengenmäßig erhöht im Polymer auftreten. Dieses Szenario würde die Steigerung der Disäuren,  $\omega$ -Hydroxysäuren und mittkettig oxygenierten Säuren in den Polymerzusammensetzungen der Überexpressionslinien in Wurzel, Blatt und Sprossachse erklären.

Die Beteiligung des ABCG11-Transporters an der Bildung der Kutinmatrix in Sprossachse, Blatt, Blüte und Schote und der Suberinmatrix in der Wurzel wird mit dieser Studie bestätigt. Die Substratspezifität des Transporters konnte auf Disäuren der Kettenlängen  $C_{16}$  und  $C_{18}$  eingegrenzt werden. Ob weitere Monomere, insbesondere  $\omega$ -Hydroxysäuren und mittkettig oxygenierten Säuren ebenfalls durch ABCG11 exportiert werden können bleibt unklar. McFarlane et al. (2010) bewies, dass ABCG11 mit sich selbst und mit ABCG12 dimerisieren kann. Aufgrund der ähnlichen Wachstdefizite in den epidermalen Sprossachsenwachsen der Knockoutlinien *abcg11* und *abcg12*, sowie der Doppelknockoutlinie *abcg11 abcg12* schloss Bird (2008) auf die Zuständigkeit des Heterodimers für den Wachsexport. Es gibt 28 weitere ABCG-Transporter die eine hohe Expression in der Epidermis aufweisen und deren Funktion nicht beschrieben ist. ABCG11 ist in allen oberirdischen Organen in der Epidermis und in lateralen Wurzelprimordien exprimiert (Panikashvili et al. 2007; Panikashvili et al. 2010). Eine *ABCG11*-Expression und Lokalisation wurde auch im subepidermalen Gewebe der Sprossachse nachgewiesen, welche keine nachweisbaren Mengen an Kutin oder Wachs beinhalten. Möglicherweise werden dort andere Lipide in den Apoplasten transportiert (Panikashvili et al. 2010). Diese Indizien deuten auf weitere Möglichkeiten zur Dimerisierung des ABCG11-Transporters hin, was mit Unterschieden in der Substratspezifität einhergehen könnte. (Panikashvili et al. 2011) konnte anhand von

Knockdownlinien in *A. thaliana* die Beteiligung des ABC-Transporters ABCG13 an der Blütenkutinbildung nachweisen. Dort war die Kutinmenge um 50 % im Vergleich zum Wildtyp verringert. Die Reduktion betraf Aromaten, Säuren, Disäuren,  $\omega$ -Hydroxysäuren und mittkettig oxygenierten Säuren. ABCG32, ein weiterer ABC-Transporter, weist eine Beteiligung an der Bildung des Sprossachsen-, Blatt- und Blütenkutins in *Arabidopsis thaliana* auf (Bessire et al. 2011). Der Knockdown von ABCG32 führt zur signifikanten Reduktion bestimmter Monomere im Blütenkutin. Die Mengen der C<sub>16</sub>-DHFS, aller  $\omega$ -Hydroxysäuren und der C<sub>16</sub>-Disäure sind jeweils um 50 % verringert. Im Blattkutin liegen Monomere, die den  $\omega$ -Hydroxysäuren und Disäuren angehören, reduziert vor. Auch im Sprossachsenkutin liegt eine verminderte Menge an  $\omega$ -Hydroxysäuren und mittkettig oxygenierten Säuren vor. Somit sind an der Bildung der Kutinmatrix in der Blüte die ABC-Transporter ABCG11, ABCG13 und ABCG32 beteiligt und in Blatt und Sprossachse die ABC-Transporter ABCG11 und ABCG32. In den transgenen Linien dieser Gene sind zum Teil die gleichen Monomere von der Reduktion betroffen. Im Blütenkutin aller Linien unterliegt die C<sub>16</sub>-Disäuremenge einer signifikanten Verminderung, des Weiteren die C<sub>18:1</sub>-Disäure und C<sub>18:2</sub>-Disäure bei der *abcg11*- und der *abcg13*-Linie. Im Blattkutin der *abcg11*- und *abcg32*-Linie liegt in beiden Fällen eine Verringerung der C<sub>16</sub>-Disäuremenge vor. Dies ist ein Indiz für die Beteiligung mehrerer ABC-Transporter mit möglicherweise überschneidender Substratspezifität an der Polymerbildung.

Weiteren Aufschluss über die Rolle des Transporters ABCG11 könnte eine Analyse der zellulären Lipideinschlüsse der *abcg11*-Linie erbringen. Würde man die Wachs und Polyesterdefizite dort auffinden, könnte man eine veränderte Monomersynthese ausschließen und die Substrate des Transporters eingrenzen. Dagegen würden Unterschiede in der Zusammensetzung auf komplexere regulatorische Zusammenhänge hindeuten. Interessant ist auch die Frage mit welchen weiteren ABCG-Transportern ABCG11 dimerisieren kann, was möglicherweise gewebespezifisch unterschiedlich auftritt. Ebenso ist eine Messung der ABCG11-Genexpression in den Überexpressionslinien notwendig um die ABCG11-Überexpression zu verifizieren.

#### 4.4 Beteiligung der SHINE-Gene an der Kutikula- und Suberinbildung

Die in dieser Studie ermittelten Lipidzusammensetzungen der Blüten- und Blattkutikula und des Wurzelsuberins im Wildtyp von *A. thaliana* entsprechen in der Komposition der Hauptkomponenten bereits publizierten Analysen (Franke et al. 2005; Kannangara et al. 2007; Panikashvili et al. 2011).

In der transgenen Knockdownlinie *shn1/2/3* konnten im Vergleich zum Wildtyp Änderungen der kutikulären Lipidkompositionen in der Blüte und im Blatt nachgewiesen werden. Die Zusammensetzung des Blütenwachses liegt im Vergleich zum Wildtyp unverändert vor, wogegen die Blütenkutinmenge um über 51 % reduziert ist. Setzt man die beobachteten Änderungen der Lipidzusammensetzung des Blütenkutins in Bezug zum Stoffwechselweg der Lipidbiosynthese ergeben sich verschiedene Erklärungen für mögliche Zielgene der Transkriptionsfaktoren. Im Blütenkutin sind die  $\omega$ -Hydroxysäuren, Disäuren und mittkettig oxygenierten Säuren am stärksten von der Reduktion betroffen. Für diese Substanzklassen konnten auch, in Studien an *SHN1*-Überexpressionslinien, die stärksten Änderungen in den Kutikulazusammensetzungen der Blüte, des Blattes und der Sprossachse beobachtet werden (Aharoni et al. 2004; Broun et al. 2004; Kannangara et al. 2007). Wie in Kapitel 1.2.2 erläutert, entstehen die mittkettig oxygenierten Säuren und Disäuren aus den  $\omega$ -Hydroxysäuren. Da die Fettsäuren, die Vorstufen der  $\omega$ -Hydroxysäuren, mengenmäßig nicht signifikant verändert vorliegen, formiert sich die Hypothese, dass die *SHINE*-Transkriptionsfaktoren spezifisch an der Synthese der  $\omega$ -Hydroxysäuren beteiligt sind. Dies könnte aus der Regulation der betreffenden *CYPs* durch die Transkriptionsfaktoren resultieren. Als Folge eines Knockdowns und der damit verbundenen Reduktion der Syntheseleistung würden die Folgeprodukte der  $\omega$ -Hydroxysäure, die Disäuren und die mittkettig oxygenierten Säuren, ebenfalls in geringerer Menge synthetisiert werden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die *SHINE*-Transkriptionsfaktoren in die Synthese aller drei Substanzklassen eingreifen, was als Folge ebenfalls zur verminderten Menge der genannten Konstituenten führen würde. Die in silico-Studie zur Coexpression (Abbildung 7-15) weist auf eine Coregulation des *SHN1*-Transkriptionsfaktorgens mit zwei  $\omega$ -Hydroxylasen *CYP86A4* und *CYP86A7* hin (Kapitel 1.2.2). Eine Microarray-Studie an der Blüte der *shn1/2/3* Knockdownlinie bestätigt diese Coregulation (Shi et al. 2011). Die Expressionen von *CYP86A4* und *CYP86A7* sind in der *shn1/2/3*-Linie vermindert. Für

CYP86A4 konnte die Funktion als  $\omega$ -Hydroxylase spezifisch für C<sub>16</sub>-Säuren nachgewiesen werden (Li-Beisson et al. 2009b). CYP86A7 weist eine Sequenzhomologie von 69,8 % zu CYP86A4 auf und durch in vitro Studien konnte die Funktion als  $\omega$ -Hydroxylase für C<sub>12</sub>-Säure nachgewiesen werden (Duan und Schuler 2005). Die Substratspezifität der CYP86A7  $\omega$ -Hydroxylase könnte in vivo auch Fettsäuren längerer Kohlenstoffkettenlängen umfassen. Die verminderte Genexpression der  $\omega$ -Hydroxylasegene wird zu geringeren Mengen Enzym und folgend verminderter Synthese von  $\omega$ -Hydroxysäuren und Folgeprodukte führen.

Die Microarray-Studie der *shn1/2/3* Blüte weist für fünf weitere Gene aus dem Lipidstoffwechsel eine Coregulation mit den *SHINE*-Transkriptionsfaktorengenen auf (Shi et al. 2011): drei GDSL-Motiv-Lipasen/Hydrolasen (*RXF26*, *At2g42990* und *At5g33370*); eine Hydrolase (*BDG3*); eine Fettsäure-CoA-Reduktase (*FAR1*). Keines dieser Gene ist als putative Oxidase, welche Disäuren synthetisieren, oder putative Mittketten-Oxygenase, zur Synthese mittkettig oxygenierter Säuren, ausgezeichnet. Die Funktionen der GDSL-Motiv-Lipasen/Hydrolasen und BDG3 sind nicht charakterisiert. Diese Proteine könnten auf die Bildung des Blütenkutinpolyesters einwirken. Ihre jeweilige Funktion lässt sich aus Genen mit hoher Sequenzhomologie ableiten. Die nächstverwandten Proteine sind die putative GDSL-Lipase At2g04570 und BDG1, beides sind extrazelluläre Proteine unbekannter Funktion. Für die GDSL-Lipase konnte die Beteiligung an der Pollenwandbildung nachgewiesen werden und für BDG1 die Beteiligung an der Kutikulabildung (Kurdyukov et al. 2006a; Mayfield et al. 2001). FAR1 ist als Fettsäure-Reduktase zur Synthese von Alkoholen in Suberin und Wachs beschrieben worden (Domergue et al. 2010). Änderungen innerhalb der Alkohole wurden in der Kutikula der Blüten jedoch nicht detektiert. Diese Indizien unterstützen die Hypothese, dass die die *SHINE*-Transkriptionsfaktoren Gene zur Synthese der  $\omega$ -Hydroxysäuren kontrollieren und daraus die Verminderung der Disäuren und mittkettig oxygenierten Säuren resultiert.

Wie in der Einleitung erläutert, ist nicht bekannt welche Fettsäurederivate zur Synthese der  $\omega$ -Hydroxysäuren, Disäuren und mittkettig oxygenierter Säuren verwendet werden (Kapitel 1.2.2). Die Vorstufen können als Fettsäure in freier Form, als Thioester mit Coenzym A oder mit Glycerin verestert vorliegen. Die Umformung zu den Fettsäurederivaten benötigt die Aktivität von Acyltransferasen. Sind verminderte Mengen an Acyltransferasen vorhanden, kann dies ebenfalls zur verminderten Synthese

der genannten Kutinmonomere führen. Auch die Transportform der Konstituenten, sowie der Transport vom ER zur Membran, in den Apoplasten und die dortige Assemblierung des Polymers ist nicht aufgeklärt. Daher könnte der Knockdown der Transkriptionsfaktoren durch Genregulation beispielsweise der Acyltransferasen, ABC-Transporter, Lipid-Transferproteinen oder Polyestersynthasen, ebenfalls zu einer veränderten Lipidzusammensetzung des Kutins führen.

Zusätzlich zum Kutinpolymer wurden auch Veränderungen in der Zusammensetzung des Blattwachses beobachtet. Dort liegen die Alkane C<sub>29</sub>, C<sub>31</sub> und C<sub>33</sub> signifikant erhöht vor. Um diesen Effekt in der transgenen Linie zu erklären, kann der Lipidsyntheseweg der erhöht vorliegenden Wachsbestandteile herangezogen werden. Die Alkane stammen aus dem Decarboxylierungsweig der Wachsbiosynthese. Man nimmt an, dass dort sehr langkettige Fettsäuren (C<sub>20</sub>-C<sub>34</sub>) durch Fettsäure-CoA-Reduktasen zu Aldehyden und nachfolgend durch Aldehyd-Decarboxylasen zu Alkanen umgeformt werden (Cheesbrough und Kolattukudy 1984; Vioque und Kolattukudy 1997). Die Vorstufen der Alkane, die C<sub>30</sub>- bis C<sub>34</sub>-Fettsäuren und -Aldehyde, liegen im Vergleich zum Wildtyp mengenmäßig unverändert vor. Demzufolge ist eine Beteiligung der *SHINE*-Transkriptionsfaktoren frühestens bei der Decarboxylierung in der Alkansynthese möglich. Falls die Transkriptionsfaktoren die Alkansynthese über die Aldehyd-Decarboxylase regulieren würde im vorliegenden Fall eine Funktion als Repressor angenommen werden. Durch eine geringere Menge an *SHINE*-Transkriptionsfaktoren würde die Alkansynthese entsprechend gesteigert werden. Spekuliert wird die Rolle von *CER1* als Decarboxylase (Aarts et al. 1995). Transgene *CER1*-Linien weisen geringere Mengen Alkane und Folgeprodukte auf, jedoch auch verminderte Mengen primärer Alkohole. Die zu erwartende Decarboxylasefunktion konnte nicht erfolgreich nachgewiesen werden. Eine Mittketten-Alkan-Hydroxylase der Wachsbiosynthese synthetisiert sek. Alkohole und Ketone aus Alkanen. Wird dieser Syntheseschritt verringert, werden weniger Alkane zu Folgeprodukten umgesetzt und können akkumulieren. Die in silico Coexpressionsstudie (Kapitel 1.2.5, Abbildung 7-15) zeigt eine Coregulation von *SHN3* und *CYP96A15*. *CYP96A15* kodiert das Enzym MAH1 (*MAH1: mid-chain alkane hydroxylase1*), dem die Funktion einer Mittketten-Alkan-Hydroxylase nachgewiesen werden konnte (Greer et al. 2007). Es ist in der Lage Alkane zu sekundären Alkoholen und folgend zu Ketonen umzuwandeln. Möglicherweise unterliegt *CYP96A15* der Kontrolle von *SHN3*, dann würde die Expression im

Knockdown herunter reguliert sein und die verminderte Menge des Enzyms MAH1 könnte wie oben beschrieben die Akkumulation der Alkane bewirken. Die Genexpression von *CYP96A15* wurde im Blatt der Knockdownlinie nicht geprüft. Die Ketone und sek. Alkohole kommen im Blattwachs nur in Spuren vor und wurden hier nicht detektiert, daher fehlen weitere Indizien für diese Hypothese (Aharoni et al. 2004). Das Blattkutin der *shn1/2/3*-Linie wies keine Unterschiede der Polyesterzusammensetzung im Vergleich zum Wildtyp auf.

Aufgrund der Expression von *SHINE*-Transkriptionsfaktorengenen in der Wurzel wurde die Suberinkomposition der *shn1/2/3*-Linie untersucht (Kapitel 1.3.4). Das Suberinpolymer der Wurzel weist in der Knockdownlinie im Vergleich zum Wildtyp keine Änderungen in der Lipidkomposition auf, was verschiedene Ursachen haben kann. Die *in silico* Studie zeigt eine Expression von *SHN1* und *SHN3* in der juvenilen Wurzel. Eine Beteiligung der Transkriptionsfaktoren an der Wurzelsuberinbildung ist möglicherweise in einem bestimmten Entwicklungsstadium erforderlich und spielt in der adulten Wurzel keine Rolle. Außerdem konnte für *SHN3* mittels GUS-Lokalisationsstudie die Expression im Zentralzylinderparenchym der Wurzel, in der kein Suberin eingelagert wird, nachgewiesen werden (Shi et al. 2011). Möglicherweise regulieren die *SHINE*-Transkriptionsfaktoren dort andere Entwicklungsprozesse. In Gerste (*Hordeum vulgare*) konnte die Beteiligung des *SHINE*-Orthologs *Nud* (*Nudum*) bei der Einlagerung einer Substanz in die Karyopse nachgewiesen werden (Taketa et al. 2008). Die Funktion der Substanz besteht offenbar in der Vermittlung der Adhäsion der Karyopsenhülle mit dem Samen. Fehlt die Substanz, wie es in der natürlich vorkommenden Mutante vorkommt, haftet die Hülle nicht am Samen. Mittels Färbung mit lipophilen Farbstoffen konnte die lipophile Natur der Substanz nachgewiesen werden, die Zusammensetzung wurde jedoch nicht aufgedeckt. In *Oryza sativa* konnte mittels ektopischer Expression von *AtSHN2* eine starke Veränderung der Menge und Zusammensetzung des Lignins und der Zellulose hervorgerufen werden (Ambavaram et al. 2011). Die Mutante wies einen Anstieg der Zellulose um 34 % und eine Verringerung des Lignins um 45 % in den Sprossachsen auf. Man schloss daraus auf die integrale Rolle der *SHINE*-orthologen Transkriptionsfaktoren in Reis bei der Entwicklung des Festigungsgewebes. In *A. thaliana* konnte mittels FT-IR (Fourier Transform Infrarot Spektroskopie) eine veränderte Zellwandzusammensetzung in den Petalen der *shn1/2/3*-Linie nachgewiesen

werden (Shi et al. 2011). Möglicherweise kommt den Transkriptionsfaktoren im Zentralzylinder von *A. thaliana* eine ähnliche Rolle zu, beispielsweise bei der Regulation von Genen die an der Bildung apoplastischer Lipide, dem Aufbau des Festigungs- oder Leitgewebes oder der Zellwand beteiligt sind.

In der vorliegenden Studie konnte durch Knockdown der *SHINE*-Transkriptionsfaktorengene in *A. thaliana* die Beteiligung am Aufbau der Kutikula nachgewiesen werden. Die Änderungen der Lipidkomposition weisen auf eine spezifische Wirkung der Transkriptionsfaktoren in der Lipidsynthese hin. Im Blütenkutin sind die  $\omega$ -Hydroxysäuren und dessen Folgeprodukte betroffen und im Blattwachs die Alkane. Für diese Substanzklassen konnten in Studien von *SHN1*-Überexpressionslinien die stärksten Änderungen in den Kutikulazusammensetzungen der Blüte, des Blattes und der Sprossachse beobachtet werden (Aharoni et al. 2004; Broun et al. 2004; Kannangara et al. 2007). Indizien (s.o., Abbildung 7-15) weisen auf eine spezifische Regulation der  $\omega$ -Hydroxylierung in der Kutinbiosynthese und der Mittketten-Alkan-Hydroxylierung in der Wachssynthese durch die *SHINE*-Transkriptionsfaktoren hin. Die Expressionsdaten der  $\omega$ -Hydroxylasen *CYP86A4* und *CYP86A7* untermauern diese Annahme, eine Expressionsstudie der Mittketten-Alkan-Hydroxylase *CYP96A15* steht aus. Eine Beteiligung der Transkriptionsfaktoren an der Bildung des Suberinpolymers konnte nicht nachgewiesen werden. Die Expressions- und Lokalisationsmuster der *SHINE*-Transkriptionsfaktoren deuten auf eine Beteiligung am Aufbau des Zentralzylinders hin. Eine Analyse der Zellwandzusammensetzung könnte weiteren Aufschluss über die Rolle der *SHINE*-Transkriptionsfaktoren bei der Zellwandbildung geben.

## 4.5 Zusammenfassende Diskussion

Anhand der veränderten Polyesterzusammensetzungen der Mutanten konnten die Funktionen der untersuchten Gene bzw. ihrer korrespondierenden Proteine ermittelt und diese innerhalb des Modells der Polyestersynthese zugeordnet werden (Abbildung 1-5; Abbildung 4-2).

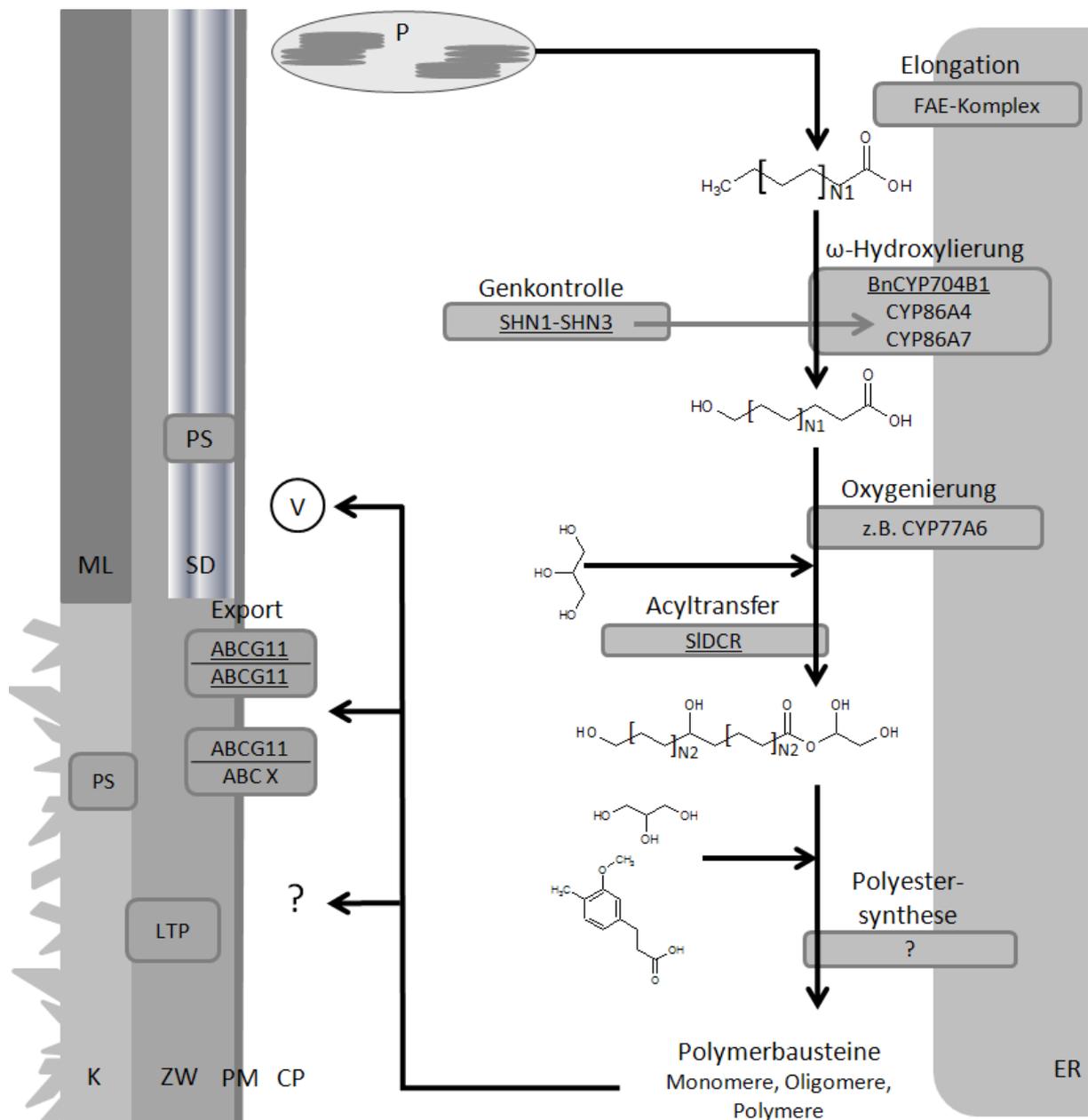
Wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, werden für die Bildung von Kutin und Suberin plastidäre  $C_{16}$ -/ $C_{18}$ -Fettsäuren durch ER assoziierte Enzyme elongiert oder funktionalisiert. Für das antherenspezifisch exprimierte Gen *BnCYP704B1* aus *B. napus* konnte eine Beteiligung an der Antherenkutikulabildung nachgewiesen werden (Yi et al. 2010). Anhand der spezifischen Reduktion der  $C_{16}$ -/ $C_{18}$ - $\omega$ -Hydroxysäuren im Antherenkutin der *Bncyp704b1*-Mutante und der Gensequenzhomologie zu *OsCYP704B2* konnte die Funktion einer  $\omega$ -Hydroxylase von  $C_{16}$ -/ $C_{18}$ -Fettsäuren nachgewiesen werden (Abbildung 4.2, Kapitel 4.1, Li et al. 2010, Yi et al. 2010). Die resultierenden  $\omega$ -Hydroxysäuren können durch CYP (Mittketten-Oxygenasen, Oxidasen, etc.) zu mittkettig oxygenierten Säuren oder Disäuren umgesetzt werden (Kapitel 1.2.2, Abbildung 1-7).

Anschließend erfolgt eine Verknüpfung der Monomere mit Glycerin, Aromaten und untereinander. Der BAHD-Acyltransferase SIDCR aus *S. lycopersicum* konnte mithilfe der RNAi-Linie *Sldcr* die Beteiligung an der Bildung der Tomatenfruchtkutikula nachgewiesen werden (Kapitel 4.2). Anhand der Reduktion der  $C_{16}$  und  $C_{18}$ -Dihydroxyfettsäuren und Akkumulation der Vorstufen im Kutin, der Sequenzhomologie zu *AtDCR* und in vitro Studien der *AtDCR* konnte die Funktion als Acyltransferase zur Bildung von  $C_{16}$  und  $C_{18}$ -Dihydroxyfettsäureglycerin belegt werden (Abbildung 4-2, Kapitel 1.2.2, Panikashvili et al. 2007, Rani et al. 2010). Unbekannt ist, ob erst die Verknüpfung der  $\omega$ -Hydroxysäure mit Glycerin und anschließend die Mittkettenhydroxylierung erfolgt oder zuerst die Mittkettenhydroxylierung und danach die Verknüpfung der Dihydroxyfettsäure mit Glycerin stattfindet.

Vor dem Export aus der Zelle werden die gebildeten Monomere und Dimere wahrscheinlich durch Polyestersynthasen zu Polymerbausteinen weiterverknüpft (Kapitel 1.2.1, Beisson et al. 2012, Li-Beisson 2011). Für den *half-size* ABC-Transporter

*ABCG11* konnte in *A. thaliana* mithilfe von Cosuppressionslinien die Beteiligung an der Kutin- und Suberinbildung nachgewiesen werden. Die Polyesterbestandteile, Disäuren mit Kohlenstoffkettenlängen von C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub>, die in den Knockdown- und Überexpressionslinien mit der ABC-Transportermenge einhergehen wurden als Substrate von *ABCG11* ausgemacht (Kapitel 4.3). Die konkrete Beschaffenheit des Transporters ist nicht bekannt, dieser könnte als Homo- oder Heterodimer vorliegen (Abbildung 4-2).

Das komplexe Netzwerk der Polyesterbildung unterliegt der Genkontrolle durch Transkriptionsfaktoren (TF) (Nawrath 2006). Für die SHINE-TFfamilie (SHN1 bis SHN3) konnte die Beteiligung an der Kutikulabildung nachgewiesen werden (Kapitel 4.4, Aharoni et al. 2004, Broun et al. 2004, Kannangara et al. 2007). Der Knockdown in *A. thaliana* führte in der Kutikula zur Verringerung der  $\omega$ -Hydroxysäuren und Folgeprodukte, sowie zu einer Akkumulation der Alkane. Unter Berücksichtigung der veränderten Kutikulazusammensetzung, der Coexpressions- und in silico Studien konnten mögliche Targets der TF identifiziert werden. In der Kutinbildung unterliegt die  $\omega$ -Hydroxysäuresynthese durch die  $\omega$ -Hydroxylasen CYP86A4 und CYP86A7 der Kontrolle der SHINE-TF und in der Wachsbildung die Umsetzung der Alkane durch die Mittketten-Alkan-Hydroxylase CYP96A15 (Abbildung 4-2, Kapitel 4.4, Greer et al. 2007, Shi et al. 2011).



**Abbildung 4-2 Einordnung der untersuchten Gene in das Modell der Polyestersynthese**

Schematische Darstellung einer fiktiven Suberin und Kutin bildenden Pflanzenzelle mit Plastid (P), Cytoplasma (CP), PM (Plasmamembran), Zellwand (ZW), Kutikula (K), ML (Mittellamelle), Suberindepositon (SD), Lipidtransferproteinen (LTP), Polyestersynthese (PS) und Endoplasmatischen Retikulum (ER). In Anlehnung an Abbildung 1-5 wurden die untersuchten Gene, *BnCYP704B1*, *SIDCR*, *ABCG11* und *SHN1-SHN3*, funktional in die Polyestersynthese eingeordnet. Anzahl C<sub>2</sub>-Einheiten N1: 6; N2: 3

## **5 Zusammenfassung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand ausgewählter Mutanten Rückschlüsse auf die Beteiligung der untersuchten Gene an der Polyesterbildung von Kutin und Suberin zu ziehen. Untersucht wurden die Polyesterzusammensetzungen einer CYP450-abhängigen  $\omega$ -Hydroxylase *BnCYP704B1* in *Brassica napus*, einer BAHD-Acyltransferase *SIDCR* in *Solanum lycopersicum*, einem ABC-Transporter *ABCG11*, sowie die Transkriptionsfaktorenfamilie *SHN1 bis SHN3* in *Arabidopsis thaliana*.

In *B. napus* wurde die doppelt rezessive Linie des Gens *BnCYP704B1* untersucht. Die Mutante *Bncyp704b1* weist im Vergleich zum Wildtyp vergrößerte Antheren mit veränderter Kutikulazusammensetzung und defekte Pollenwände, mit Folge einer Semisterilität, auf. In der Mutante wurde ein Defizit von  $C_{16}$ - und  $C_{18}$ - $\omega$ -Hydroxysäuren und deren Folgeprodukte im Antherenkutin nachgewiesen. In Anlehnung an den Polyesterbiosyntheseweg und anhand der Resultate konnte die putative  $\omega$ -Hydroxylasefunktion für  $C_{16}$ - und  $C_{18}$ -Fettsäuren in der Kutinbildung der Antherenkutikula bestätigt werden.

Der RNAi-Knockdown des *SIDCR*-Gens führte in *S. lycopersicum* zu enormen Veränderungen der Morphologie der Tomatenfruchtschale. Mikroskopische Untersuchungen der braungefärbten Schale zeigten, dass die Tomatenfruchtschale mehrere Zelllagen aufweist, die unter UV-Licht fluoreszieren. Durch Transportstudien mit isolierten Kutikeln konnte eine erhöhte Wasserpermeabilität nachgewiesen werden. Die Analyse der chemischen Zusammensetzung der Kutikula ergab, sowohl bei den Wachsen als auch im Kutin, drastische Veränderungen der Kompositionen, was die Beteiligung des Gens an der Kutikulabildung belegt. Die Reduktion der  $C_{16}$ -9/10-Dihydroxyfettsäuremenge ( $C_{16}$ -DHFS) und die Akkumulation der Vorstufen im Kutin belegen die *SIDCR*-Beteiligung an der  $C_{16}$ -DHFS-Synthese. Die Sequenzhomologie zum Ortholog *AtDCR* und in vitro Studien der *AtDCR* führen zur Annahme, dass es sich bei der *SIDCR* ebenfalls um eine BAHD-Acyltransferase handelt die CoA-aktivierte  $C_{16}$ - $\omega$ -Hydroxysäuren mit Glycerin verknüpft, woraus folgend  $C_{16}$ -DHFS-glycerin gebildet wird.

Der ABC-Transporter *ABCG11* wurde mithilfe von Cosuppressionslinien des Gens untersucht bei denen die Polyesterzusammensetzungen von Sprossachse, Blatt, Wurzel, Blüte und Schote analysiert wurden. Es konnten in allen Polyestern veränderte Zusammensetzungen beobachtet werden, welche im Kutin die Substanzklassen der

$\omega$ -Hydroxysäuren, Disäuren und mittkettig oxygenierten Säuren betrafen und im Suberin die der  $\omega$ -Hydroxysäuren und Disäuren. Da in allen Polyestern der Knockdownlinien nur die Disäuren eine Verringerung und in Überexpressionslinien eine Erhöhung zeigten, was schlüssig mit der ABCG11-Transportermenge ist, konnte die Substratspezifität für den ABCG11-Transporter auf gesättigte und ungesättigte C<sub>16</sub>-/C<sub>18</sub>-Disäuren eingeeengt werden.

Die SHINE-Transkriptionsfaktorenfamilie wurde mithilfe eines artifiziiellen RNAi Knockdowns mit den drei Mitgliedern dieser Familie als Target in *A. thaliana* untersucht. Die *shine*-Linien wiesen Organfusionen in der Blüte auf. Die Analyse der Kutikulazusammensetzung ergab in der Mutante eine Verringerung des Blütenkutins und eine Erhöhung der Alkane der Blattwachse. Im Kutin konnte das Defizit an den C<sub>16</sub>- und C<sub>18</sub>- $\omega$ -Hydroxysäuren, Disäuren und mittkettig oxygenierten Säuren ausgemacht werden. Auf Grundlage des bisher bekannten Kutinsynthesewegs und durch Expressionsstudien konnten die  $\omega$ -Hydroxylasegene *CYP86A4* und *CYP86A7* und die Mittketten-Alkan-Hydroxylase *CYP96A15* als SHINE-Target ausgemacht werden.

## **6 Literatur**

- Aarts, Mark, Christian Keijzer, Willem Stiekema, and Andy Pereira. 1995. "Molecular Characterization of the CER1 Gene of Arabidopsis Involved in Epicuticular Wax Biosynthesis and Pollen Fertility." *The Plant Cell* 7: 2115–2127.
- Aharoni, Asaph, Shital Dixit, Reinhard Jetter, Eveline Thoenes, Gert Van Arkel, and Andy Pereira. 2004. "The SHINE Clade of AP2 Domain Transcription Factors Activates Wax Biosynthesis, Alters Cuticle Properties and Confers Drought Tolerance when Overexpressed in Arabidopsis." *The Plant Cell* 16: 2463–2480.
- Ambavaram, Madana, Arjun Krishnan, Kurniawan Trijatmiko, and Andy Pereira. 2011. "Coordinated Activation of Cellulose and Repression of Lignin Biosynthesis Pathways in Rice." *Plant Physiology* 155: 916–931.
- Ariizumi, Tohru, and Kinya Toriyama. 2011. "Genetic Regulation of Sporopollenin Synthesis and Pollen Exine Development." *Annual Review of Plant Biology* 62: 437–460.
- Beisson, Fred, Yonghua Li, Gustavo Bonaventure, Mike Pollard, and John B Ohlrogge. 2007. "The Acyltransferase GPAT5 is Required for the Synthesis of Suberin in Seed Coat and Root of Arabidopsis." *The Plant Cell* 19: 351–368.
- Beisson, Fred, Yonghua Li-Beisson, and Mike Pollard. 2012. "Solving the Puzzles of Cutin and Suberin Polymer Biosynthesis." *Current Opinion in Plant Biology* 15: 1–9.
- Bessire, Michael, Sandra Borel, Guillaume Fabre, Luis Carraca, Nadia Efremova, Alexander Yephremov, Yan Cao, Reinhard Jetter, Anne-Claude Jacquat, Jean-Pierre Métraux, and Christiane Nawrath. 2011. "A Member of the PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE Family of ATP Binding Cassette Transporters is Required for the Formation of a Functional Cuticle in Arabidopsis." *The Plant Cell* 23: 1958–1970.
- Bird, David. 2008. "The Role of ABC Transporters in Cuticular Lipid Secretion." *Plant Science* 174: 563–569.
- Bird, David, Fred Beisson, Alexandra Brigham, John Shin, Stephen Greer, Reinhard Jetter, Ljerka Kunst, Xuemin Wu, Alexander Yephremov, and Lacey Samuels. 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.
- Bonaventure, Gustavo, Frederic Beisson, John Ohlrogge, and Mike Pollard. 2004. "Analysis of the Aliphatic Monomer Composition of Polyesters Associated with Arabidopsis Epidermis: Occurrence of Octadeca-cis-6 , cis-9-diene-1 , 18-dioate as the Major Component." *The Plant Journal* 40: 920–930.
- Broun, Pierre, Patricia Poindexter, Erin Osborne, Cai-Zhong Jiang, and Luis Riechmann. 2004. "WIN1, a Transcriptional Activator of Epidermal Wax Accumulation in Arabidopsis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 4706–4711.

- Buchholz, A. (2006). Characterization of the Diffusion of Non-electrolytes Across Plant Cuticles: Properties of the Lipophilic Pathway. *Journal of experimental botany* 57: 2501–2513.
- Chapple, Clint. 1998. “Molecular-Genetic Analysis of Plant Cytochrome P450-Dependent Monooxygenases.” *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 311–343.
- Cheesbrough, T M, and P E Kolattukudy. 1984. “Alkane Biosynthesis by Decarbonylation of Aldehydes Catalyzed by a Particulate Preparation from *Pisum sativum*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81: 6613–6617.
- Chen, Yuning, Shaolin Lei, Zhengfu Zhou, Fangqin Zeng, Bin Yi, Jing Wen, Jinxiong Shen, Chaozhi Ma, Jinxing Tu, and Tingdong Fu. 2009. “Analysis of Gene Expression Profile in Pollen Development of Recessive Genic Male Sterile *Brassica napus* L. Line S45A.” *Plant Cell Reports* 28: 1363–1372.
- Clough, S J, and A F Bent. 1998. “Floral Dip: a Simplified Method for *Agrobacterium*-Mediated Transformation of *Arabidopsis thaliana*.” *The Plant Journal* 16: 735–743.
- D’Auria, John. 2006. “Acyltransferases in Plants: a Good Time to be BAHD.” *Current Opinion in Plant Biology* 9: 331–340.
- Dan, Yinghui, Hua Yan, Tichafa Munyikwa, Jimmy Dong, Yanling Zhang, and Charles L Armstrong. 2006. “MicroTom--a High-Throughput Model Transformation System for Functional Genomics.” *Plant Cell Reports* 25: 432–441.
- De Bono, Allan, Trevor H Yeats, Jocelyn K C Rose, David Bird, Reinhard Jetter, Ljerka Kunst, and Lacey Samuels. 2009. “*Arabidopsis* LTPG is a Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Lipid Transfer Protein Required for Export of Lipids to the Plant Surface.” *The Plant Cell* 21: 1230–1238.
- Dean, Bill Bryan, and P E Kolattukudy. 1976. “Synthesis of Suberin During Wound-Healing in Jade Leaves, Tomato Fruit, and Bean Pods.” *Plant Physiology* 58: 411–416.
- Dobritsa, Anna, J. Shrestha, M. Morant, F. Pinot, M. Matsuno, R. Swanson, B. L. Moller, and D. Preuss. 2009. “CYP704B1 is a Long-Chain Fatty Acid -Hydroxylase Essential for Sporopollenin Synthesis in Pollen of *Arabidopsis*.” *Plant Physiology* 151: 574–589.
- Domergue, Frederic, Sollapura J Vishwanath, Jerome Joubes, Jasmine Ono, Jennifer A Lee, Matthieu Bourdon, Reem Alhattab, Christine Lowe, Stéphanie Pascal, Rene Lessire, and Owen Rowland. 2010. “Three *Arabidopsis* Fatty Acyl-Coenzyme A Reductases, FAR1, FAR4, and FAR5 , Generate Primary Fatty Alcohols.” *Plant Physiology* 153: 1539–1554.
- Duan, Hui, and Mary Schuler. 2005. “Differential Expression and Evolution of the *Arabidopsis*.” *Plant Physiology* 137: 1067–1081.

- Franke, Rochus, Isabel Briesen, Tobias Wojciechowski, Andrea Faust, Alexander Yephremov, Christiane Nawrath, and Lukas Schreiber. 2005. "Apoplatic Polyesters in Arabidopsis Surface Tissues – A Typical Suberin and a Particular Cutin" 66: 2643–2658.
- Franke, Rochus, and Lukas Schreiber. 2007. "Suberin--a Biopolyester Forming Apoplatic Plant Interfaces." *Current Opinion in Plant Biology* 10: 252–259.
- Franke, Rochus, Rene Höfer, Isabel Briesen, Mitja Emsermann, Nadia Efremova, Alexander Yephremov, and Lukas Schreiber. 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." *The Plant Journal* 57: 80–95.
- Geyer, U, and J Schönherr. 1990. "The Effect of the Environment on the Permeability and Composition of Citrus leaf cuticles I. Water permeability of isolated cuticular membranes." *Planta* 180: 147–153.
- Goodwin, S Mark, Aaron M Rashotte, Musrur Rahman, Kenneth a Feldmann, and Matthew a Jenks. 2005. "Wax Constituents on the Inflorescence Stems of Double Eceriferum Mutants in Arabidopsis Reveal Complex Gene Interactions." *Phytochemistry* 66: 771–80.
- Gou, Jin-Ying, Xiao-Hong Yu, and Chang-Jun Liu. 2009. "A Hydroxycinnamoyltransferase Responsible for Synthesizing Suberin Aromatics in Arabidopsis" 106: 18855–18860.
- Graca, Jose, Lukas Schreiber, Jose Rodrigues, and Helena Pereira. 2002. "Glycerol and Glyceryl Esters of  $\omega$ -Hydroxyacids in Cutins." *Phytochemistry* 61: 205–215.
- Greer, Stephen, Miao Wen, David Bird, Xuemin Wu, Lacey Samuels, Ljerka Kunst, and Reinhard Jetter. 2007. "The Cytochrome P450 Enzyme CYP96A15 is the Midchain Alkane Hydroxylase Responsible for Formation of Secondary Alcohols and Ketones in Stem Cuticular Wax of Arabidopsis." *Plant Physiology* 145: 653–667.
- Isaacson, Tal, Dylan K Kosma, Antonio J Matas, Gregory J Buda, Yonghua He, Bingwu Yu, Arika Pravitasari, James D Batteas, Ruth E Stark, Matthew A Jenks, and Jocelyn K C Rose. 2009. "Cutin Deficiency in the Tomato Fruit Cuticle Consistently Affects Resistance to Microbial Infection and Biomechanical Properties , but Not Transpirational Water Loss." *The Plant Journal* 60: 363–377.
- Joubes, Jerome, Sylvain Raffaele, Brice Bourdenx, Christel Garcia, Jeanny Laroche-Traineau, Patrick Moreau, Frederic Domergue, and René Lessire. 2008. "The VLCFA Elongase Gene Family in Arabidopsis thaliana: Phylogenetic Analysis, 3D Modelling and Expression Profiling." *Plant Molecular Biology* 67: 547–566.
- Kannangara, Rubini, Caroline Branigan, Yan Liu, Teresa Penfield, Vijaya Rao, Grégory Mouille, Herman Höfte, Markus Pauly, José Luis Riechmann, and Pierre Broun. 2007. "The Transcription Factor WIN1/SHN1 Regulates Cutin Biosynthesis in Arabidopsis thaliana." *The Plant Cell* 19: 1278–1294.

- Kolattukudy, P E. 1980. "Biopolyester Membranes of Plants: Cutin and Suberin." *Science* 208: 990–1000.
- Kolattukudy, P. E. (2001). "Polyesters in higher plants." *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology* Vol. 71: 1–49.
- Kolattukudy, P. E. (2005). "Cutin from Plants". *Biopolymers Online*: 1-35
- Kunst, Ljerka, and A Lacey Samuels. 2003. "Biosynthesis and Secretion of Plant Cuticular Wax." *Progress in Lipid Research* 42: 51–80.
- Kunst, Ljerka, and Lacey Samuels. 2009. "Plant Cuticles Shine: Advances in Wax Biosynthesis and Export." *Current Opinion in Plant Biology* 12: 721–727.
- Kurdyukov, Sergey, Andrea Faust, Christiane Nawrath, Sascha Bär, Derry Voisin, Nadia Efremova, Rochus Franke, Lukas Schreiber, Heinz Saedler, Jean Pierre Metraux, and Alexander Yephremov. 2006a. "The Epidermis-Specific Extracellular BODYGUARD Controls Cuticle Development and Morphogenesis in Arabidopsis." *The Plant Cell* 18: 321–339.
- Kurdyukov, Sergey, Andrea Faust, Sandra Trenkamp, Sascha Bär, Rochus Franke, Nadia Efremova, Klaus Tietjen, Lukas Schreiber, Heinz Saedler, and Alexander Yephremov. 2006b. "Genetic and Biochemical Evidence for Involvement of HOTHEAD in the Biosynthesis of Long-chain  $\alpha$ - $\omega$ -Dicarboxylic Fatty Acids and Formation of Extracellular Matrix." *Planta* 224: 315–329.
- Lee, Saet-Buyl, Su-Jin Jung, Young-Sam Go, Hyun-Uk Kim, Jeong-Kook Kim, Hong-Joo Cho, Ohkmae K Park, and Mi-Chung Suh. 2009. "Two Arabidopsis 3-ketoacyl CoA Synthase Genes, KCS20 and KCS2 / DAISY , are Functionally Redundant in Cuticular Wax and Root Suberin Biosynthesis , but Differentially Controlled by Osmotic Stress." *The Plant Journal* 60: 462–475.
- Li, Yonghua, Fred Beisson, Abraham J K Koo, Isabel Molina, Mike Pollard, and John Ohlrogge. 2007. "Identification of Acyltransferases Required for Cutin Biosynthesis and Production of Cutin with Suberin-like Monomers." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 18339–18344.
- Li, Yonghua, and Fred Beisson. 2009a. "The Biosynthesis of Cutin and Suberin as an Alternative Source of Enzymes for the Production of Bio-based Chemicals and Materials." *Biochimie* 91: 685–691.
- Li-Beisson, Yonghua, Mike Pollard, Vincent Sauveplane, Franck Pinot, John Ohlrogge, and Fred Beisson. 2009b. "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, Hui, Franck Pinot, Vincent Sauveplane, Danièle Werck-Reichhart, Patrik Diehl, Lukas Schreiber, Rochus Franke, Ping Zhang, Liang Chen, Yawei Gao, Wanqui Liang, and Dabing Zhang. 2010. "Cytochrome P450 Family Member CYP704B2 Catalyzes the  $\omega$ -

Hydroxylation of Fatty Acids and is Required for Anther Cutin Biosynthesis and Pollen Exine Formation in Rice." *The Plant Cell* 22: 173–190.

Li-Beisson, Yonghua. 2011. "Cutin and Suberin." *Encyclopedia of Life Sciences*: 1–9. doi:DOI: 10.1002/9780470015902.a0001920.pub2.

Luo, Bin, Xue-Yi Xue, Wen-Li Hu, Ling-Jian Wang, and Xiao-Ya Chen. 2007. "An ABC Transporter Gene of *Arabidopsis thaliana*, AtWBC11, is Involved in Cuticle Development and Prevention of Organ Fusion." *Plant & Cell Physiology* 48: 1790–1802.

Lü, Shiyou, Tao Song, Dylan K Kosma, Eugene P Parsons, Owen Rowland, and Matthew A Jenks. 2009. "Arabidopsis CER8 Encodes LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 1 ( LACS1 ) that has Overlapping Functions with LACS2 in Plant Wax and Cutin Synthesis." *The Plant Journal* 59: 553–564.

Mayfield, Jacob, Aretha Fiebig, Sarah Johnstone, and Daphne Preuss. 2001. "Gene Families from the *Arabidopsis thaliana* Pollen Coat Proteome." *Science* 292: 2482–2485.

McFarlane, Heather, John Shin, David Bird, and Lacey Samuels. 2010. "Arabidopsis ABCG Transporters, which are Required for Export of Diverse Cuticular Lipids, Dimerize in Different Combinations." *The Plant Cell* 22: 3066–3075.

Meinke, David W, J Michael Cherry, Caroline Dean, Steven D Rounsley, and Maarten Koornneef. 1998. "Arabidopsis thaliana: a Model Plant for Genome Analysis." *Science* 282: 662–682.

Molina, Isabel, Yonghua Li-Beisson, Fred Beisson, John B Ohlrogge, and Mike Pollard. 2009. "Identification of an Arabidopsis Feruloyl-Coenzyme A Transferase Required for Suberin Synthesis." *Plant Physiology* 151: 1317–1328.

Moore, Ian, Leo Galweiler, Debora Grosskopf, Jeff Schell, and Klaus Palmes. 1998. "A Transcription Activation System for Regulated Gene Expression in Transgenic Plants" 95: 376–381.

Nawrath, Christiane. 2002. "The Biopolymers Cutin and Suberin." *The Arabidopsis Book* 1 e0021: 1–14.

Nawrath, Christiane. 2006. Unraveling the complex network of cuticular structure and function. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 281–287.

Neinhuis, C., and W. Barthlott. 1997. "Characterization and Distribution of Water-repellent, Self-cleaning Plant Surfaces." *Annals of Botany* 79: 667–677.

Nelson, David R. 2006. "Plant Cytochrome P450s from Moss to Poplar." *Phytochemistry Reviews* 5: 193–204.

Panikashvili, David, Sigal Savaldi-Goldstein, Tali Mandel, Tamar Yifhar, Rochus B Franke, René Höfer, Lukas Schreiber, Joanne Chory, and Asaph Aharoni. 2007. "The

- Arabidopsis DESPERADO/AtWBC11 Transporter is Required for Cutin and Wax Secretion." *Plant Physiology* 145: 1345–1360.
- Panikashvili, David, Jian Xin Shi, Lukas Schreiber, and Asaph Aharoni. 2009. "The Arabidopsis DCR Encoding a Soluble BAHD Acyltransferase is Required for Cutin Polyester Formation and Seed Hydration Properties." *Plant Physiology* 151: 1773–1789.
- Panikashvili, David, Jian Xin Shi, Samuel Bocobza, Rochus B Franke, Lukas Schreiber, and Asaph Aharoni. 2010. "The Arabidopsis DSO / ABCG11 Transporter Affects Cutin Metabolism in Reproductive Organs and Suberin in Roots." *Molecular Plant* 3: 563–575.
- Panikashvili, David, Jian Xin Shi, Lukas Schreiber, and Asaph Aharoni. 2011. "The Arabidopsis ABCG13 Transporter is Required for Flower Cuticle Secretion and Patterning of the Petal Epidermis." *New Phytologist* 190: 113–124.
- Pighin, Jamie A, Huanquan Zheng, Laura J Balakshin, Ian P Goodman, Tamara L Western, Reinhard Jetter, Ljerka Kunst, and A Lacey Samuels. 2004. "Plant Cuticular Lipid Export Requires an ABC Transporter." *Science* 306: 702–704.
- Pinot, Franck, and Fred Beisson. 2011. "Cytochrome P450 Metabolizing Fatty Acids in Plants: Characterization and Physiological Roles." *The Febs Journal* 278: 195–205.
- Pollard, Mike, Fred Beisson, Yonghua Li, and John B Ohlrogge. 2008. "Building Lipid Barriers: Biosynthesis of Cutin and Suberin." *Trends in Plant Science* 13: 1360–1385.
- Ranathunge, Kosala, Lukas Schreiber, and Rochus Franke. 2011. "Plant Science Suberin Research in the Genomics Era — New Interest for an Old Polymer." *Plant Science* 180: 399–413.
- Rani, Sapa Hima, T H Anantha Krishna, Saikat Saha, Arvind Singh Negi, and Ram Rajasekharan. 2010. "Defective in Cuticular Ridges ( DCR ) of Arabidopsis thaliana , a Gene Associated with Surface Cutin Formation , Encodes a Soluble Diacylglycerol Acyltransferase". *The Journal of Biological Chemistry* 285: 38337–38347.
- Rautengarten, Carsten, Berit Ebert, Mario Ouellet, Majse Nafisi, Edward E K Baidoo, Peter Benke, Maria Stranne, Aindrila Mukhopadhyay, Jay D. Keasling, Yumiko Sakuragi, and Henrik Vibe Scheller. 2012. "Arabidopsis Deficient in Cutin Ferulate Encodes a Transferase Required for Feruloylation of  $\omega$ -Hydroxy Fatty Acids in Cutin Polyester." *Plant Physiology* 158: 654–665.
- Rea, Philip A. 2007. "Plant ATP-Binding Cassette Transporters." *Annual Review of Plant Biology* 58: 347–375.
- Riederer, Markus. 1991. "Die Kutikula als Barriere zwischen Terrestrischen Pflanzen und der Atmosphäre." *Naturwissenschaften* 78: 201–208.

- Riederer, Markus, and Lukas Schreiber. 2001. "Protecting Against Water Loss: Analysis of the Barrier Properties of Plant Cuticles." *Journal of Experimental Botany* 52: 2023–2032.
- Rupasinghe, Sanjeewa, and Mary A Schuler. 2006. "Homology Modeling of Plant Cytochrome P450s." *Phytochemistry Reviews* 5: 473–505.
- Samuels, Lacey, Ljerka Kunst, and Reinhard Jetter. 2008. "Sealing Plant Surfaces: Cuticular Wax Formation by Epidermal Cells." *The Annual Review of Plant Biology* 59: 683–707.
- Schnurr, Judy, Jay Shockey, and John Browse. 2004. "The Acyl-CoA Synthetase Encoded by LACS2 is Essential for Normal Cuticle Development in Arabidopsis." *The Plant Cell* 16: 629–642.
- Schreiber, Lukas, Rochus B Franke, and Klaus Hartmann. 2005. "Wax and Suberin Development of Native and Wound Periderm of Potato (*Solanum Tuberosum* L.) and its Relation to Peridermal Transpiration." *Planta* 220: 520–530.
- Schreiber, Lukas. 2010. "Transport Barriers Made of Cutin, Suberin and Associated Waxes." *Trends in Plant Science* 15: 1–8.
- Serra, Olga, Carolin Hohn, Rochus Franke, Salome Prat, Marisa Molinas, and Merce Figueras. 2010. "A Feruloyl Transferase Involved in the Biosynthesis of Suberin and Suberin-associated Wax is Required for Maturation and Sealing Properties of Potato Periderm." *The Plant Journal* 62: 277–290.
- Shi, Jian Xin, Sergey Malitsky, Sheron De Oliveira, Caroline Branigan, Rochus B Franke, Lukas Schreiber, and Asaph Aharoni. 2011. "SHINE Transcription Factors Act Redundantly to Pattern the Archetypal Surface of Arabidopsis Flower Organs." *PLoS Genetics* 7: e1001388.
- Steudle, Ernst, and Carol A Peterson. 1998. "How Does Water Get Through Roots?" *Journal of Experimental Botany* 49: 775–788.
- Steudle, Ernst. 2002. "Aufnahme und Transport des Wassers in Pflanzen." *Nova Acta Leopoldina*: 251–278.
- Taketa, Shin, Satoko Amano, Yasuhiro Tsujino, Tomohiko Sato, Daisuke Saisho, Katsuyuki Kakeda, Mika Nomura, Toshisada Suzuki, Takashi Matsumoto, Kazuhiro Sato, Hiroyuki Kanamori, Shinji Kawasaki, and Kazuyoshi Takeda. 2008. "Barley Grain with Adhering Hulls is Controlled by an ERF Family Transcription Factor Gene Regulating a Lipid Biosynthesis Pathway." *Proceedings of the National Academy of Science* 105: 4062–4067.
- Theodoulou, Frederica L. 2000. "Plant ABC Transporters." *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 79–103.
- Ukitsu, Hiroki, Takashi Kuromori, Kiminori Toyooka, Yumi Goto, Ken Matsuoka, Eiji Sakuradani, Sakayu Shimizu, Asako Kamiya, Yuko Imura, Masahiro Yuguchi, Takuji

- Wada, Takashi Hirayama, and Kazuo Shinozaki. 2007. "Cytological and Biochemical Analysis of COF1 , an Arabidopsis Mutant of an ABC Transporter Gene." *Plant Cell Physiology* 48: 1524–1533.
- Verrier, Paul J, David Bird, Bo Burla, Elie Dassa, Cyrille Forestier, Youngsook Lee, Markus Geisler, Markus Klein, Uner Kolukisaoglu, Youngsook Lee, Enrico Martinoia, Angus Murphy, Philip A. Rea, Lacey Samuels, Burkhard Schulz, Edgar P. Spalding, Kazufumi Yazaki and Frederica L. Theodoulou. 2008. "Plant ABC Proteins – a Unified Nomenclature and Updated Inventory." *Trends in Plant Science* 13: 151–159.
- Vioque, Javier, and P E Kolattukudy. 1997. "Resolution and Purification of an Aldehyde-Generating and an Alcohol-Generating Fatty Acyl-CoA Reductase from Pea Leaves ( *Pisum Sativum* L.)." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 340: 64–72.
- Werck-Reichhart, Danièle, and René Feyereisen. 2000. "Protein Family Review Cytochromes P450: a Success Story." *Genome Biology* 1: 1–9.
- Werck-Reichhart, Danièle, Søren Bak, and Suzanne Paquette. 2002. "Cytochromes P450." *The Arabidopsis Book* 1 e0028: 1–28.
- Yeats, Trevor H, Gregory J Buda, Zhonghua Wang, Noam Chehanovsky, Leonie C Moyle, Reinhard Jetter, Arthur A Schaffer, and Jocelyn K C Rose. 2011. "The Fruit Cuticles of Wild Tomato Species Exhibit Architectural and Chemical Diversity , Providing a New Model for Studying the Evolution of Cuticle Function". *The Plant Journal* DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04820.x: 1-11.
- Yi, Bin, Fangqin Zeng, Shaolin Lei, Yunin Chen, Xueqin Yao, Yun Zhu, Jing Wen, Jinxiong Shen, Chaozhi Ma, Jinxing Tu, and Tingdong Fu. 2010. "Two Duplicate CYP704B1-homologous Genes BnMs1 and BnMs2 are Required for Pollen Exine Formation and Tapetal Development in Brassica Napus." *The Plant Journal* 63: 925–938.
- Yu, Xiao-Hong, Jin-Ying Gou, and Chang-Jun Liu. 2009. "BAHD Superfamily of Acyl-CoA Dependent Acyltransferases in Populus and Arabidopsis: Bioinformatics and Gene Expression." *Plant Molecular Biology* 70: 421–442.

## **7 Anhang**

## 7.1 Daten zur Kutikulazusammensetzung der Bncyp704b1-Linie

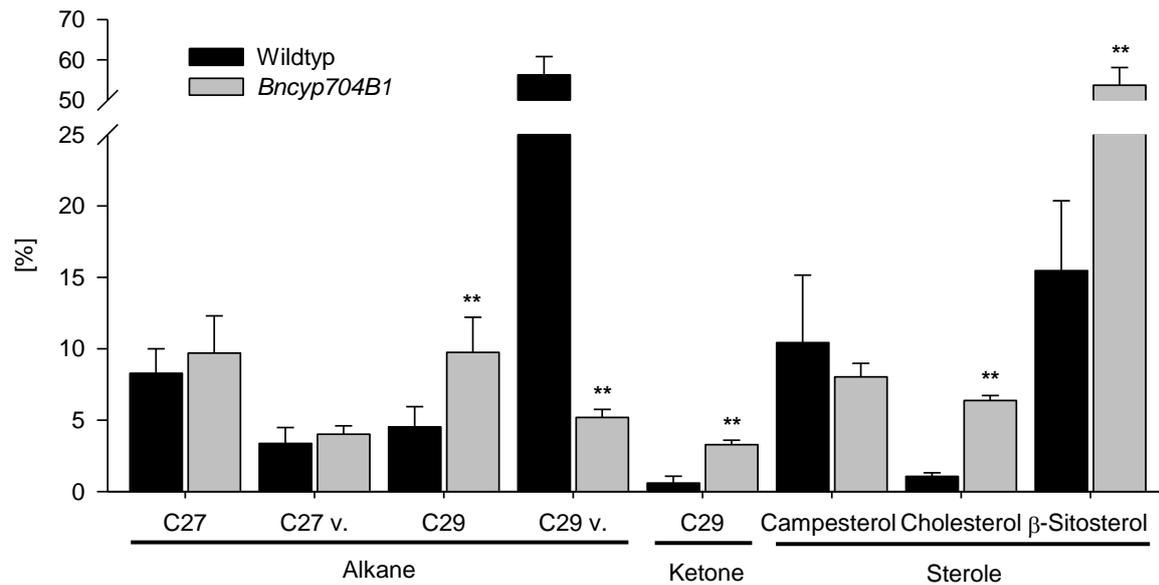


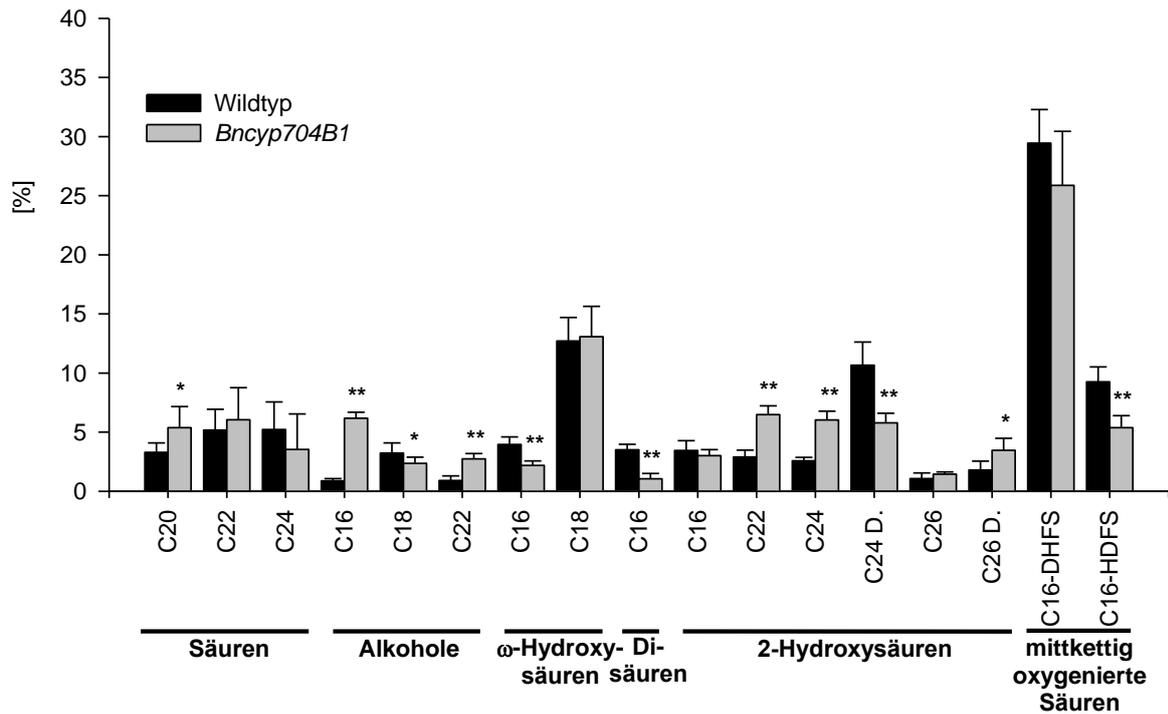
Abbildung 7-1 Relative Verteilung des Rapsantherenwachs von Bncyp704b1 und Wildtyps

Wachsbestandteile der Bncyp704b1-Mutante und korrespondierendem Wildtyp. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus sechs Parallelen mit Standardabweichung. Mittels zweiseitigem *Student's t-Test* wurde auf statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante geprüft. \*: p-Werte 0,01-0,05, \*\*: p-Werte <0,01, v.: verzweigtes Derivat

Tabelle 7-1 Gehalte des Rapsantherenwachs

Wachsgehalt der Rapsantheren von Wildtyp und Bncyp704b1-Linien. Aufgelistet sind die Mittelwerte (Mw) und Standardabweichungen (Stabw) der absoluten und relativen Einzelwerte, und die p-Werte nach einem zweiseitigen *Student's t-Test* mit ungleicher Varianz aus 6 (Wildtyp) bzw. 4 (Bncyp704B1) Parallelen. p-Werte <0,05 fette Lettern, v. - verzweigtes Derivat

Substanz	Gehalt [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]				t-Test p-Wert	Gehalt [%]				t-Test p-Wert
	Wildtyp		Bncyp704B1			Wildtyp		Bncyp704B1		
	Mw	Stabw	Mw	Stabw		Mw	Stabw	Mw	Stabw	
Alkane	3,54	0,72	0,54	0,09	<b>0,000</b>					
C <sub>27</sub>	0,41	0,12	0,18	0,04	<b>0,005</b>	8,28	1,71	9,69	2,61	0,298
C <sub>27 v.</sub>	0,16	0,06	0,08	0,01	<b>0,017</b>	3,37	1,11	4,01	0,58	0,243
C <sub>29</sub>	0,22	0,07	0,18	0,05	0,375	4,53	1,41	9,74	2,47	<b>0,002</b>
C <sub>29 v.</sub>	2,75	0,56	0,10	0,01	<b>0,000</b>	56,28	4,51	5,18	0,57	<b>0,000</b>
Ketone	0,03	0,03	0,06	0,01	0,052					
C <sub>29</sub>	0,03	0,03	0,06	0,01	0,052	0,59	0,48	3,28	0,31	<b>0,000</b>
Sterole	1,35	0,50	1,30	0,20	0,815					
Campesterol	0,55	0,29	0,15	0,03	<b>0,020</b>	10,42	4,72	8,02	0,95	0,273
Cholesterol	0,05	0,01	0,12	0,02	<b>0,000</b>	1,06	0,25	6,37	0,35	<b>0,000</b>
β-Sitosterol	0,75	0,25	1,02	0,16	0,054	15,46	4,89	53,70	4,38	<b>0,000</b>
Gesamt	4,92	1,13	1,90	0,22	<b>0,001</b>					



**Abbildung 7-2 Zusammensetzung des Antherenkutins der *Bncyp704b1*-Linie und Wildtyps**

Kutinbestandteile der *Bncyp704b1*-Linie und des Wildtyps. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus sechs Parallelen beim Wildtyp und vier Parallelen bei der Mutante mit Standardabweichung. Mittels zweiseitigem *Student's t*-Test wurde auf statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante geprüft. \*: p-Werte 0,01-0,05, \*\*: p-Werte <0,01, D.: Derivat, C<sub>16</sub>-DHFS: Dihydroxyfettsäure, C<sub>16</sub>-HDFS: Hydroxydifettsäure

**Tabelle 7-2 Gehalte des Rapsantherenkutins**

Kutingehalt der Rapsantherenkutikula von Wildtyp und *Bncyp704b1*-Linien. Aufgelistet sind die arithmetischen Mittel (Mw) und Standardabweichungen (Stabw) der absoluten und relativen Einzelwerte, und die p-Werte nach einem zweiseitigen Student's t-Test mit ungleicher Varianz aus 6 (Wildtyp) bzw. 4 (*Bncyp704B1*) Parallelen. p-Werte <0,05 in fetten Lettern. v. - verzweigtes Derivat

Substanz	Gehalt [ $\mu\text{g cm}^{-2}$ ]				t-Test p-Wert	Gehalt [%]				t-Test p-Wert
	Wildtyp		<i>Bncyp704b1</i>			Wildtyp		<i>Bncyp704b1</i>		
	Mw	Stabw	Mw	Stabw		Mw	Stabw	Mw	Stabw	
Säuren	0,38	0,10	0,22	0,13	<b>0,034</b>					
C <sub>20</sub>	0,09	0,03	0,10	0,03	0,325	3,29	0,80	5,37	1,79	<b>0,048</b>
C <sub>22</sub>	0,15	0,07	0,12	0,08	0,304	5,18	1,75	6,05	2,72	0,300
C <sub>24</sub>	0,14	0,07	0,06	0,05	<b>0,026</b>	5,21	2,34	3,54	3,00	0,193
Alkohole	0,14	0,05	0,21	0,05	<b>0,026</b>					
C <sub>16</sub>	0,02	0,01	0,12	0,03	<b>0,004</b>	0,87	0,19	6,18	0,50	<b>0,000</b>
C <sub>18</sub>	0,09	0,04	0,04	0,00	<b>0,013</b>	3,23	0,85	2,36	0,53	<b>0,040</b>
C <sub>22</sub>	0,02	0,00	0,05	0,02	<b>0,024</b>	0,90	0,39	2,73	0,45	<b>0,000</b>
$\omega$ -Hydroxy-säuren	0,46	0,11	0,29	0,07	<b>0,008</b>					
C <sub>16</sub>	0,11	0,05	0,04	0,02	<b>0,005</b>	3,96	0,63	2,19	0,38	<b>0,000</b>
C <sub>18</sub>	0,35	0,08	0,24	0,06	<b>0,024</b>	12,71	1,99	13,07	2,58	0,412
Disäuren	0,10	0,03	0,02	0,01	<b>0,001</b>					
C <sub>16</sub>	0,10	0,03	0,02	0,01	<b>0,001</b>	3,50	0,46	1,05	0,44	<b>0,000</b>
2-Hydroxy-säuren	0,62	0,16	0,49	0,07	0,053					
C <sub>16</sub>	0,10	0,03	0,06	0,01	<b>0,017</b>	3,45	0,83	3,01	0,52	0,165
C <sub>22</sub>	0,08	0,02	0,12	0,02	<b>0,008</b>	2,89	0,58	6,49	0,73	<b>0,000</b>
C <sub>24</sub>	0,07	0,01	0,11	0,02	<b>0,004</b>	2,58	0,28	6,04	0,73	<b>0,001</b>
C <sub>24 D.</sub>	0,30	0,11	0,11	0,02	<b>0,003</b>	10,66	1,96	5,78	0,81	<b>0,000</b>
C <sub>26</sub>	0,03	0,01	0,03	0,01	0,401	1,06	0,49	1,44	0,19	0,064
C <sub>26 D.</sub>	0,05	0,02	0,06	0,01	0,091	1,80	0,75	3,45	1,03	<b>0,019</b>
Mittkettig oxygenierte Säuren	1,09	0,31	0,61	0,26	<b>0,016</b>					
C <sub>16</sub> -DHFS	0,83	0,23	0,51	0,22	<b>0,032</b>	29,45	2,83	25,87	4,57	0,113
C <sub>16</sub> -HDFS	0,26	0,08	0,10	0,04	<b>0,003</b>	9,25	1,27	5,38	1,02	<b>0,000</b>
Gesamt	2,79	0,69	1,90	0,48	<b>0,021</b>					

## 7.2 Daten zu den *Sldcr*-Linien

### 7.2.1 Transpirationsmessung

**Tabelle 7-3 Leitwerte und statistische Tests zur Transpirationsstudie**

Aufgelistet sind die ermittelten Leitwerte, wie in Kapitel 2.3 beschrieben, der Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk und die Resultate des Student's t-Test auf Signifikanz im Unterschied zum Wildtyp.

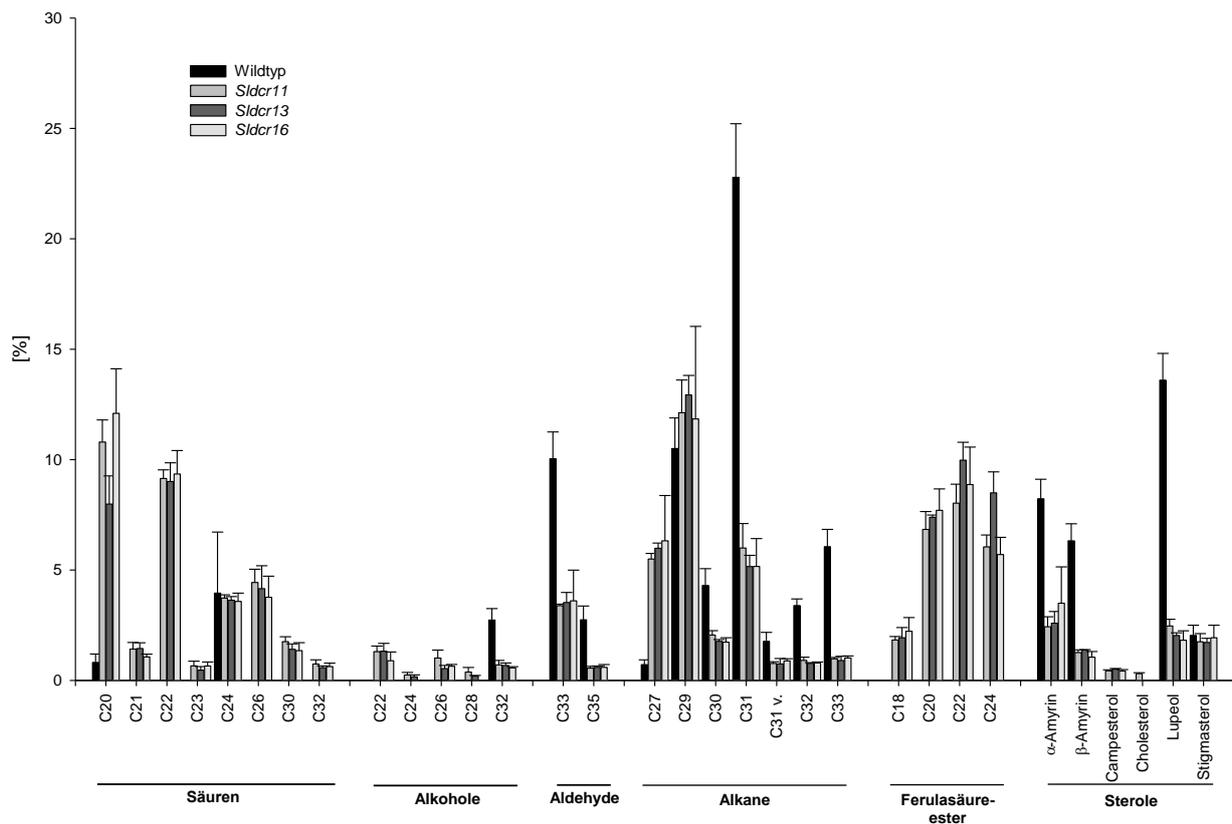
Parallele	Leitwert [m/s]			
	Wildtyp	<i>Sldcr11</i>	<i>Sldcr13</i>	<i>Sldcr16</i>
-1	4,68E-10	1,30E-09	2,06E-09	2,07E-09
-2	1,28E-09	1,30E-09	1,77E-09	
-3	5,41E-10	1,41E-09	2,41E-09	2,28E-09
-4	1,58E-09	1,07E-09	1,52E-09	2,12E-09
-5	1,08E-09	1,41E-09	1,58E-09	2,45E-09
Test auf Normalverteilung				
W-Wert	0,920	0,830	0,918	0,941
p-Wert	0,529	0,140	0,518	0,657
Mw	$9,89 \cdot 10^{-10}$	$1,30 \cdot 10^{-09}$	$1,87 \cdot 10^{-09}$	$2,23 \cdot 10^{-09}$
Stabw	$4,77 \cdot 10^{-10}$	$1,41 \cdot 10^{-10}$	$3,69 \cdot 10^{-10}$	$1,74 \cdot 10^{-10}$
Student's t-Test				
p-Wert		0,114	0,006	0,001

**Tabelle 7-4 Massenflächen der Kutikeln aus der Transpirationsstudie**

Masse pro Flächen [ $\text{mg cm}^{-2}$ ] der einzelnen Kutikeln, die zur Transpiration eingesetzt wurden und die Bestimmtheitsmaße der Regressionen aus Leitwerten (Tabelle 7-3) und Massenflächen für Wildtyp- und *Sldcr*-Linien.

Parallele Nummer	Masseflächen-Verhältnis [ $\text{mg cm}^{-2}$ ]			
	Wildtyp	<i>Sldcr11</i>	<i>Sldcr13</i>	<i>Sldcr16</i>
-1	2,1314	9,0196	5,5029	7,9145
-2	2,7999	8,1144	5,3833	
-3	2,2715	7,2715	6,2351	6,9022
-4	2,6827	6,766	6,039	8,0813
-5	2,4955	6,8564	7,6674	6,878
R <sup>2</sup>	0,8512	0,0196	0,088	0,1073

## 7.2.2 Daten zur Kutikulazusammensetzung der *Sldcr*-Linien



**Abbildung 7-3** Relative Verteilung der Wachsbestandteile der *Sldcr*-Linien und des Wildtyps

Wachsbestandteile der *Sldcr*-Linien und des Wildtyps. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus drei Parallelen beim Wildtyp und der Mutante mit Standardabweichung. Mittels zweiseitigem *Student's t*-Test wurde auf statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante geprüft. \*: p-Werte 0,01-0,05, \*\*: p-Werte <0,01, v.: verzweigtes Derivat.

**Tabelle 7-5 Absolute Gehalte der Tomatenkutikulawachse**

Aufgelistet sind die arithmetischen Mittel (Mw) und Standardabweichungen (Stabw) der absoluten Einzelwerte, in [ $\mu\text{g cm}^{-2}$ ], p-Werte nach einem zweiseitigen Student's t-Test. p-Werte <0,05 fette Letters, v. - verzweigtes Derivat

Substanz	Wildtyp		<i>Sldcr11</i>		t-Test p-Wert	Gehalt [ $\mu\text{g cm}^{-2}$ ] <i>Sldcr13</i>		t-Test p-Wert	<i>Sldcr16</i>		t-Test p-Wert
	Mw	Stabw	Mw	Stabw		Mw	Stabw		Mw	Stabw	
Säuren	0,63	0,44	11,76	0,43	<b>0,000</b>	10,32	0,50	<b>0,000</b>	11,76	1,97	<b>0,004</b>
C <sub>20</sub>	0,10	0,04	3,87	0,18	<b>0,000</b>	2,87	0,24	<b>0,001</b>	4,39	0,98	<b>0,008</b>
C <sub>21</sub>	n.d.		0,51	0,08		0,52	0,05		0,38	0,07	
C <sub>22</sub>	n.d.	0,05	3,29	0,19		3,24	0,06		3,38	0,58	
C <sub>23</sub>	n.d.		0,24	0,07		0,17	0,05		0,24	0,07	
C <sub>24</sub>	0,53	0,43	1,35	0,12	<b>0,037</b>	1,31	0,04	<b>0,044</b>	1,29	0,11	<b>0,043</b>
C <sub>26</sub>	n.d.		1,60	0,25		1,49	0,29		1,37	0,41	
C <sub>30</sub>	n.d.		0,64	0,11		0,51	0,12		0,48	0,11	
C <sub>32</sub>	n.d.		0,27	0,08		0,21	0,04		0,23	0,05	
Alkohole	0,34	0,03	1,31	0,17	<b>0,005</b>	1,04	0,01	<b>0,000</b>	0,82	0,19	<b>0,032</b>
C <sub>22</sub>	n.d.		0,47	0,10		0,47	0,09		0,32	0,15	
C <sub>24</sub>	n.d.		0,09	0,05		0,06	0,03		n.d.		
C <sub>26</sub>	n.d.		0,36	0,11		0,20	0,06		0,23	0,02	
C <sub>28</sub>	n.d.		0,14	0,08		0,07	0,01		n.d.		
C <sub>32</sub>	0,34	0,03	0,25	0,08	0,085	0,25	0,05	<b>0,037</b>	0,21	0,02	<b>0,001</b>
Aldehyde	1,62	0,20	1,42	0,09	0,111	1,50	0,30	0,299	1,50	0,46	0,355
C <sub>33</sub>	1,27	0,16	1,22	0,09	0,320	1,29	0,26	0,477	1,29	0,43	0,484
C <sub>35</sub>	0,34	0,06	0,20	0,02	<b>0,018</b>	0,21	0,04	<b>0,020</b>	0,21	0,05	<b>0,021</b>
Alkane	6,32	0,98	10,24	1,64	<b>0,017</b>	10,25	1,18	<b>0,006</b>	9,97	2,27	<b>0,046</b>
C <sub>27</sub>	0,09	0,03	1,98	0,20	<b>0,001</b>	2,16	0,11	<b>0,000</b>	2,28	0,75	<b>0,018</b>
C <sub>29</sub>	1,35	0,33	4,38	0,75	<b>0,005</b>	4,70	0,67	<b>0,002</b>	4,25	1,45	<b>0,034</b>
C <sub>30</sub>	0,55	0,16	0,74	0,11	0,089	0,64	0,06	0,227	0,62	0,04	0,265
C <sub>31</sub>	2,91	0,50	2,17	0,51	0,076	1,88	0,31	<b>0,025</b>	1,85	0,36	<b>0,023</b>
C <sub>31</sub> v.	0,22	0,05	0,28	0,02	0,089	0,27	0,07	0,204	0,32	0,02	<b>0,028</b>
C <sub>32</sub>	0,43	0,03	0,33	0,07	0,058	0,28	0,03	<b>0,001</b>	0,28	0,01	<b>0,003</b>
C <sub>33</sub>	0,76	0,01	0,35	0,04	<b>0,001</b>	0,33	0,09	<b>0,007</b>	0,37	0,04	<b>0,001</b>
Ferulasäure-ester	0,00	0,00	8,16	0,26	<b>0,000</b>	10,08	1,23	<b>0,002</b>	8,82	1,33	<b>0,004</b>
C <sub>18</sub>	n.d.		0,66	0,09		0,69	0,11		0,80	0,19	
C <sub>20</sub>	n.d.		2,45	0,16		2,67	0,21		2,77	0,31	
C <sub>22</sub>	n.d.		2,88	0,16		3,62	0,56		3,19	0,60	
C <sub>24</sub>	n.d.		2,17	0,07		3,09	0,57		2,06	0,34	
Sterole	3,83	0,35	3,11	0,24	<b>0,015</b>	2,99	0,47	<b>0,031</b>	3,19	0,83	0,144
$\alpha$ -Amyrin	1,04	0,07	0,87	0,15	0,092	0,95	0,26	0,298	1,28	0,66	0,302
$\beta$ -Amyrin	0,80	0,10	0,46	0,05	<b>0,006</b>	0,50	0,03	0,012	0,38	0,07	<b>0,003</b>
Campesterol	n.d.		0,16	0,02		0,18	0,00		0,15	0,03	
Cholesterol	n.d.		0,11	0,02		n.d.			n.d.		
Lupeol	1,73	0,19	0,89	0,15	<b>0,002</b>	0,74	0,08	<b>0,002</b>	0,65	0,12	<b>0,001</b>
Stigmasterol	0,26	0,03	0,62	0,10	<b>0,008</b>	0,63	0,11	0,012	0,70	0,25	<b>0,043</b>
Gesamt	12,8	1,54	36,00	2,04	<b>0,000</b>	36,18	2,74	<b>0,000</b>	36,05	2,03	<b>0,000</b>

**Tabelle 7-6 Relative Gehalte der Tomatenkutikulawachse**

Wachsgehalt der Tomatenfruchtkutikeln von Wildtyp und *Sldcr*-Linien. Aufgelistet sind die arithmetischen Mittel (Mw) und Standardabweichungen (Stabw) der relativen Einzelwerte, und die p-Wert nach einem zweiseitigen Student's t-Test mit ungleicher Varianz aus drei Parallelen. p-Werte <0,05 in fetten Lettern, v. - verzweigtes Derivat

Substanz	Gehalt [%]										
	Wildtyp		<i>Sldcr11</i>		t-Test	<i>Sldcr13</i>		t-Test	<i>Sldcr16</i>		t-Test
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	p-Wert	Mw	Stabw	p-Wert	Mw	Stabw	p-Wert
<b>Säuren</b>											
C <sub>20</sub>	0,82	0,37	10,80	1,00	<b>0,001</b>	7,99	1,28	<b>0,003</b>	12,10	2,02	<b>0,004</b>
C <sub>21</sub>	n.d.		1,42	0,30		1,44	0,26		1,06	0,13	
C <sub>22</sub>	n.d.		9,15	0,39	<b>0,000</b>	9,01	0,85	<b>0,000</b>	9,35	1,06	<b>0,001</b>
C <sub>23</sub>	n.d.		0,66	0,21		0,47	0,16		0,65	0,18	
C <sub>24</sub>	3,95	2,77	3,73	0,15	0,462	3,63	0,16	0,441	3,58	0,38	0,428
C <sub>26</sub>	n.d.		4,44	0,60		4,16	1,03		3,77	0,95	
C <sub>30</sub>	n.d.		1,76	0,22		1,41	0,24		1,35	0,36	
C <sub>32</sub>	n.d.		0,75	0,19		0,57	0,08		0,63	0,16	
<b>Alkohole</b>											
C <sub>22</sub>	n.d.		1,30	0,26		1,32	0,36		0,89	0,39	
C <sub>24</sub>	n.d.		0,25	0,12		0,16	0,09		n.d.		
C <sub>26</sub>	n.d.		1,01	0,36		0,53	0,14		0,64	0,08	
C <sub>28</sub>	n.d.		0,38	0,21		0,20	0,03		n.d.		
C <sub>32</sub>	2,74	0,52	0,70	0,20	<b>0,006</b>	0,68	0,11	<b>0,008</b>	0,57	0,05	<b>0,009</b>
<b>Aldehyde</b>											
C <sub>33</sub>	10,04	1,22	3,38	0,07	<b>0,005</b>	3,53	0,45	<b>0,003</b>	3,60	1,39	<b>0,002</b>
C <sub>35</sub>	2,74	0,63	0,56	0,08	<b>0,012</b>	0,59	0,06	<b>0,013</b>	0,59	0,13	<b>0,012</b>
<b>Alkane</b>											
C <sub>27</sub>	0,72	0,22	5,50	0,25	<b>0,000</b>	5,99	0,23	<b>0,000</b>	6,32	2,04	<b>0,020</b>
C <sub>29</sub>	10,50	1,39	12,12	1,48	0,103	12,93	0,88	<b>0,032</b>	11,84	4,18	0,304
C <sub>30</sub>	4,30	0,76	2,05	0,20	<b>0,016</b>	1,77	0,08	<b>0,014</b>	1,74	0,19	<b>0,012</b>
C <sub>31</sub>	22,79	2,43	6,00	1,11	<b>0,001</b>	5,16	0,51	<b>0,002</b>	5,16	1,26	<b>0,001</b>
C <sub>31</sub> D.	1,77	0,41	0,77	0,08	<b>0,024</b>	0,75	0,24	<b>0,015</b>	0,88	0,10	<b>0,029</b>
C <sub>32</sub>	3,39	0,30	0,91	0,15	<b>0,001</b>	0,77	0,04	<b>0,002</b>	0,79	0,05	<b>0,002</b>
C <sub>33</sub>	6,06	0,78	0,98	0,06	<b>0,004</b>	0,90	0,19	<b>0,002</b>	1,02	0,09	<b>0,003</b>
<b>FSE</b>											
C <sub>18</sub>	n.d.		1,83	0,16		1,93	0,46		2,23	0,62	
C <sub>20</sub>	n.d.		6,84	0,81		7,39	0,10		7,70	0,97	
C <sub>22</sub>	n.d.		8,03	0,86		9,97	0,81		8,87	1,70	
C <sub>24</sub>	n.d.		6,05	0,54		8,50	0,95		5,70	0,78	
<b>Sterole</b>											
α-Amyrin	8,23	0,88	2,43	0,45	<b>0,001</b>	2,59	0,53	<b>0,001</b>	3,50	1,65	<b>0,012</b>
β-Amyrin	6,32	0,77	1,26	0,12	<b>0,003</b>	1,38	0,01	<b>0,004</b>	1,06	0,25	<b>0,002</b>
Campesterol	n.d.		0,43	0,04		0,51	0,03		0,43	0,06	
Cholesterol	n.d.		0,31	0,04		n.d.			n.d.		
Lupeol	13,60	1,21	2,47	0,30	<b>0,001</b>	2,04	0,12	<b>0,002</b>	1,82	0,43	<b>0,001</b>
Stigmasterol	2,04	0,46	1,75	0,37	0,243	1,72	0,19	0,196	1,93	0,57	0,431

**Tabelle 7-7 Absolute Gehalte des Tomatenfruchtkutins**

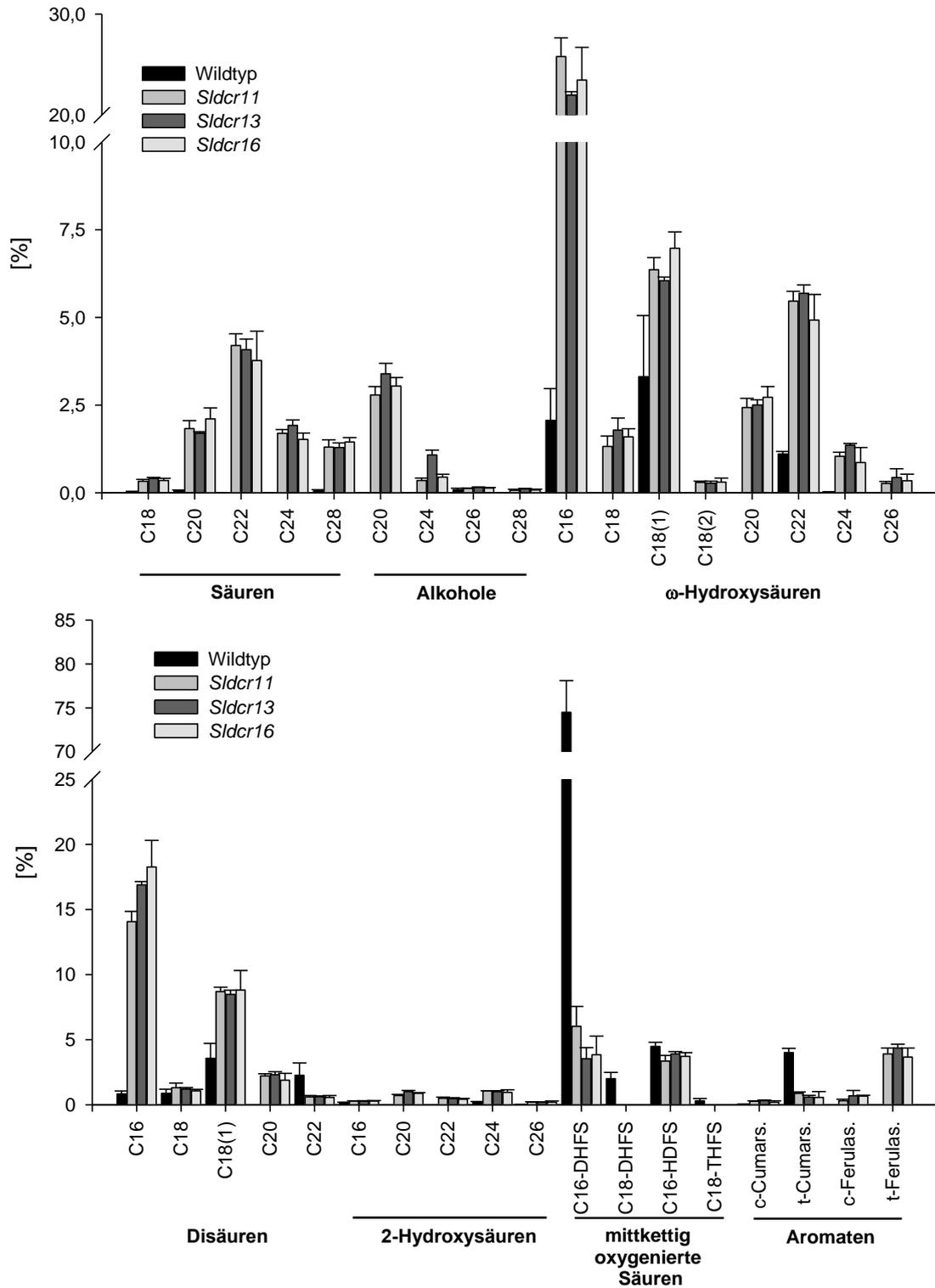
Kutingehalt der Tomatenfruchtkutikeln von Wildtyp und *Sldcr*-Linien. Aufgelistet sind die arithmetischen Mittel (Mw) und Standardabweichungen (Stabw) der absoluten Einzelwerte, und die p-Werte nach einem zweiseitigen Student's t-Test mit ungleicher Varianz aus drei Parallelen. p-Werte <0,05 in fetten Lettern, v. - verzweigtes Derivat

Substanz	Wildtyp		<i>Sldcr11</i>		Gehalt [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]						
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	t-Test p-Wert	<i>Sldcr13</i>		t-Test p-Wert	<i>Sldcr16</i>		t-Test p-Wert
						Mw	Stabw		Mw	Stabw	
<b>Säuren</b>	0,54	0,08	50,15	3,43	<b>0,001</b>	51,14	0,75	<b>0,000</b>	45,19	9,23	<b>0,007</b>
C <sub>18</sub>	0,15	0,06	2,03	0,38	<b>0,006</b>	2,57	0,18	<b>0,000</b>	2,02	0,39	<b>0,006</b>
C <sub>20</sub>	0,39	0,03	11,37	0,82	<b>0,001</b>	10,72	0,33	<b>0,000</b>	12,29	2,33	<b>0,006</b>
C <sub>22</sub>			26,13	1,02		25,73	0,75		22,01	5,39	
C <sub>24</sub>			10,63	1,61		12,12	0,33		8,87	1,25	
<b>Alkohole</b>	0,77	0,31	29,09	5,21	<b>0,005</b>	38,00	2,57	<b>0,001</b>	30,02	3,46	<b>0,002</b>
C <sub>18</sub>	0,30	0,12	8,18	1,85	<b>0,009</b>	8,11	0,42	<b>0,000</b>	8,45	1,09	<b>0,003</b>
C <sub>20</sub>			17,49	2,74		21,45	2,22		17,76	2,28	
C <sub>24</sub>			2,21	0,66		6,77	0,65		2,59	0,46	
C <sub>26</sub>	0,48	0,24	0,78	0,11	0,076	0,96	0,13	<b>0,027</b>	0,78	0,13	0,074
C <sub>28</sub>			0,43	0,16		0,70	0,06		0,45	0,15	
<b><math>\omega</math>-Hydroxy-säuren</b>	36,00	8,03	268,87	30,37	<b>0,002</b>	253,34	16,13	<b>0,000</b>	239,66	11,09	<b>0,000</b>
C <sub>16</sub>	12,06	7,33	161,44	21,86	<b>0,002</b>	138,96	8,33	<b>0,000</b>	136,24	15,96	<b>0,001</b>
C <sub>18</sub>			8,31	2,31		11,36	2,60		9,33	1,80	
C <sub>18:1</sub>	17,66	7,09	39,66	2,46	<b>0,012</b>	38,24	2,39	<b>0,014</b>	40,65	4,36	<b>0,007</b>
C <sub>18:2</sub>			1,84	0,10		1,70	0,31		1,75	0,58	
C <sub>20</sub>			15,24	2,57		15,82	1,24		15,90	2,58	
C <sub>22</sub>	6,15	0,62	34,23	4,24	<b>0,003</b>	35,93	1,60	<b>0,000</b>	28,76	5,43	<b>0,009</b>
C <sub>24</sub>	0,15	0,02	6,53	1,38	<b>0,008</b>	8,55	0,15	<b>0,000</b>	5,05	2,62	<b>0,042</b>
C <sub>26</sub>			1,62	0,22		2,78	1,68		1,99	1,11	
<b>Disäuren</b>	41,77	7,04	168,05	17,38	<b>0,001</b>	186,60	13,47	<b>0,000</b>	178,09	9,03	<b>0,000</b>
C <sub>16</sub>	4,83	2,15	87,88	9,05	<b>0,001</b>	106,82	6,49	<b>0,000</b>	105,99	6,83	<b>0,000</b>
C <sub>18</sub>	4,84	1,54	8,05	1,55	<b>0,032</b>	7,65	0,98	<b>0,033</b>	6,18	0,41	0,134
C <sub>18:1</sub>	19,39	3,70	54,38	6,03	<b>0,001</b>	53,64	4,66	<b>0,000</b>	51,51	11,25	<b>0,014</b>
C <sub>20</sub>			13,93	2,54		14,62	2,09		11,09	3,52	
C <sub>22</sub>	12,70	5,52	3,82	1,04	0,052	3,87	0,22	0,054	3,32	0,99	<b>0,047</b>
<b>2-Hydroxy-säuren</b>	2,14	0,16	17,42	2,81	<b>0,005</b>	18,62	0,47	<b>0,000</b>	15,96	2,89	<b>0,007</b>
C <sub>16</sub>	0,93	0,07	1,81	0,19	<b>0,004</b>	1,75	0,11	<b>0,000</b>	1,68	0,15	<b>0,003</b>
C <sub>20</sub>			4,49	0,95		6,43	0,25		5,12	0,45	
C <sub>22</sub>			3,14	0,88		2,91	0,43		2,47	0,50	
C <sub>24</sub>	1,08	0,21	6,71	0,72	<b>0,002</b>	6,30	0,16	<b>0,000</b>	5,55	1,35	<b>0,013</b>
C <sub>26</sub>	0,14	0,02	1,28	0,13	<b>0,002</b>	1,23	0,18	<b>0,004</b>	1,14	0,55	<b>0,044</b>

Tabelle wird auf der nächsten Seite fortgesetzt.

Fortsetzung Tabelle 7-7

Substanz	Wildtyp		Gehalt [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]								
	Mw	Stabw	<i>Sldcr11</i>		t-Test	<i>Sldcr13</i>		t-Test	<i>Sldcr16</i>		t-Test
			Mw	Stabw	p-Wert	Mw	Stabw	p-Wert	Mw	Stabw	p-Wert
Mittkettig oxygenierte Säuren	456,41	87,55	59,30	15,40	<b>0,007</b>	47,03	4,79	<b>0,007</b>	43,92	9,36	<b>0,007</b>
C <sub>16</sub> -DHFS	418,15	78,52	38,19	13,38	<b>0,006</b>	22,31	5,40	<b>0,006</b>	22,28	8,08	<b>0,006</b>
C <sub>18</sub> -DHFS	11,49	4,66									
C <sub>16</sub> -HDFS	25,01	3,76	21,10	4,25	0,150	24,72	1,99	0,457	21,64	2,46	0,137
C <sub>18</sub> -THFS	1,77	1,39									
Aromaten	22,62	3,35	33,44	2,59	<b>0,007</b>	37,59	3,33	<b>0,003</b>	29,46	1,21	<b>0,029</b>
c-Cumar- säure	0,26	0,00	1,65	0,10	<b>0,001</b>	2,02	0,30	<b>0,005</b>	1,12	0,66	0,077
t-Cuma- säure	22,36	3,35	5,51	1,00	<b>0,004</b>	3,71	0,89	<b>0,004</b>	3,22	2,60	<b>0,001</b>
c-Ferula- säure			2,02	0,95		4,27	2,42		3,86	0,47	
t-Ferula- säure			24,26	2,09		27,58	3,20		21,25	3,76	
Gesamt	560,25	94,25	626,32	72,49	0,197	632,31	32,52	0,158	582,30	28,54	0,365



**Abbildung 7-4 Relative Verteilung der Kutinbestandteile der Sldcr-Linien und des Wildtyps**

Kutinbestandteile der *Sldcr*-Linien und des Wildtyps. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus drei Parallelen beim Wildtyp und der Mutante mit Standardabweichung. Mittels zweiseitigem *Student's t*-Test wurde auf statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante geprüft. \*: p-Werte 0,01-0,05, \*\*: p-Werte <0,01.

**Tabelle 7-8 Relative Gehalte des Tomatenfruchtkutins**

Kutingehalt der Tomatenfruchtkutikeln von Wildtyp und *Sldcr*-Linien. Aufgelistet sind die arithmetischen Mittel (Mw) und Standardabweichungen (Stabw) der relativen Einzelwerte, und die p-Werte nach einem zweiseitigen Student's t-Test mit ungleicher Varianz aus drei Parallelen. p-Werte <0,05 in fetten Lettern, v. - verzweigtes Derivat

Substanz	Wildtyp		<i>Sldcr11</i>		t-Test p-Wert	<i>Sldcr13</i>		t-Test p-Wert	<i>Sldcr16</i>		t-Test p-Wert
	Mw	Stabw	Mw	Stabw		Mw	Stabw		Mw	Stabw	
<b>Säuren</b>											
C <sub>18</sub>	0,03	0,01	0,32	0,05	<b>0,004</b>	0,41	0,03	<b>0,000</b>	0,35	0,06	<b>0,005</b>
C <sub>20</sub>	0,07	0,01	1,83	0,22	<b>0,003</b>	1,70	0,04	<b>0,000</b>	2,10	0,31	<b>0,004</b>
C <sub>22</sub>	0,00	0,00	4,20	0,34	<b>0,001</b>	4,08	0,30	<b>0,001</b>	3,77	0,84	<b>0,008</b>
C <sub>24</sub>	0,00	0,00	1,69	0,11	<b>0,001</b>	1,92	0,15	<b>0,001</b>	1,52	0,18	<b>0,002</b>
<b>Alkohole</b>											
C <sub>18</sub>	0,06	0,03	1,30	0,21	<b>0,004</b>	1,29	0,13	<b>0,001</b>	1,45	0,12	<b>0,001</b>
C <sub>20</sub>	0,00	0,00	2,79	0,24	<b>0,001</b>	3,39	0,30	<b>0,001</b>	3,04	0,24	<b>0,001</b>
C <sub>24</sub>	0,00	0,00	0,35	0,07	<b>0,007</b>	1,08	0,14	<b>0,003</b>	0,44	0,08	<b>0,005</b>
C <sub>26</sub>	0,08	0,04	0,12	0,01	0,127	0,15	0,01	0,052	0,13	0,02	0,089
C <sub>28</sub>	0,00	0,00	0,07	0,03	<b>0,026</b>	0,11	0,01	<b>0,001</b>	0,08	0,03	<b>0,019</b>
<b>ω-Hydroxy-säuren</b>											
C <sub>16</sub>	2,06	0,91	25,8	1,85	<b>0,000</b>	22,0	0,33	<b>0,000</b>	23,5	3,24	<b>0,002</b>
C <sub>18</sub>	0,00	0,00	1,32	0,30	<b>0,008</b>	1,79	0,34	<b>0,006</b>	1,59	0,23	<b>0,003</b>
C <sub>18:1</sub>	3,31	1,75	6,36	0,35	<b>0,044</b>	6,05	0,11	0,056	6,97	0,46	<b>0,030</b>
C <sub>18:2</sub>	0,00	0,00	0,30	0,04	<b>0,002</b>	0,27	0,06	<b>0,008</b>	0,30	0,11	<b>0,022</b>
C <sub>20</sub>	0,00	0,00	2,43	0,26	<b>0,002</b>	2,50	0,15	<b>0,001</b>	2,72	0,31	<b>0,002</b>
C <sub>22</sub>	1,10	0,07	5,47	0,27	<b>0,000</b>	5,69	0,24	<b>0,000</b>	4,92	0,73	<b>0,006</b>
C <sub>24</sub>	0,03	0,00	1,04	0,12	<b>0,002</b>	1,35	0,05	<b>0,000</b>	0,86	0,43	<b>0,039</b>
C <sub>26</sub>	0,00	0,00	0,26	0,06	<b>0,008</b>	0,44	0,25	<b>0,047</b>	0,34	0,19	<b>0,044</b>
<b>Disäuren</b>											
C <sub>16</sub>	0,84	0,22	14,1	0,79	<b>0,000</b>	16,9	0,25	<b>0,000</b>	18,3	2,03	<b>0,002</b>
C <sub>18</sub>	0,88	0,31	1,31	0,36	0,099	1,21	0,12	0,102	1,06	0,12	0,209
C <sub>18:1</sub>	3,57	1,14	8,69	0,34	<b>0,005</b>	8,47	0,32	<b>0,006</b>	8,80	1,50	<b>0,005</b>
C <sub>20</sub>	0,00	0,00	2,21	0,17	<b>0,001</b>	2,31	0,23	<b>0,002</b>	1,89	0,52	<b>0,012</b>
C <sub>22</sub>	2,26	0,95	0,60	0,10	<b>0,046</b>	0,61	0,06	<b>0,047</b>	0,57	0,14	<b>0,044</b>
<b>2-Hydroxy-säuren</b>											
C <sub>16</sub>	0,17	0,03	0,29	0,01	<b>0,007</b>	0,28	0,03	<b>0,006</b>	0,29	0,03	<b>0,005</b>
C <sub>20</sub>	0,00	0,00	0,71	0,08	<b>0,002</b>	1,02	0,08	<b>0,001</b>	0,88	0,05	<b>0,000</b>
C <sub>22</sub>	0,00	0,00	0,49	0,09	<b>0,006</b>	0,46	0,08	<b>0,005</b>	0,42	0,07	<b>0,004</b>
C <sub>24</sub>	0,20	0,05	1,07	0,01	<b>0,000</b>	1,00	0,08	<b>0,000</b>	0,95	0,20	<b>0,009</b>
C <sub>26</sub>	0,02	0,01	0,21	0,02	<b>0,000</b>	0,19	0,02	<b>0,001</b>	0,19	0,09	<b>0,042</b>

Tabelle wird auf der nächsten Seite fortgesetzt.

Fortsetzung Tabelle 7-8

Substanz	Gehalt [%]										
	Wildtyp		<i>Sldcr11</i>		t-Test	<i>Sldcr13</i>		t-Test	<i>Sldcr16</i>		t-Test
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	p-Wert	Mw	Stabw	p-Wert	Mw	Stabw	p-Wert
Mittkettig oxygenierte Säuren											
C <sub>16</sub> -DHFS	74,5	3,61	6,02	1,52	<b>0,000</b>	3,53	0,85	<b>0,000</b>	3,84	1,44	<b>0,000</b>
C <sub>18</sub> -DHFS	2,00	0,48	0,00	0,00	<b>0,009</b>	0,00	0,00	<b>0,009</b>	0,00	0,00	<b>0,009</b>
Aromaten											
c-Cumar- säure	0,05	0,01	0,27	0,04	<b>0,004</b>	0,32	0,04	<b>0,003</b>	0,19	0,11	0,078
t-Cumar- säure	4,01	0,32	0,88	0,10	<b>0,001</b>	0,59	0,13	<b>0,000</b>	0,56	0,46	<b>0,000</b>
c-Ferula- säure			0,31	0,11		0,69	0,41		0,66	0,07	
t-Ferula- säure			3,90	0,45		4,35	0,29		3,66	0,70	

### 7.3 Daten zur Kutikulazusammensetzung der ABCG11-Linien

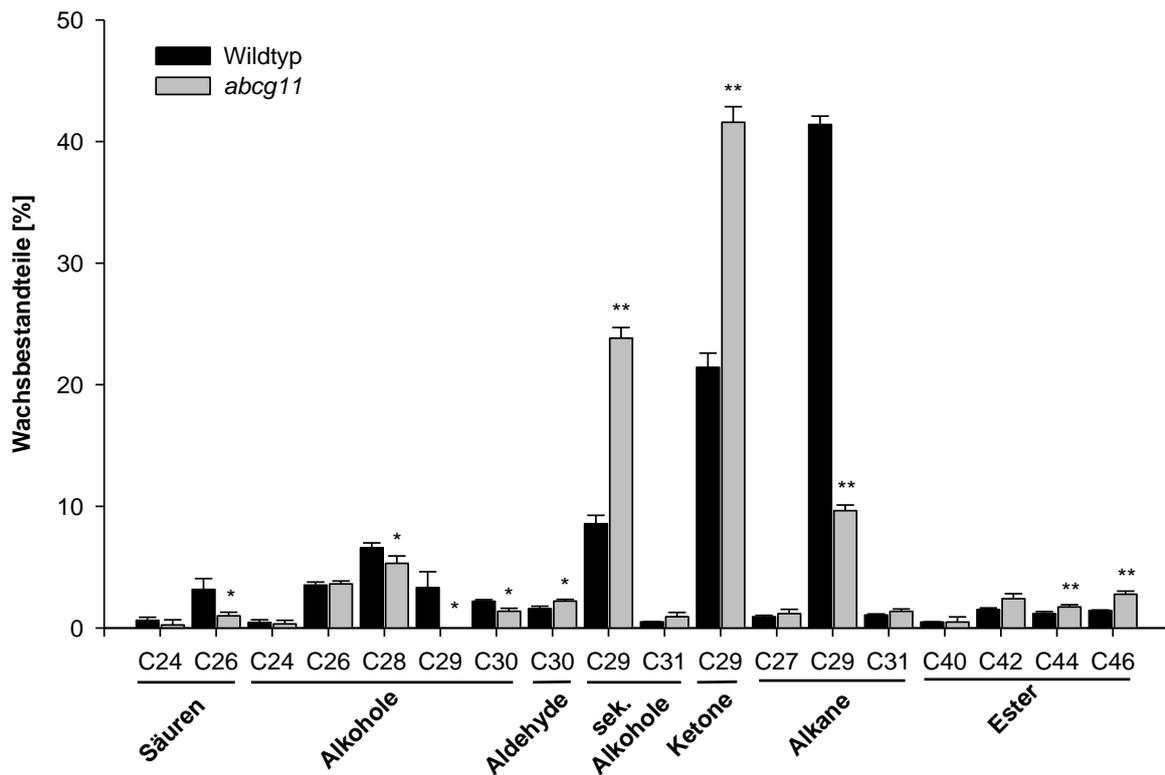


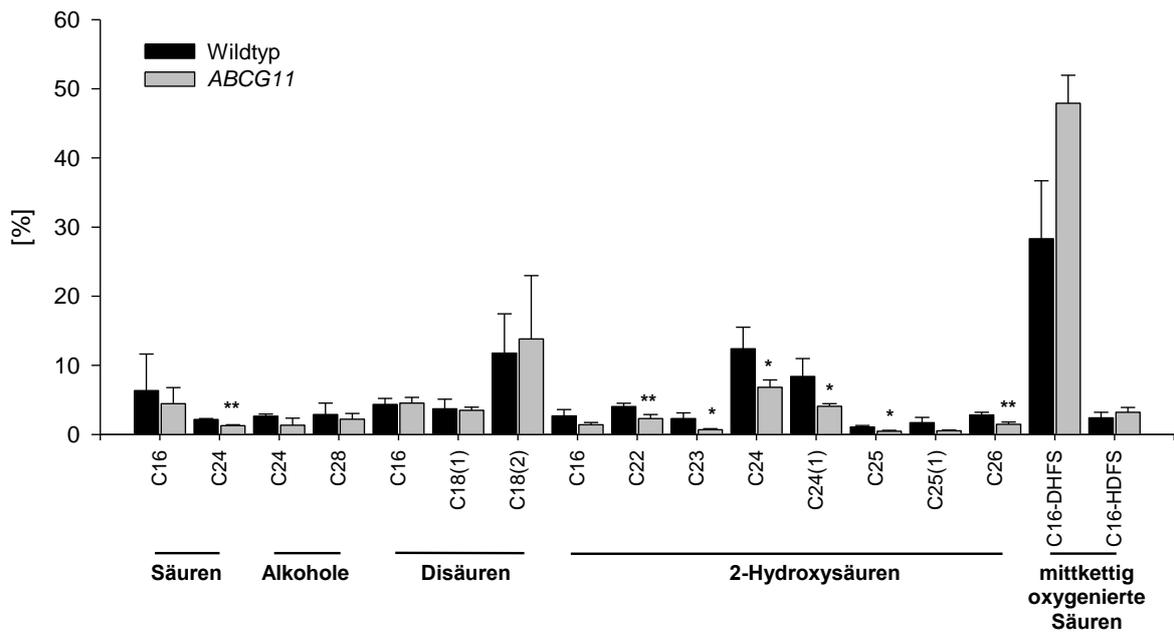
Abbildung 7-5 Relative Verteilung der Wachsbestandteile der abcg11-Linie und des Wildtyps

Wachsbestandteile der *abcg11*-Linien und des Wildtyps. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus drei Parallelen beim Wildtyp und der Mutante mit Standardabweichung. Mittels zweiseitigem *Student's t*-Test wurde auf statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante geprüft. \*: p-Werte 0,01-0,05, \*\*: p-Werte <0,01, v.: verzweigtes Derivat.

**Tabelle 7-9 Absolute und relative Gehalte der Sprossachsenwachse**

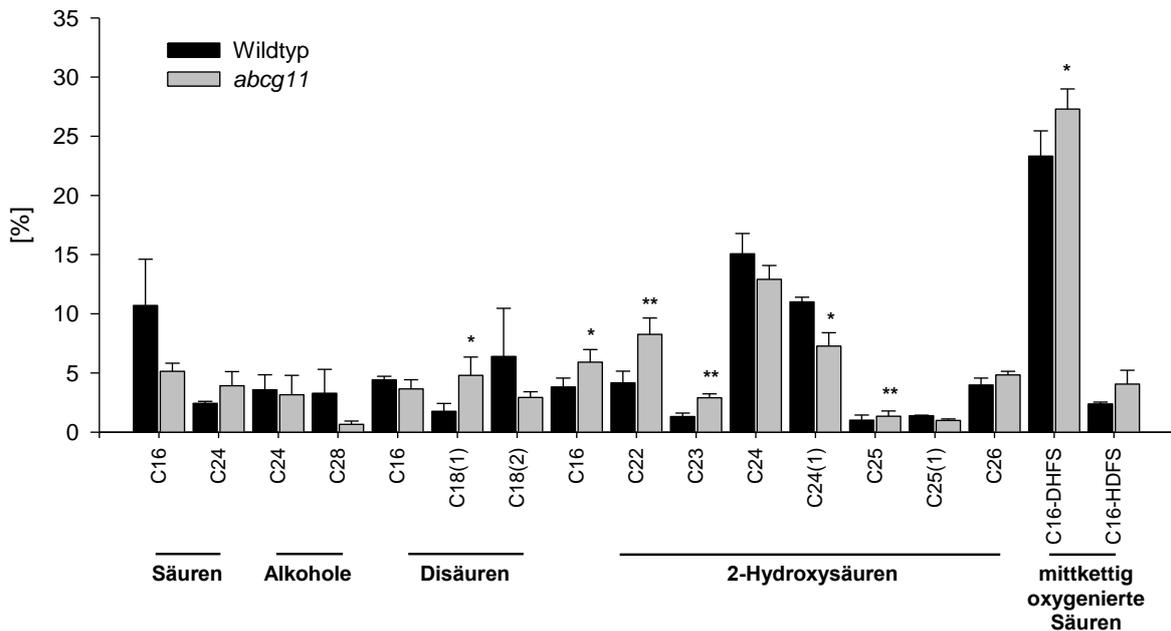
Wachsgehalt der Sprossachse von Wildtyp und *abcg11*-Linie. Aufgelistet sind die arithmetischen Mittel (Mw) und Standardabweichungen (Stabw) der absoluten und relativen Werte und die p-Werte nach einem zweiseitigen Student's t-Test mit ungleicher Varianz aus drei Parallelen. p-Werte <0,05 in fetten Lettern, v. - verzweigtes Derivat.

Wachsmonomer	Gehalt [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]				t-Test p-Wert	Gehalt [%]				t-Test p-Wert
	Wildtyp		<i>abcg11</i>			Wildtyp		<i>abcg11</i>		
	Mw	Stabw	Mw	Stabw		Mw	Stabw	Mw	Stabw	
Säuren	0.79	0.13	0.09	0.06	<b>0.003</b>					
C <sub>24</sub>	0.13	0.04	0.02	0.03	<b>0.010</b>	0.63	0.25	0.25	0.43	0.132
C <sub>26</sub>	0.66	0.09	0.08	0.03	<b>0.002</b>	3.18	0.88	1.00	0.30	<b>0.020</b>
Alkohole	3.42	0.32	0.78	0.10	<b>0.001</b>					
C <sub>24</sub>	0.09	0.03	0.03	0.02	<b>0.022</b>	0.45	0.21	0.34	0.29	0.307
C <sub>26</sub>	0.76	0.15	0.26	0.03	<b>0.013</b>	3.52	0.26	3.62	0.24	0.322
C <sub>28</sub>	1.42	0.26	0.39	0.05	<b>0.009</b>	6.60	0.40	5.32	0.60	<b>0.022</b>
C <sub>29</sub>	0.68	0.17	0.00	0.00	<b>0.010</b>	3.32	1.31	0.00	0.00	<b>0.024</b>
C <sub>30</sub>	0.47	0.08	0.10	0.02	<b>0.006</b>	2.19	0.14	1.37	0.24	<b>0.006</b>
Aldehyde	0.34	0.01	0.16	0.02	<b>0.002</b>					
C <sub>30</sub>	0.34	0.01	0.16	0.02	<b>0.002</b>	1.59	0.20	2.21	0.13	<b>0.007</b>
sekundäre Alkohole	1.95	0.37	1.81	0.18	0.298					
C <sub>29</sub>	1.84	0.35	1.74	0.19	0.350	8.58	0.69	23.82	0.88	<b>0.000</b>
C <sub>31</sub>	0.11	0.02	0.07	0.01	<b>0.016</b>	0.50	0.02	0.93	0.34	0.083
Ketone	4.60	0.81	3.06	0.48	<b>0.030</b>					
C <sub>29</sub>	4.60	0.81	3.06	0.48	<b>0.030</b>	21.43	1.17	41.58	1.30	<b>0.000</b>
Alkane	9.28	1.31	0.89	0.07	<b>0.004</b>					
C <sub>27</sub>	0.20	0.01	0.08	0.01	<b>0.000</b>	0.93	0.11	1.18	0.35	0.173
C <sub>29</sub>	8.86	1.29	0.71	0.09	<b>0.004</b>	41.40	0.69	9.65	0.47	<b>0.000</b>
C <sub>31</sub>	0.22	0.02	0.10	0.01	<b>0.001</b>	1.06	0.10	1.36	0.21	0.056
Ester	0.99	0.13	0.54	0.10	<b>0.005</b>					
C <sub>40</sub>	0.11	0.01	0.04	0.03	<b>0.030</b>	0.49	0.01	0.49	0.42	0.490
C <sub>42</sub>	0.32	0.06	0.18	0.04	<b>0.013</b>	1.51	0.13	2.40	0.41	<b>0.026</b>
C <sub>44</sub>	0.25	0.05	0.13	0.02	<b>0.013</b>	1.18	0.18	1.73	0.18	<b>0.010</b>
C <sub>46</sub>	0.31	0.04	0.20	0.01	<b>0.015</b>	1.43	0.04	2.77	0.27	<b>0.006</b>
Gesamt	21.36	2.78	7.33	0.95	<b>0.004</b>					



**Abbildung 7-7** Relative Verteilung des Sprossachsenkutins der *abcg11*-Knockdownlinie und des Wildtyps

Kutinbestandteile der Mutante und des Wildtyps. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus drei Parallelen beim Wildtyp und der Mutante mit Standardabweichung. Mittels zweiseitigem *Student's t*-Test wurde auf statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante geprüft. \*: p-Werte 0,01-0,05, \*\*: p-Werte <0,01.



**Abbildung 7-6** Relative Verteilung des Sprossachsenkutins der *ABCG11*-Überexpressionslinie und des Wildtyps

Kutinbestandteile der Mutante und des Wildtyps. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus drei Parallelen beim Wildtyp und der Mutante mit Standardabweichung. Mittels zweiseitigem *Student's t*-Test wurde auf statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante geprüft. \*: p-Werte 0,01-0,05, \*\*: p-Werte <0,01.

**Tabelle 7-10 Gehalte des Sprossachsenkutins der *abcg11*-Knockdownlinie**

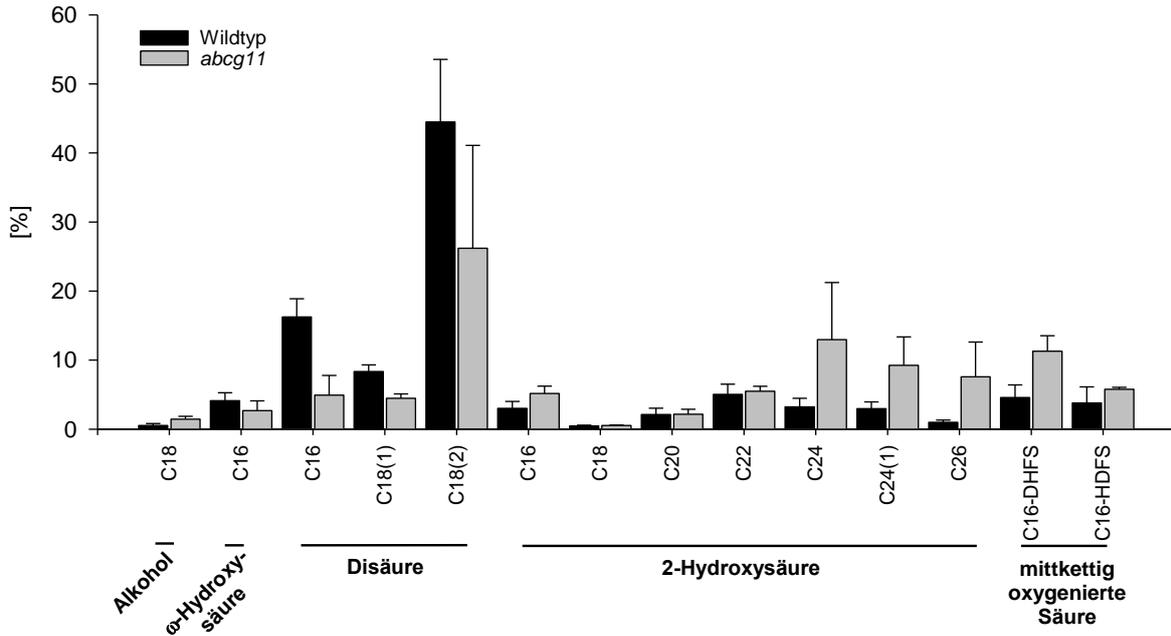
Aufgelistet sind die arithmetischen Mittel (Mw) und Standardabweichungen (Stabw) der absoluten und relativen Werte und die p-Werte nach einem zweiseitigen Student's t-Test mit ungleicher Varianz aus drei Parallelen. p-Werte <0,05 in fetten Lettern

Kutinmonomer	Gehalt [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]				t-Test p-Wert	Gehalt [%]				t-Test p-Wert
	Wildtyp		<i>abcg11</i>			Wildtyp		<i>abcg11</i>		
	Mw	Stabw	Mw	Stabw		Mw	Stabw	Mw	Stabw	
Säuren	0,11	0,06	0,11	0,08	0,494					
C <sub>16</sub>	0,09	0,06	0,07	0,05	0,286	10,70	3,91	5,13	0,69	0,064
C <sub>24</sub>	0,02	0,00	0,05	0,03	0,116	2,43	0,17	3,91	1,20	0,082
Alkohole	0,05	0,01	0,04	0,01	0,115					
C <sub>24</sub>	0,03	0,01	0,03	0,00	0,276	3,57	1,27	3,16	1,64	0,376
C <sub>28</sub>	0,02	0,01	0,01	0,00	0,062	3,28	2,02	0,65	0,28	0,075
Disäuren	0,10	0,02	0,16	0,14	0,268					
C <sub>16</sub>	0,04	0,01	0,05	0,05	0,317	4,41	0,31	3,65	0,77	0,112
C <sub>18:1</sub>	0,02	0,01	0,07	0,06	0,125	1,76	0,66	4,79	1,55	<b>0,030</b>
C <sub>18:2</sub>	0,05	0,02	0,04	0,03	0,325	6,39	4,06	2,92	0,48	0,138
2-Hydroxy-säuren	0,35	0,13	0,61	0,51	0,236					
C <sub>16</sub>	0,03	0,02	0,09	0,08	0,189	3,82	0,75	5,91	1,08	<b>0,029</b>
C <sub>22</sub>	0,03	0,01	0,10	0,07	0,106	4,16	0,99	8,26	1,38	<b>0,008</b>
C <sub>23</sub>	0,01	0,00	0,04	0,02	0,106	1,31	0,29	2,90	0,33	<b>0,002</b>
C <sub>24</sub>	0,13	0,05	0,18	0,16	0,309	15,07	1,71	12,91	1,16	0,077
C <sub>24:1</sub>	0,09	0,03	0,11	0,10	0,413	11,01	0,39	7,27	1,13	<b>0,010</b>
C <sub>25</sub>	0,01	0,01	0,02	0,01	0,194	1,01	0,43	1,34	0,44	0,204
C <sub>25:1</sub>	0,01	0,00	0,01	0,01	0,395	1,38	0,05	0,99	0,12	<b>0,009</b>
C <sub>26</sub>	0,03	0,01	0,07	0,06	0,211	3,98	0,59	4,83	0,30	0,056
Mittkettig oxygenierte Säuren	0,21	0,04	0,42	0,34	0,195					
C <sub>16</sub> -DHFS	0,19	0,03	0,36	0,28	0,201	23,32	2,13	27,30	1,71	<b>0,034</b>
C <sub>16</sub> -HDFS	0,02	0,01	0,06	0,06	0,169	2,39	0,15	4,06	1,17	0,064
Gesamt	0,82	0,23	1,34	1,07	0,245					

**Tabelle 7-11 Gehalte des Sprossachsenkutins der ABCG11-Überexpressionslinie**

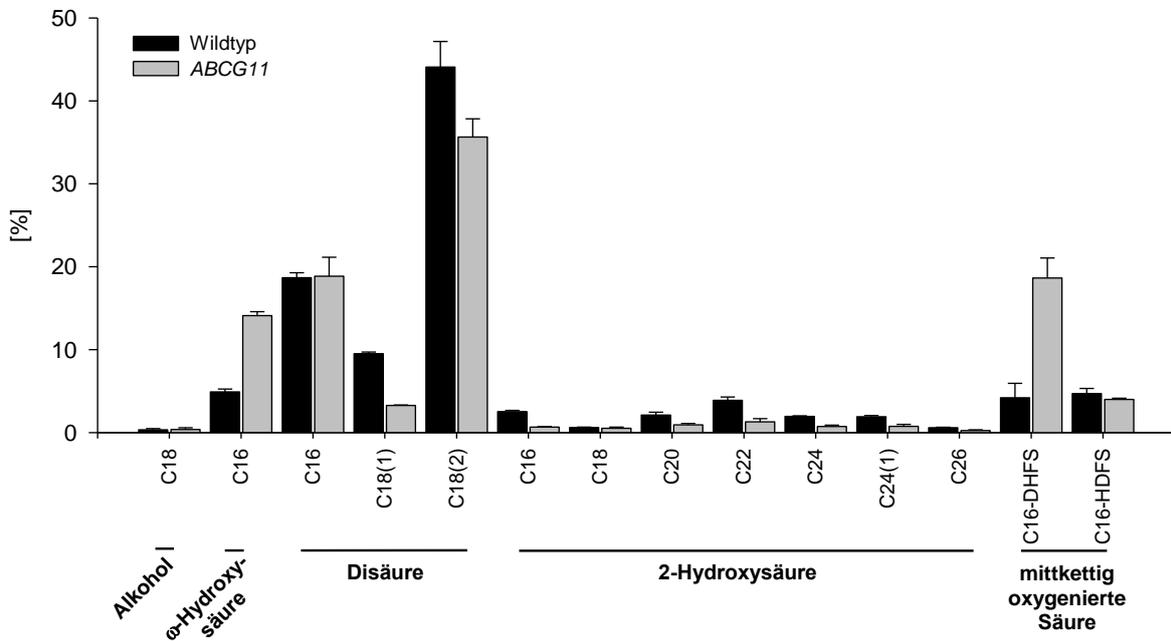
Aufgelistet sind die arithmetischen Mittel (Mw) und Standardabweichungen (Stabw) der absoluten und relativen Werte, und die p-Werte nach einem zweiseitigen Student's t-Test mit ungleicher Varianz aus drei Parallelen. p-Werte <0,05 in fetten Lettern,

Kutin- monomer	Gehalt [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]					Gehalt [%]				
	Wildtyp		ABCG11-OE		t-Test p-Wert	Wildtyp		ABCG11-OE		t-Test p-Wert
	Mw	Stabw	Mw	Stabw		Mw	Stabw	Mw	Stabw	
Säuren	0,09	0,05	0,09	0,02	0,431					
C <sub>16</sub>	0,06	0,05	0,07	0,03	0,405	6,34	5,30	4,45	2,34	0,307
C <sub>24</sub>	0,02	0,01	0,02	0,00	0,365	2,17	0,14	1,26	0,13	<b>0,001</b>
Alkohole	0,06	0,02	0,06	0,02	0,453					
C <sub>24</sub>	0,03	0,01	0,02	0,01	0,233	2,65	0,29	1,34	1,03	0,075
C <sub>28</sub>	0,03	0,02	0,04	0,01	0,323	2,88	1,66	2,21	0,83	0,288
Disäuren	0,22	0,11	0,38	0,18	0,140					
C <sub>16</sub>	0,04	0,01	0,07	0,00	<b>0,011</b>	4,33	0,88	4,54	0,83	0,391
C <sub>18:1</sub>	0,04	0,01	0,06	0,01	0,062	3,71	1,40	3,50	0,46	0,412
C <sub>18:2</sub>	0,14	0,10	0,25	0,17	0,207	11,76	5,69	13,82	9,15	0,380
2-Hydroxy- säuren	0,36	0,08	0,29	0,04	0,131					
C <sub>16</sub>	0,03	0,00	0,02	0,00	0,068	2,69	0,91	1,40	0,33	0,060
C <sub>22</sub>	0,04	0,01	0,04	0,00	0,283	4,04	0,47	2,30	0,58	<b>0,008</b>
C <sub>23</sub>	0,02	0,01	0,01	0,00	0,114	2,30	0,82	0,68	0,16	<b>0,035</b>
C <sub>24</sub>	0,12	0,02	0,11	0,02	0,240	12,39	3,11	6,82	1,07	<b>0,039</b>
C <sub>24:1</sub>	0,08	0,01	0,07	0,01	0,083	8,40	2,59	4,09	0,37	<b>0,049</b>
C <sub>25</sub>	0,01	0,01	0,01	0,00	0,178	1,07	0,23	0,46	0,13	<b>0,012</b>
C <sub>25:1</sub>	0,02	0,01	0,01	0,00	0,065	1,72	0,74	0,53	0,12	0,053
C <sub>26</sub>	0,03	0,01	0,02	0,00	0,193	2,82	0,40	1,47	0,33	<b>0,006</b>
Mittkettig oxygenierte Säuren	0,35	0,24	0,85	0,11	<b>0,025</b>					
C <sub>16</sub> -DHFS	0,32	0,22	0,80	0,12	<b>0,023</b>	28,31	8,39	47,91	4,06	<b>0,019</b>
C <sub>16</sub> -HDFS	0,03	0,02	0,05	0,00	0,073	2,41	0,79	3,21	0,70	0,129
Gesamt	1,07	0,43	1,67	0,24	0,062					



**Abbildung 7-9** Relative Zusammensetzung des Blattkutins der *abcg11*-Knockdownlinie und des Wildtyps

Kutinbestandteile der *abcg11*-Knockdownlinie. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel des Wildtyps aus drei Parallelen mit Standardabweichung und der Mutante aus zwei Parallelen mit Ober-/Untergrenze. Die Anzahl der Doppelbildungen wurde in Klammern gesetzt. C16-DHFS: Dihydroxyfettsäure, C16-HDFS: Hydroxydifettsäure



**Abbildung 7-8** Relative Zusammensetzung des Blattkutins der *ABCG11*-Überexpressionslinie und des Wildtyps

Kutinbestandteile der *ABCG11*-Knockdownlinie. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel des Wildtyps aus drei Parallelen mit Standardabweichung und der Mutante aus zwei Parallelen mit Ober-/Untergrenze. Die Anzahl der Doppelbildungen wurde in Klammern gesetzt. C16-DHFS: Dihydroxyfettsäure, C16-HDFS: Hydroxydifettsäure

**Tabelle 7-12 Gehalte des Blattkutins der abcg11-Knockdownlinie**

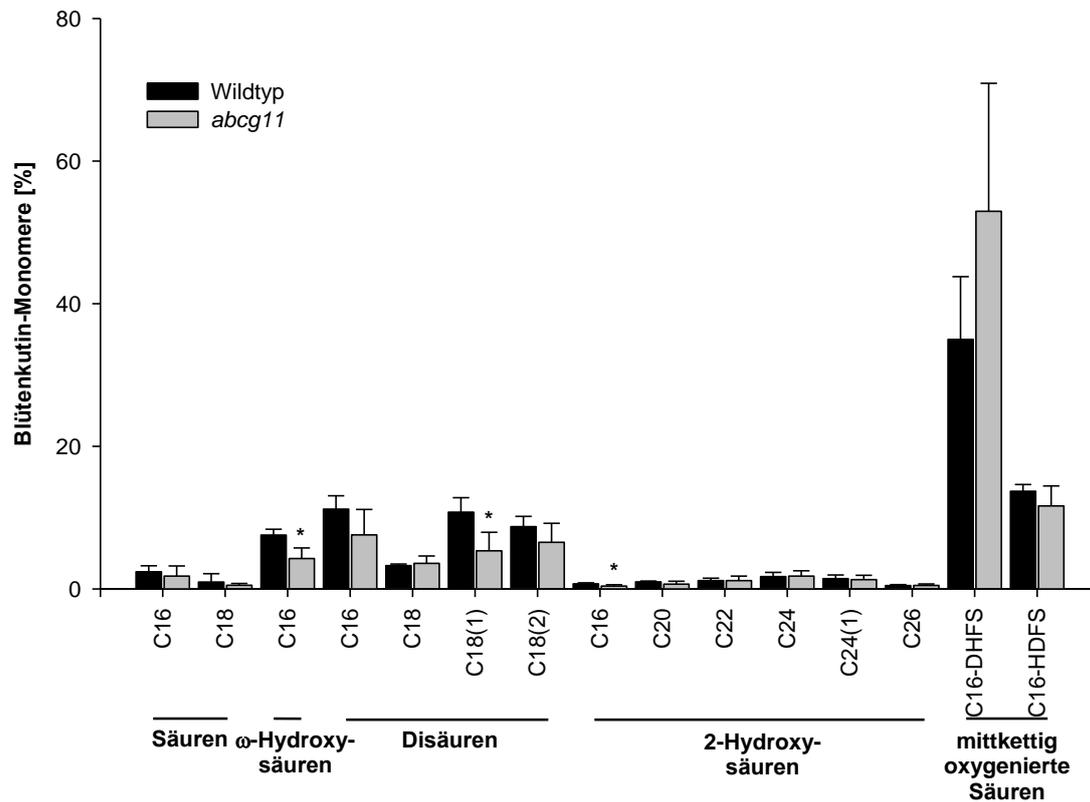
Die Werte entsprechen dem arithmetischen Mittel und Standardabweichungen aus drei Parallelen beim Wildtyp, und zwei Parallelen sowie der Ober-/ und Untergrenze bei der Mutante. Aufgelistet sind die absoluten und relativen Werte.

Kutinbestandteil	Gehalt [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]				Gehalt [%]			
	Wildtyp		<i>abcg11</i>		Wildtyp		<i>abcg11</i>	
	Mw	Stabw	Mw	Ober-/ Untergrenze	Mw	Stabw	Mw	Ober-/ Untergrenze
Alkohole	1,14E-03	8,65E-04	8,27E-04	8,45E-05				
C <sub>18</sub>	1,14E-03	8,65E-04	8,27E-04	8,45E-05	0,524	0,300	1,444	0,417
$\omega$ -Hydroxysäuren	8,17E-03	1,21E-03	1,47E-03	5,44E-04				
C <sub>16</sub>	8,17E-03	1,21E-03	1,47E-03	5,44E-04	4,135	1,143	2,697	1,416
Disäuren	0,139	0,021	0,020	0,006				
C <sub>16</sub>	3,27E-02	5,57E-03	2,66E-03	1,15E-03	16,255	2,624	4,939	2,850
C <sub>18:1</sub>	1,73E-02	5,42E-03	2,79E-03	9,14E-04	8,352	0,954	4,470	0,645
C <sub>18:2/3</sub>	8,95E-02	1,87E-02	1,42E-02	5,97E-03	44,491	9,065	26,207	14,890
2-Hydroxysäuren	0,037	0,018	0,028	0,015				
C <sub>16</sub>	6,39E-03	3,40E-03	3,01E-03	4,14E-05	3,014	1,010	5,171	1,064
C <sub>18</sub>	9,86E-04	3,79E-04	3,33E-04	1,00E-04	0,472	0,095	0,537	0,062
C <sub>20</sub>	4,45E-03	2,61E-03	1,24E-03	1,76E-04	2,122	0,906	2,175	0,710
C <sub>22</sub>	1,03E-02	4,18E-03	3,41E-03	1,08E-03	5,048	1,477	5,489	0,716
C <sub>24</sub>	6,80E-03	3,84E-03	8,83E-03	6,53E-03	3,230	1,241	12,969	8,263
C <sub>24:1</sub>	6,18E-03	2,97E-03	6,09E-03	3,57E-03	2,976	0,967	9,245	4,107
C <sub>26</sub>	2,07E-03	1,02E-03	5,19E-03	3,94E-03	0,995	0,326	7,582	5,035
Mittkettig oxygenierte Säuren	0,018	0,008	0,011	0,004				
C <sub>16</sub> -DHFS	9,56E-03	4,39E-03	7,11E-03	2,68E-03	4,593	1,827	11,289	2,239
C <sub>16</sub> -HDFS	8,10E-03	6,37E-03	3,54E-03	8,47E-04	3,793	2,340	5,786	0,282
Gesamt	0,1641	0,0182	0,0616	0,0068				

**Tabelle 7-13 Gehalte des Blattkutins der ABCG11-Überexpressionslinie**

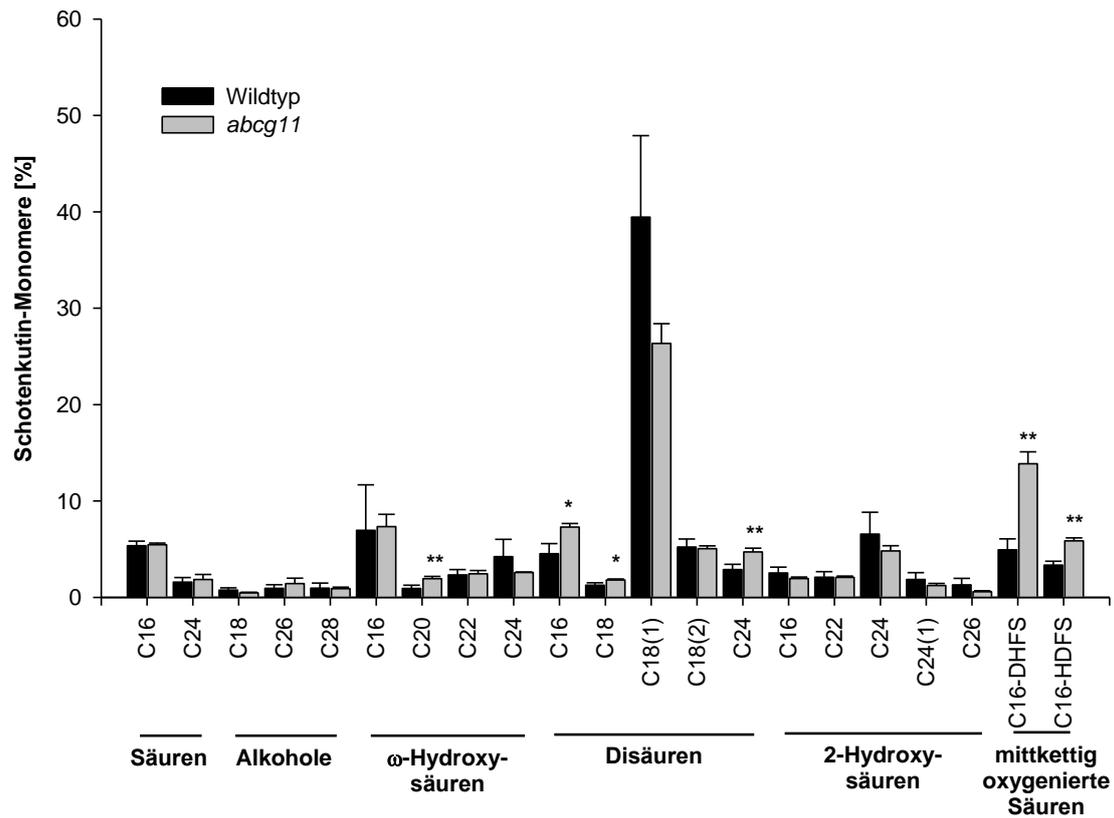
Die Werte entsprechen dem arithmetischen Mittel und Standardabweichungen aus drei Parallelen beim Wildtyp, und zwei Parallelen sowie der Ober-/ und Untergrenze bei der Mutante. Aufgelistet relativen Einzelwerte in [%].

Kutinbestandteil	Gehalt [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]				Gehalt [%]			
	Wildtyp		<i>abcg11</i> -OE		Wildtyp		<i>abcg11</i> -OE	
	Mw	Stabw	Mw	ober-/untergrenze	Mw	Stabw	Mw	ober-/untergrenze
Alkohole	0,0004	0,0001	0,0020	0,0012				
C <sub>18</sub>	0,0004	0,0001	0,0020	0,0023	0,339	0,132	0,363	0,234
w-Hydroxysäuren	0,0059	0,0004	0,0840	0,0065				
C <sub>16</sub>	0,0059	0,0004	0,0840	0,0131	4,901	0,355	14,100	0,470
Disäuren	0,087	0,014	0,348	0,065				
C <sub>16</sub>	0,0224	0,0025	0,1142	0,0262	18,670	0,611	18,851	2,294
C <sub>18:1</sub>	0,0114	0,0015	0,0196	0,0024	9,507	0,211	3,280	0,046
C <sub>18:2/3</sub>	0,0534	0,0105	0,2145	0,0367	44,076	3,088	35,636	2,191
2-Hydroxysäuren	0,016	0,002	0,030	0,004				
C <sub>16</sub>	0,0031	0,0006	0,0039	0,0000	2,532	0,152	0,657	0,078
C <sub>18</sub>	0,0007	0,0002	0,0030	0,0006	0,602	0,067	0,510	0,149
C <sub>20</sub>	0,0026	0,0007	0,0054	0,0004	2,121	0,342	0,928	0,176
C <sub>22</sub>	0,0047	0,0004	0,0075	0,0015	3,896	0,396	1,293	0,392
C <sub>24</sub>	0,0023	0,0003	0,0043	0,0005	1,942	0,079	0,732	0,162
C <sub>24:1</sub>	0,0023	0,0004	0,0043	0,0010	1,919	0,145	0,752	0,243
C <sub>26</sub>	0,0007	0,0001	0,0014	0,0004	0,589	0,061	0,246	0,086
Mittkettig oxygenierte Säure	0,010	0,001	0,134	0,000				
C <sub>16</sub> -DHFS	0,0049	0,0013	0,1099	0,0020	4,199	1,737	18,646	2,407
C <sub>16</sub> -HDFS	0,0056	0,0004	0,0239	0,0018	4,706	0,622	4,006	0,135
Gesamt	0,1204	0,0161	0,5978	0,0662				



**Abbildung 7-10** Relative Verteilung der Blütenkutinbestandteile der *abcg11*-Knockdownlinie

Kutinbestandteile der Mutante und des Wildtyps. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus drei Parallelen beim Wildtyp und der Mutante mit Standardabweichung. Mittels zweiseitigem *Student's t*-Test wurde auf statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante geprüft. \*: p-Werte 0,01-0,05, \*\*: p-Werte <0,01.



**Abbildung 7-11 Relative Verteilung der Schotenkutinbestandteile der abcg11-Knockdownlinie**

Kutinbestandteile der Mutante und des Wildtyps. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus drei Parallelen beim Wildtyp und der Mutante mit Standardabweichung. Mittels zweiseitigem *Student's t-Test* wurde auf statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante geprüft. \*: p-Werte 0,01-0,05, \*\*: p-Werte <0,01.

**Tabelle 7-14 Absolute und relative Gehalte des Blütenkutins**

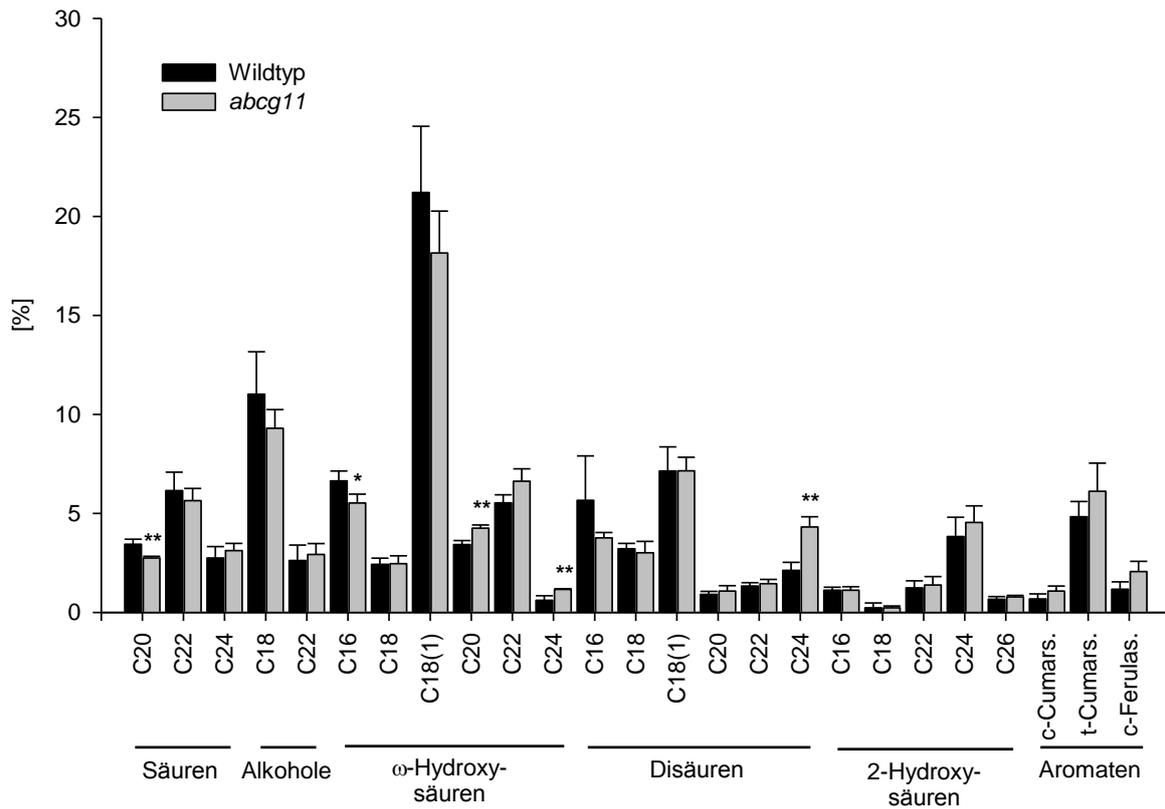
Kutingehalt der Blüte von Wildtyp und *abcg11*-Linie. Aufgelistet sind die arithmetischen Mittel (Mw) und Standardabweichungen (Stabw) der absoluten und relativen Werte und die p-Werte nach einem zweiseitigen Student's t-Test mit ungleicher Varianz aus drei Parallelen. p-Werte <0,05 in fetten Lettern, v. - verzweigtes Derivat.

Kutin- monomer	Gehalt [ $\mu\text{g}/\text{mg}$ ]					Gehalt [%]				
	Wildtyp		<i>abcg11</i>		t-Test p-Wert	Wildtyp		<i>abcg11</i>		t-Test p-Wert
	Mw	Stabw	Mw	Stabw		Mw	Stabw	Mw	Stabw	
Säuren	0,18	0,10	0,18	0,10	0,486					
C <sub>16</sub>	0,13	0,03	0,14	0,09	0,425	2,40	0,84	1,80	1,41	0,284
C <sub>18</sub>	0,06	0,07	0,04	0,02	0,384	0,95	1,18	0,50	0,25	0,290
$\omega$ -Hydroxy- säure	0,41	0,04	0,34	0,05	0,090					
C <sub>16</sub>	0,41	0,04	0,34	0,05	0,090	7,56	0,80	4,26	1,50	<b>0,021</b>
Disäuren	1,82	0,11	1,84	0,45	0,474					
C <sub>16</sub>	0,60	0,03	0,60	0,18	0,497	11,18	1,87	7,58	3,57	0,109
C <sub>18</sub>	0,18	0,03	0,29	0,02	<b>0,002</b>	3,25	0,24	3,57	1,05	0,330
C <sub>18:1</sub>	0,58	0,02	0,42	0,13	0,091	10,77	2,01	5,34	2,59	<b>0,024</b>
C <sub>18:2</sub>	0,47	0,04	0,52	0,12	0,247	8,72	1,45	6,54	2,66	0,149
2-Hydroxy- säure	0,35	0,07	0,46	0,12	0,117					
C <sub>16</sub>	0,04	0,00	0,03	0,01	0,127	0,72	0,12	0,40	0,17	<b>0,030</b>
C <sub>20</sub>	0,05	0,01	0,05	0,03	0,497	0,97	0,12	0,66	0,42	0,164
C <sub>22</sub>	0,06	0,01	0,09	0,04	0,137	1,15	0,36	1,17	0,63	0,486
C <sub>24</sub>	0,09	0,03	0,15	0,03	0,061	1,72	0,60	1,80	0,73	0,444
C <sub>24:1</sub>	0,08	0,03	0,10	0,03	0,165	1,45	0,52	1,30	0,61	0,386
C <sub>26</sub>	0,02	0,01	0,04	0,01	0,053	0,46	0,15	0,49	0,19	0,422
Mittkettig oxygenierte Säuren	2,72	0,91	5,79	2,93	0,103					
C <sub>16</sub> -DHFS	1,98	0,80	4,83	2,95	0,116	34,98	8,83	52,95	17,96	0,110
C <sub>16</sub> -HDFS	0,74	0,11	0,96	0,02	<b>0,034</b>	13,71	0,93	11,64	2,81	0,165
Gesamt	5,48	1,09	8,61	2,25	0,061					

**Tabelle 7-15 Absolute und relative Gehalte des Schotenkutins**

Kutingehalt der Schote von Wildtyp und *abcg11*-Linie. Aufgelistet sind die arithmetischen Mittel (Mw) und Standardabweichungen (Stabw) der absoluten und relativen Werte und die p-Werte nach einem zweiseitigen Student's t-Test mit ungleicher Varianz aus drei Parallelen. p-Werte <0,05 in fetten Lettern, v. - verzweigtes Derivat.

Kutin- monomer	Gehalt [ $\mu\text{g}/\text{mg}$ ]					Gehalt [%]				
	Wildtyp		<i>abcg-11</i>		t-Test p-Wert	Wildtyp		<i>abcg-11</i>		t-Test p-Wert
	Mw	Stabw	Mw	Stabw		Mw	Stabw	Mw	Stabw	
<b>Säuren</b>	0,12	0,02	0,10	0,02	0,079					
C <sub>16</sub>	0,09	0,01	0,07	0,01	0,065	5,37	0,48	5,47	0,17	0,379
C <sub>24</sub>	0,03	0,01	0,02	0,01	0,321	1,59	0,47	1,85	0,53	0,276
<b>Alkohole</b>	0,05	0,02	0,04	0,01	0,303					
C <sub>18</sub>	0,01	0,01	0,01	0,00	0,070	0,75	0,24	0,47	0,06	0,090
C <sub>26</sub>	0,02	0,01	0,02	0,01	0,365	0,94	0,38	1,43	0,56	0,147
C <sub>28</sub>	0,02	0,01	0,01	0,00	0,254	0,96	0,53	0,90	0,16	0,432
<b><math>\omega</math>-Hydroxy- säuren</b>	0,26	0,12	0,19	0,03	0,250					
C <sub>16</sub>	0,12	0,09	0,10	0,01	0,331	6,96	4,72	7,33	1,28	0,452
C <sub>20</sub>	0,02	0,00	0,03	0,00	<b>0,016</b>	0,92	0,35	1,94	0,24	<b>0,009</b>
C <sub>22</sub>	0,04	0,01	0,03	0,01	0,211	2,33	0,56	2,44	0,34	0,389
C <sub>24</sub>	0,08	0,04	0,03	0,01	0,099	4,22	1,79	2,58	0,06	0,126
<b>Disäuren</b>	0,92	0,14	0,61	0,15	<b>0,014</b>					
C <sub>16</sub>	0,08	0,01	0,10	0,02	0,133	4,53	1,04	7,30	0,36	<b>0,016</b>
C <sub>18</sub>	0,02	0,01	0,02	0,01	0,303	1,25	0,26	1,80	0,10	<b>0,026</b>
C <sub>18:1</sub>	0,09	0,00	0,07	0,02	0,067	5,23	0,83	5,06	0,29	0,381
C <sub>18:2</sub>	0,68	0,11	0,36	0,10	<b>0,010</b>	39,46	8,44	26,34	2,05	0,054
C <sub>24</sub>	0,05	0,02	0,06	0,01	0,167	2,88	0,55	4,72	0,39	<b>0,006</b>
<b>2-Hydroxy- säuren</b>	0,26	0,10	0,14	0,04	0,110					
C <sub>16</sub>	0,04	0,01	0,03	0,01	0,078	2,52	0,62	1,96	0,15	0,125
C <sub>22</sub>	0,04	0,01	0,03	0,00	0,186	2,10	0,57	2,07	0,13	0,471
C <sub>24</sub>	0,12	0,05	0,07	0,02	0,107	6,57	2,26	4,82	0,55	0,155
C <sub>24:1</sub>	0,03	0,02	0,02	0,01	0,104	1,85	0,71	1,22	0,22	0,131
C <sub>26</sub>	0,02	0,01	0,01	0,00	0,090	1,30	0,67	0,58	0,10	0,102
<b>Mittkettig oxygenierte Säuren</b>	0,14	0,02	0,26	0,03	0,216					
C <sub>16</sub> -DHFS	0,08	0,01	0,18	0,02	<b>0,002</b>	4,93	1,14	13,86	1,23	<b>0,000</b>
C <sub>16</sub> -HDFS	0,06	0,00	0,08	0,01	<b>0,047</b>	3,34	0,41	5,87	0,30	<b>0,001</b>
<b>Gesamt</b>	1,75	0,24	1,35	0,28	0,065					



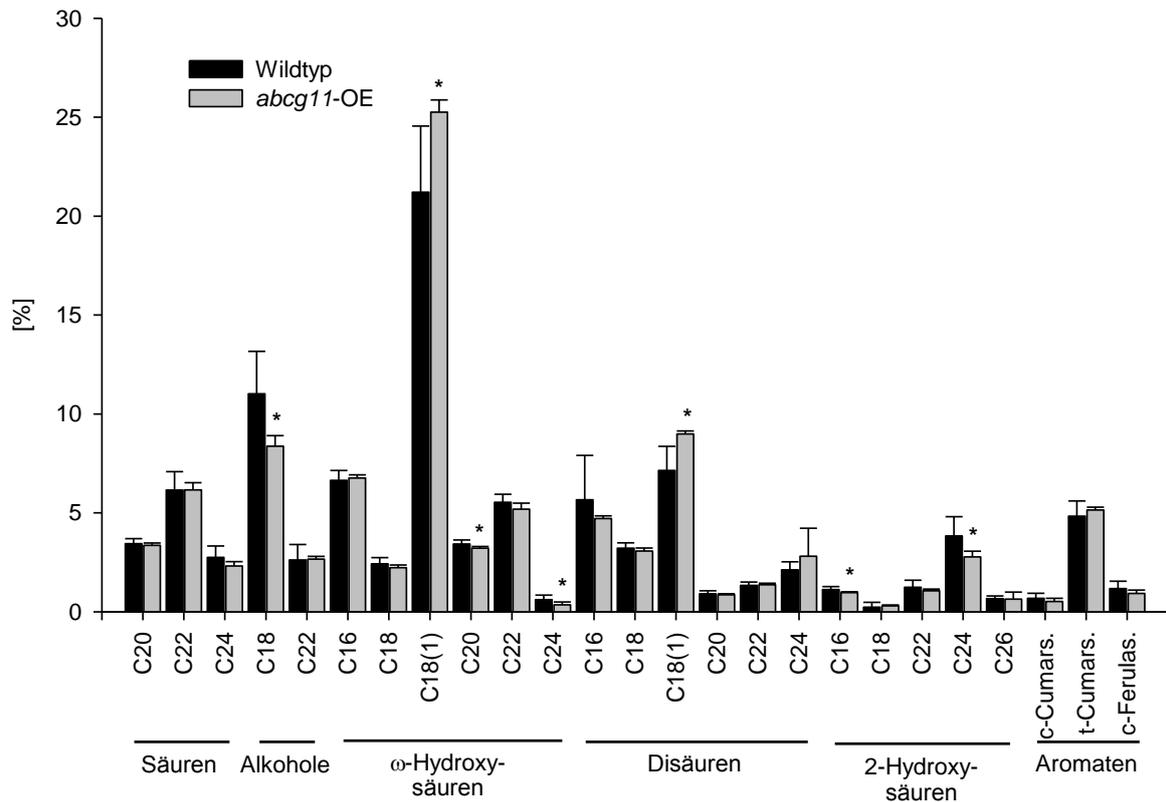
**Abbildung 7-12 Relative Verteilung der Suberinbestandteile der abcg11-Knockdownlinie und des Wildtyps**

Suberinbestandteile der Mutante und des Wildtyps. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus fünf (WT) bzw. drei (MT) Parallelen beim Wildtyp und der Mutante mit Standardabweichung. Mittels zweiseitigem *Student's t-Test* wurde auf statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante geprüft. \*: p-Werte 0,01-0,05, \*\*: p-Werte <0,01.

**Tabelle 7-16 Gehalte des Wurzeluberins der abcg11-Knockdownlinie**

Aufgelistet sind die arithmetischen Mittel (Mw) und Standardabweichungen (Stabw) der absoluten und relativen Werte, und die p-Werte nach einem zweiseitigen Student's t-Test mit ungleicher Varianz aus drei Parallelen. p-Werte <0,05 in fetten Lettern

Suberin- monomere	Gehalt [ $\mu\text{g}/\text{mg}$ ]				t-Test p-Wert	Gehalt [%]			
	Wildtyp		abcg11			abcg11		t-Test p-Wert	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw		Mw	Stabw		
<b>Säuren</b>	1,81	0,48	1,11	0,35	<b>0,031</b>				
C <sub>20</sub>	0,51	0,13	0,27	0,08	<b>0,009</b>	2,75	0,09	<b>0,001</b>	
C <sub>22</sub>	0,91	0,31	0,55	0,18	<b>0,040</b>	5,64	0,62	0,195	
C <sub>24</sub>	0,39	0,06	0,30	0,10	0,135	3,12	0,36	0,152	
<b>Alkohole</b>	1,98	0,48	1,18	0,31	<b>0,014</b>				
C <sub>18</sub>	1,59	0,41	0,89	0,21	<b>0,010</b>	9,30	0,94	0,085	
C <sub>22</sub>	0,39	0,18	0,29	0,12	0,186	2,93	0,55	0,274	
<b><math>\omega</math>-Hydroxy- säuren</b>	5,76	1,08	3,67	0,96	<b>0,019</b>				
C <sub>16</sub>	0,97	0,21	0,53	0,13	<b>0,005</b>	5,52	0,45	<b>0,012</b>	
C <sub>18</sub>	0,35	0,03	0,24	0,10	0,104	2,46	0,40	0,463	
C <sub>18:1</sub>	3,05	0,64	1,73	0,41	<b>0,006</b>	18,15	2,11	0,083	
C <sub>20</sub>	0,50	0,12	0,41	0,12	0,183	4,26	0,16	<b>0,001</b>	
C <sub>22</sub>	0,81	0,20	0,65	0,22	0,179	6,62	0,63	<b>0,038</b>	
C <sub>24</sub>	0,09	0,03	0,11	0,03	0,163	1,17	0,03	<b>0,003</b>	
<b>Disäuren</b>	2,99	0,82	2,04	0,73	0,075				
C <sub>16</sub>	0,86	0,50	0,37	0,11	<b>0,045</b>	3,77	0,27	0,065	
C <sub>18</sub>	0,47	0,09	0,30	0,12	0,063	3,01	0,58	0,309	
C <sub>18:1</sub>	1,02	0,21	0,70	0,24	0,064	7,15	0,69	0,497	
C <sub>20</sub>	0,13	0,05	0,11	0,05	0,249	1,08	0,28	0,202	
C <sub>22</sub>	0,20	0,06	0,14	0,05	0,104	1,45	0,21	0,237	
C <sub>24</sub>	0,31	0,07	0,42	0,16	0,164	4,31	0,52	<b>0,002</b>	
<b>2-Hydroxy- säuren</b>	1,04	0,33	0,78	0,31	0,162				
C <sub>16</sub>	0,16	0,03	0,11	0,04	0,081	1,12	0,18	0,486	
C <sub>18</sub>	0,04	0,04	0,02	0,01	0,281	0,23	0,09	0,497	
C <sub>22</sub>	0,19	0,09	0,14	0,07	0,217	1,39	0,43	0,323	
C <sub>24</sub>	0,56	0,20	0,44	0,16	0,196	4,54	0,84	0,164	
C <sub>26</sub>	0,10	0,03	0,07	0,02	0,111	0,78	0,08	0,091	
<b>Aromaten</b>	0,96	0,16	0,86	0,06	0,130				
c-Cumarsäure	0,10	0,05	0,10	0,01	0,484	1,08	0,25	<b>0,043</b>	
t-Cumarsäure	0,69	0,09	0,57	0,04	<b>0,022</b>	6,12	1,42	0,125	
c-Ferulasäure	0,17	0,07	0,19	0,03	0,296	2,06	0,52	<b>0,036</b>	
<b>Gesamt</b>	14,54	2,94	9,64	2,63	<b>0,031</b>				



**Abbildung 7-13** Relative Verteilung der Suberinbestandteile der *abcg11*-Überexpressionslinie und des Wildtyps

Suberinbestandteile der Mutante und des Wildtyps. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus fünf (WT) bzw. drei (MT) Parallelen beim Wildtyp und der Mutante mit Standardabweichung. Mittels zweiseitigem *Student's t*-Test wurde auf statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante geprüft. \*: p-Werte 0,01-0,05, \*\*: p-Werte <0,01.

**Tabelle 7-17 Gehalte des Wurzeluberins der *ABCG11*-Überexpressionslinie**

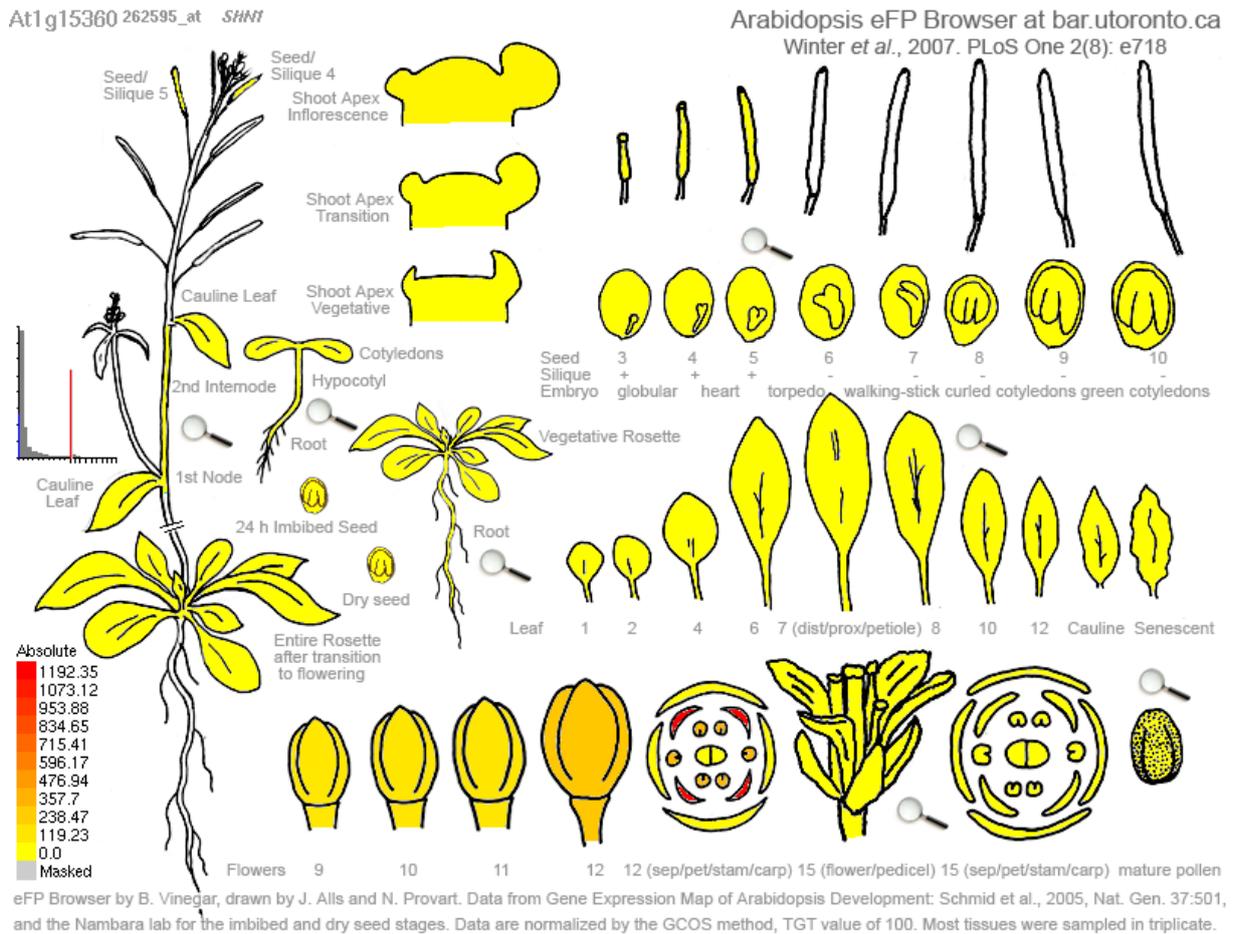
Aufgelistet sind die arithmetischen Mittel (Mw) und Standardabweichungen (Stabw) der absoluten und relativen Werte, und die p-Werte nach einem zweiseitigen Student's t-Test mit ungleicher Varianz aus drei Parallelen. p-Werte <0,05 in fetten Lettern

Suberinmonomere	Gehalt [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]				t-Test p-Wert	Gehalt [%]		t-Test p-Wert
	Wildtyp		<i>ABCG11</i>			<i>abcg11</i> -OE		
	Mw	Stabw	Mw	Stabw		Mw	Stabw	
<b>Säuren</b>			1,77	0,14	0,438			
C <sub>20</sub>	3,44	0,25	0,50	0,05	0,489	3,36	0,12	0,272
C <sub>22</sub>	6,15	0,93	0,92	0,06	0,476	6,16	0,37	0,494
C <sub>24</sub>	2,75	0,57	0,35	0,03	0,125	2,31	0,22	0,093
<b>Alkohole</b>			1,65	0,19	0,114			
C <sub>18</sub>	11,02	2,14	1,26	0,17	0,083	8,37	0,53	<b>0,024</b>
C <sub>22</sub>	2,62	0,78	0,40	0,02	0,476	2,66	0,13	0,459
<b><math>\omega</math>-Hydroxysäuren</b>			6,44	0,52	0,140			
C <sub>16</sub>	6,64	0,50	1,01	0,10	0,346	6,76	0,16	0,320
C <sub>18</sub>	2,43	0,31	0,33	0,02	0,233	2,23	0,14	0,126
C <sub>18:1</sub>	21,21	3,34	3,78	0,36	<b>0,043</b>	25,25	0,62	<b>0,026</b>
C <sub>20</sub>	3,43	0,20	0,48	0,03	0,371	3,22	0,08	<b>0,044</b>
C <sub>22</sub>	5,53	0,41	0,78	0,05	0,368	5,19	0,31	0,114
C <sub>24</sub>	0,62	0,23	0,05	0,02	<b>0,049</b>	0,35	0,14	<b>0,044</b>
<b>Disäuren</b>			3,26	0,20	0,257			
C <sub>16</sub>	5,66	2,24	0,71	0,05	0,262	4,71	0,14	0,198
C <sub>18</sub>	3,21	0,27	0,46	0,06	0,458	3,07	0,15	0,184
C <sub>18:1</sub>	7,14	1,22	1,35	0,12	<b>0,015</b>	8,99	0,15	<b>0,013</b>
C <sub>20</sub>	0,91	0,16	0,13	0,01	0,386	0,86	0,05	0,267
C <sub>22</sub>	1,33	0,17	0,20	0,01	0,412	1,36	0,08	0,373
C <sub>24</sub>	2,12	0,41	0,42	0,20	0,222	2,81	1,41	0,244
<b>2-Hydroxysäuren</b>			0,86	0,04	0,149			
C <sub>16</sub>	1,12	0,15	0,14	0,01	0,154	0,97	0,05	<b>0,040</b>
C <sub>18</sub>	0,23	0,24	0,05	0,01	0,359	0,30	0,04	0,287
C <sub>22</sub>	1,24	0,36	0,16	0,01	0,273	1,07	0,08	0,176
C <sub>24</sub>	3,83	0,98	0,41	0,04	0,089	2,77	0,28	<b>0,036</b>
C <sub>26</sub>	0,67	0,13	0,10	0,05	0,488	0,64	0,36	0,448
<b>Aromaten</b>			0,99	0,08	0,373			
c-Cumarsäure	0,68	0,25	0,08	0,02	0,218	0,52	0,16	0,160
t-Cumarsäure	4,83	0,77	0,77	0,03	0,063	5,14	0,15	0,213
c-Ferulasäure	1,17	0,37	0,14	0,03	0,220	0,93	0,17	0,129

## 7.4 Daten zu den shn1/2/3-Linien

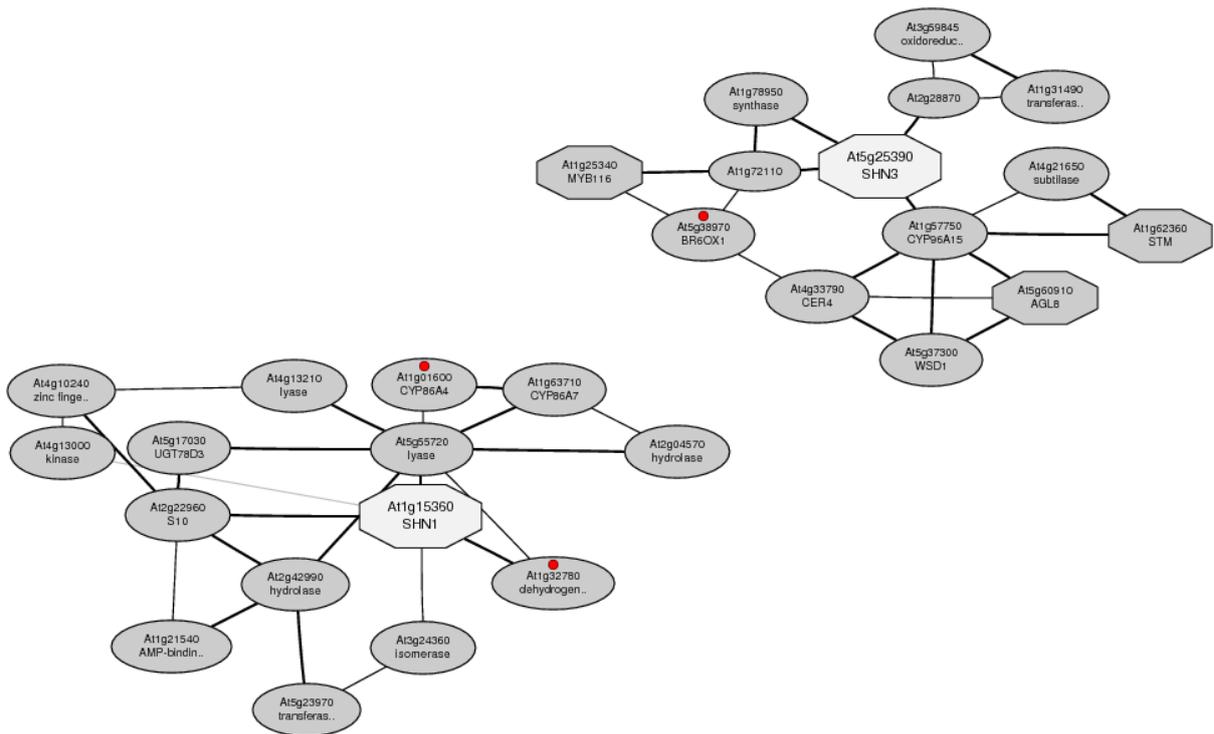
### 7.4.1 Lokalisation, Expression und Coexpression

Die Genevestigator-Recherche für *SHN3* ergab ähnliche Befunde und wurde hier nicht separat dargestellt. Die Recherche für *SHN2* ergab keine Resultate.



**Abbildung 7-14 In silico-Studie der Gewebsexpression von SHN1**

Die Abbildung zeigt die Intensität der Expression von *SHN1* in verschiedenen Altersstadien der Pflanzenentwicklung und verschiedenen Geweben an. Die Expressionsstärke wird durch die farbliche Markierung angezeigt von gelb: schwache Expression bis rot: hohe Expression.



**Abbildung 7-15 Coexpression von SHN1 und SHN3**

Die Abbildung zeigt das Coexpressionsnetzwerk für die Gene *SHN1* und *SHN3*. Einige Gene sind aus der Kutikulabildung bekannt. *SHN1* ist mit Genen coexprimiert die am Kutinbildungsprozess beteiligt sind (*CYP86A4* und *CYP86A7*). *SHN3* ist mit Genen coexprimiert die an der Wachsbildung (*CYP96A15*, *CER4* und *WSD1*) beteiligt sind

## 7.4.2 Daten zur Kutikulazusammensetzung

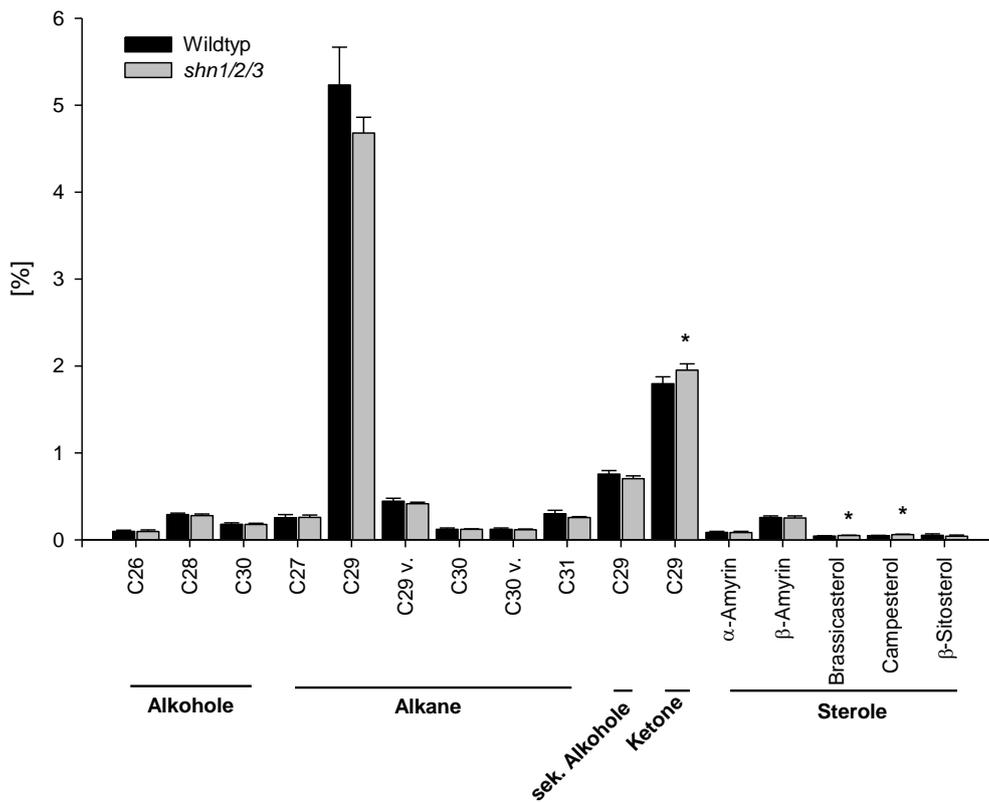


Abbildung 7-16 Relative Verteilung der Blütenwachsbestandteile der *shn1/2/3*-Linie und des Wildtyps

Wachsbestandteile der Mutante und des Wildtyps. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus 3 Parallelen mit Standardabweichung. Mittels zweiseitigem *Student's* t-Test wurde auf statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante geprüft. \*: p-Werte 0,01-0,05, \*\*: p-Werte <0,01.

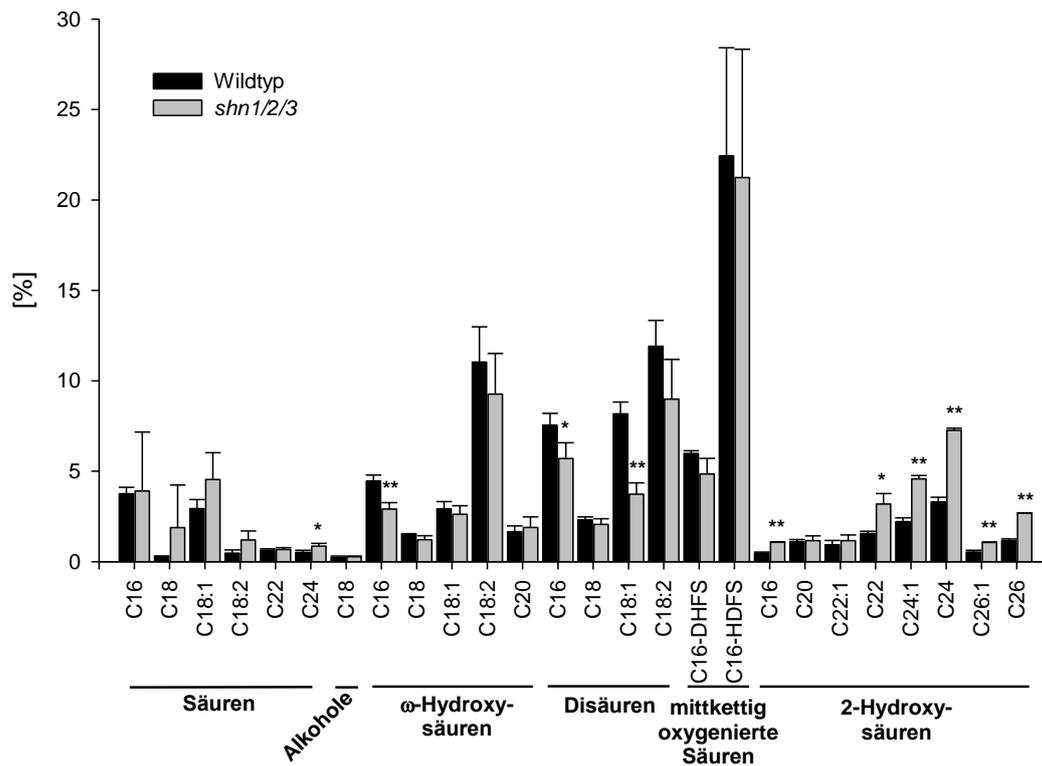


Abbildung 7-17 Relative Verteilung der Blütenkutinbestandteile der *shn1/2/3*-Linie und des Wildtyps

Kutinbestandteile der Mutante und des Wildtyps. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus 3 Parallelen mit Standardabweichung. Mittels zweiseitigem *Student's t*-Test wurde auf statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante geprüft. \*: p-Werte 0,01-0,05, \*\*: p-Werte <0,01.

**Tabelle 7-18 Absolute und relative Blütenwachsgehalte der *shn1/2/3*-Linie**

Aufgelistet sind die arithmetischen Mittel (Mw) und Standardabweichungen (Stabw) der absoluten und relativen Werte, und die p-Werte nach einem zweiseitigen Student's t-Test mit ungleicher Varianz aus drei Parallelen. p-Werte <0,05 in fetten Letters

Substanz	Gehalt [ $\mu\text{g mg}^{-1}$ ]				t-Test p-Wert	Gehalt [%]				t-Test p-Wert
	Wildtyp		<i>shn1/2/3</i>			Wildtyp		<i>shn1/2/3</i>		
	Mw	Stabw	Mw	Stabw		Mw	Stabw	Mw	Stabw	
Alkohole	0,57	0,04	0,55	0,05	0,66					
C <sub>26</sub>	0,10	0,01	0,10	0,02	0,92	0,97	0,13	1,01	0,18	0,74
C <sub>28</sub>	0,29	0,02	0,28	0,02	0,33	2,89	0,18	2,92	0,16	0,87
C <sub>30</sub>	0,18	0,02	0,18	0,01	0,96	1,77	0,07	1,86	0,11	0,21
Alkane	6,47	0,57	5,85	0,20	0,11					
C <sub>27</sub>	0,26	0,03	0,26	0,03	0,90	2,52	0,16	2,71	0,27	0,30
C <sub>29</sub>	5,23	0,43	4,68	0,18	0,08	51,88	0,52	49,04	0,74	<b>0,00</b>
C <sub>29</sub> v.	0,44	0,03	0,42	0,02	0,20	4,41	0,11	4,35	0,11	0,50
C <sub>30</sub>	0,12	0,02	0,12	0,00	1,00	1,20	0,07	1,27	0,04	0,12
C <sub>30</sub> v.	0,12	0,01	0,12	0,01	0,58	1,20	0,06	1,22	0,08	0,73
C <sub>31</sub>	0,30	0,04	0,26	0,01	0,11	2,97	0,19	2,69	0,18	0,08
sek. Alkohol	0,76	0,04	0,70	0,03	0,09					
C <sub>29</sub>	0,76	0,04	0,70	0,03	0,09	7,51	0,18	7,38	0,31	0,49
Ketone	1,80	0,08	1,95	0,07	<b>0,03</b>					
C <sub>29</sub>	1,80	0,08	1,95	0,07	<b>0,03</b>	17,85	0,64	20,46	0,51	<b>0,00</b>
Sterole	0,55	0,08	0,58	0,02	0,58					
a-Amyrin	0,09	0,01	0,08	0,01	0,80	0,85	0,07	0,87	0,16	0,77
$\beta$ -Amyrin	0,26	0,02	0,25	0,02	0,72	2,55	0,08	2,64	0,26	0,57
Brassicasterol	0,04	0,00	0,05	0,00	<b>0,04</b>	0,44	0,03	0,52	0,03	<b>0,01</b>
Campesterol	0,05	0,00	0,06	0,01	<b>0,02</b>	0,48	0,01	0,62	0,05	<b>0,01</b>
$\beta$ -Sitosterol	0,05	0,02	0,04	0,01	0,37	0,51	0,13	0,44	0,15	0,52
Gesamt	10,08	0,75	9,54	0,27	0,25					

**Tabelle 7-19 Absolute und relative Blütenkutingehalte der *shn1/2/3*-Linie**

Aufgelistet sind die arithmetischen Mittel (Mw) und Standardabweichungen (Stabw) der absoluten und relativen Werte, und die p-Werte nach einem zweiseitigen Student's t-Test mit ungleicher Varianz aus drei Parallelen. p-Werte <0,05 in fetten Lettern

Substanz	Gehalt [ $\mu\text{g mg}^{-1}$ ]				t-Test p-Wert	Gehalt [%]				t-Test p-Wert
	Wildtyp		<i>shn1/2/3</i>			Wildtyp		<i>shn1/2/3</i>		
	Mw	Stabw	Mw	Stabw		Mw	Stabw	Mw	Stabw	
Säuren	1,19	0,17	0,88	0,33	0,25					
C <sub>16</sub>	0,52	0,07	0,26	0,22	0,18	3,75	0,35	3,91	3,27	0,94
C <sub>18</sub>	0,04	0,01	0,14	0,18	0,45	0,29	0,01	1,88	2,36	0,36
C <sub>18:1</sub>	0,41	0,09	0,30	0,07	0,16	2,93	0,50	4,54	1,48	0,19
C <sub>18:2</sub>	0,06	0,02	0,08	0,04	0,55	0,47	0,18	1,20	0,51	0,12
C <sub>22</sub>	0,09	0,02	0,04	0,01	0,05	0,63	0,07	0,67	0,10	0,63
C <sub>24</sub>	0,07	0,02	0,06	0,01	0,32	0,51	0,12	0,86	0,15	<b>0,04</b>
Alkohole	0,03	0,02	0,02	0,00	0,35					
C <sub>18</sub>	0,03	0,02	0,02	0,00	0,35	0,21	0,10	0,27	0,03	0,39
$\omega$ -Hydroxy-säuren	2,97	0,38	1,18	0,10	<b>0,01</b>					
C <sub>16</sub>	0,61	0,08	0,19	0,01	<b>0,01</b>	4,45	0,34	2,91	0,36	<b>0,01</b>
C <sub>18</sub>	0,21	0,02	0,08	0,02	<b>0,00</b>	1,50	0,04	1,22	0,22	0,15
C <sub>18:1</sub>	0,40	0,05	0,17	0,01	<b>0,01</b>	2,93	0,40	2,62	0,48	0,44
C <sub>18:2</sub>	1,51	0,22	0,61	0,08	<b>0,01</b>	11,03	1,95	9,27	2,24	0,36
C <sub>20</sub>	0,23	0,05	0,12	0,03	<b>0,05</b>	1,66	0,32	1,89	0,59	0,59
$\alpha,\omega$ -Disäuren	4,12	0,45	1,35	0,13	<b>0,01</b>					
C <sub>16</sub>	1,04	0,12	0,38	0,02	<b>0,01</b>	7,54	0,65	5,71	0,87	<b>0,05</b>
C <sub>18</sub>	0,32	0,03	0,14	0,01	<b>0,01</b>	2,31	0,17	2,06	0,31	0,31
C <sub>18:1</sub>	1,12	0,11	0,25	0,02	<b>0,00</b>	8,17	0,66	3,73	0,62	<b>0,00</b>
C <sub>18:2</sub>	1,64	0,19	0,59	0,09	<b>0,00</b>	11,91	1,43	8,98	2,20	0,14
Mittkettig oxygenierte Säuren	3,93	0,96	1,78	0,70	<b>0,04</b>					
C <sub>16</sub> -HDFS	0,83	0,10	0,33	0,08	<b>0,00</b>	5,98	0,15	4,85	0,87	0,15
C <sub>16</sub> -DHFS	3,10	0,90	1,45	0,63	0,07	22,44	5,98	21,24	7,09	0,83
2-Hydroxy-säuren	1,56	0,24	1,48	0,10	0,63					
C <sub>16</sub>	0,06	0,01	0,07	0,01	0,47	0,46	0,07	1,07	0,02	<b>0,00</b>
C <sub>20</sub>	0,15	0,03	0,08	0,01	<b>0,03</b>	1,10	0,12	1,16	0,27	0,74
C <sub>22:1</sub>	0,13	0,04	0,08	0,02	0,14	0,93	0,24	1,17	0,31	0,36
C <sub>22</sub>	0,21	0,03	0,21	0,02	0,81	1,56	0,12	3,19	0,58	<b>0,03</b>
C <sub>24:1</sub>	0,31	0,05	0,30	0,02	0,97	2,22	0,21	4,58	0,18	<b>0,00</b>
C <sub>24</sub>	0,46	0,07	0,48	0,05	0,60	3,30	0,26	7,26	0,12	<b>0,00</b>
C <sub>26:1</sub>	0,07	0,02	0,07	0,01	0,85	0,53	0,10	1,06	0,03	<b>0,01</b>
C <sub>26</sub>	0,16	0,03	0,18	0,02	0,40	1,16	0,10	2,68	0,02	<b>0,00</b>
Gesamt	13,79	1,35	6,68	0,77	<b>0,00</b>					

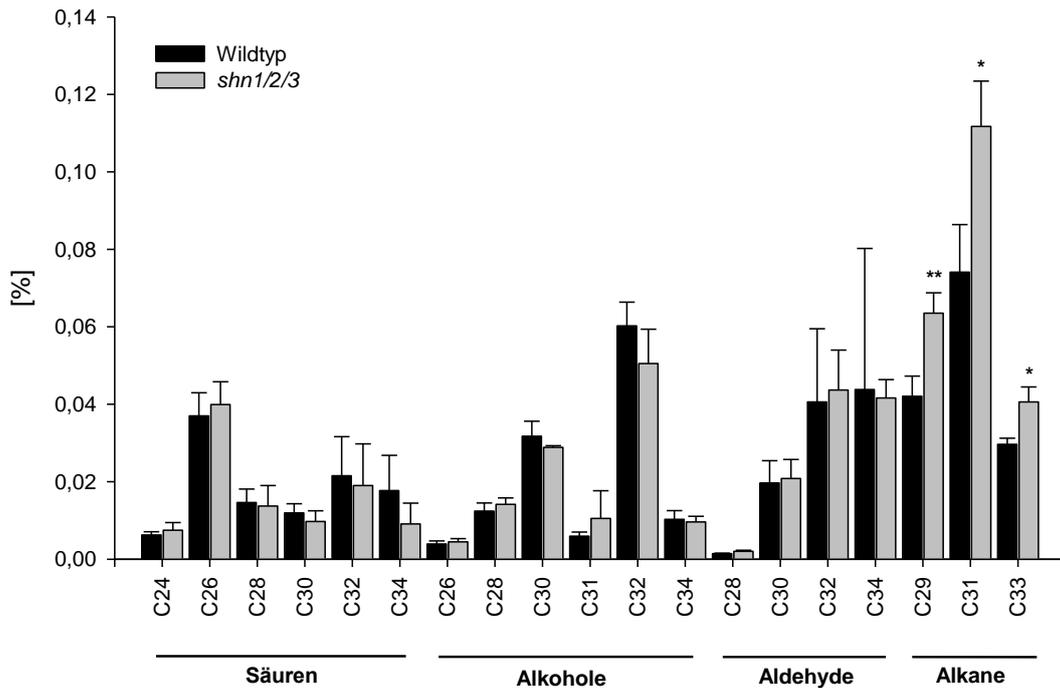


Abbildung 7-18 Relative Blütenwachsbestandteile der *shn1/2/3*-Linie und des Wildtyps

Relative Wachsbestandteile der Mutante und des Wildtyps. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus 3 Parallelen mit Standardabweichung. Mittels zweiseitigem *Student's t*-Test wurde auf statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante geprüft. \*: p-Werte 0,01-0,05, \*\*: p-Werte <0,01.

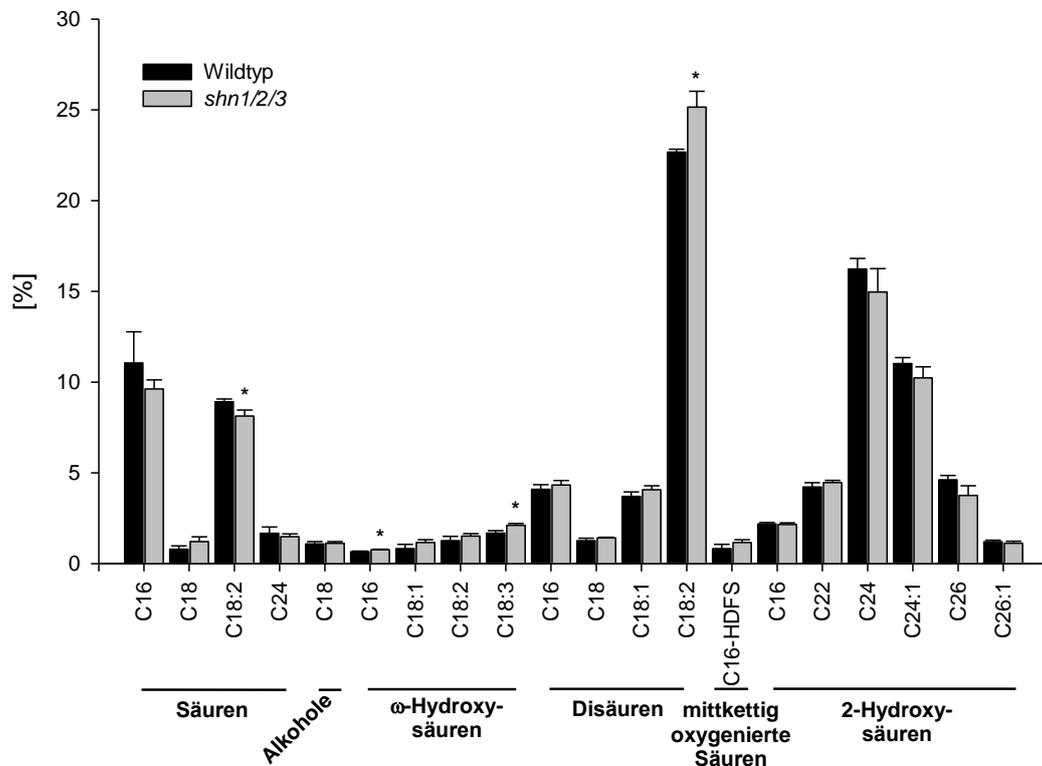


Abbildung 7-19 Relative Blattkutinbestandteile der *shn1/2/3*-Linie und des Wildtyps

Relative Wachsbestandteile der Mutante und des Wildtyps. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus 3 Parallelen mit Standardabweichung. Mittels zweiseitigem *Student's t*-Test wurde auf statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante geprüft. \*: p-Werte 0,01-0,05, \*\*: p-Werte <0,01.

**Tabelle 7-20 Absolute und relative Blattwachsgehalte der *shn1/2/3*-Linie und des Wildtyps**

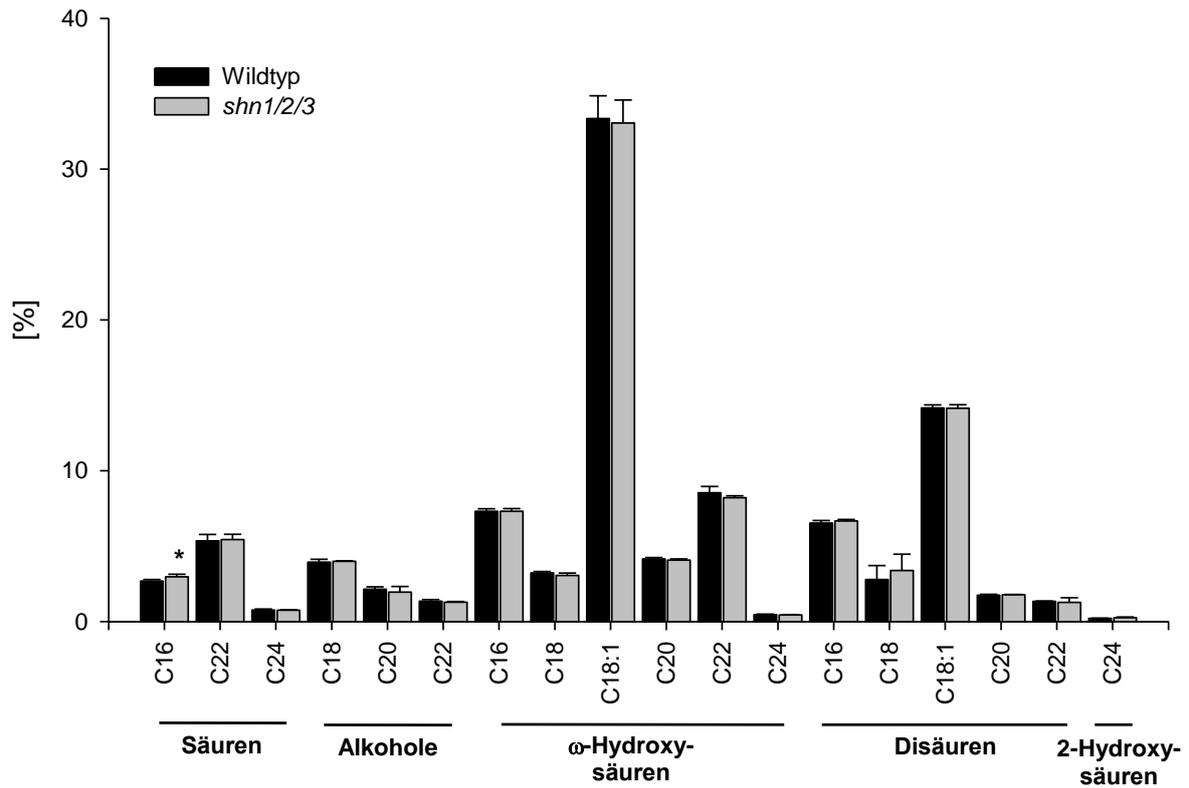
Aufgelistet sind die arithmetischen Mittel (Mw) und Standardabweichungen (Stabw) der absoluten und relativen Werte, und die p-Werte nach einem zweiseitigen Student's t-Test mit ungleicher Varianz aus drei Parallelen. p-Werte <0,05 in fetten Lettern

Substanz	Gehalt [ $\mu\text{g cm}^{-2}$ ]					Gehalt [%]				
	Wildtyp		<i>shn1/2/3</i>		t-Test	Wildtyp		<i>shn1/2/3</i>		t-Test
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	p-Wert	Mw	Stabw	Mw	Stabw	p-Wert
<b>Säuren</b>	0,11	0,01	0,10	0,02	0,28					
C24	0,01	0,00	0,01	0,00	0,40	1,32	0,28	1,40	0,43	0,80
C26	0,04	0,01	0,04	0,01	0,58	7,74	1,44	7,44	1,49	0,81
C28	0,01	0,00	0,01	0,01	0,82	3,03	0,52	2,49	0,66	0,33
C30	0,01	0,00	0,01	0,00	0,35	2,47	0,30	1,78	0,31	<b>0,05</b>
C32	0,02	0,01	0,02	0,01	0,78	4,70	2,50	3,40	1,58	0,49
C34	0,02	0,01	0,01	0,01	0,25	3,51	1,32	1,62	0,81	0,12
<b>Alkohole</b>	0,12	0,01	0,12	0,01	0,30					
C26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,44	0,82	0,18	0,83	0,08	0,96
C28	0,01	0,00	0,01	0,00	0,32	2,59	0,40	2,62	0,11	0,91
C30	0,03	0,00	0,03	0,00	0,32	6,67	1,24	5,38	0,54	0,20
C31	0,01	0,00	0,01	0,01	0,38	1,24	0,17	1,96	1,37	0,46
C32	0,06	0,01	0,05	0,01	0,20	12,57	1,19	9,30	0,54	<b>0,03</b>
C34	0,01	0,00	0,01	0,00	0,69	2,12	0,22	1,77	0,13	0,10
<b>Alkane</b>	0,15	0,02	0,22	0,02	<b>0,01</b>					
C29	0,04	0,01	0,06	0,01	<b>0,01</b>	8,86	1,90	11,77	0,61	0,11
C31	0,07	0,01	0,11	0,01	<b>0,02</b>	15,37	1,46	20,67	0,95	<b>0,01</b>
C33	0,03	0,00	0,04	0,00	<b>0,03</b>	6,23	0,96	7,52	0,44	0,13
<b>Aldehyde</b>	0,11	0,06	0,11	0,01	0,47					
C28	0,00	0,00	0,00	0,00	<b>0,04</b>	0,30	0,04	0,38	0,02	<b>0,05</b>
C30	0,02	0,01	0,02	0,00	0,80	4,02	0,67	3,84	0,71	0,77
C32	0,04	0,02	0,04	0,01	0,82	8,12	2,83	8,09	1,86	0,99
C34	0,04	0,04	0,04	0,00	0,93	8,30	5,59	7,74	1,06	0,88
<b>Gesamt</b>	0,49	0,10	0,54	0,06	0,23					

**Tabelle 7-21 Absolute und relative Blattkutinbestandteile der *shn1/2/3*-Linie und des Wildtyps**

Aufgelistet sind die arithmetischen Mittel (Mw) und Standardabweichungen (Stabw) der absoluten und relativen Werte, und die p-Werte nach einem zweiseitigen Student's t-Test mit ungleicher Varianz aus drei Parallelen. p-Werte <0,05 in fetten Lettern

Substanz	Gehalt [ $\mu\text{g cm}^{-2}$ ]				Gehalt [%]					
	Wildtyp		<i>shn1/2/3</i>		Wildtyp		<i>shn1/2/3</i>			
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
Säuren	0,18	0,04	0,15	0,02	0,32					
C <sub>16</sub>	0,09	0,03	0,07	0,01	0,34	11,05	1,72	9,62	0,50	0,28
C <sub>18</sub>	0,01	0,00	0,01	0,00	0,27	0,79	0,18	1,22	0,25	0,08
C <sub>18:2</sub>	0,07	0,01	0,06	0,01	0,23	8,92	0,15	8,13	0,33	<b>0,04</b>
C <sub>24</sub>	0,01	0,00	0,01	0,00	0,19	1,67	0,35	1,48	0,15	0,46
Alkohole	0,01	0,00	0,01	0,00	0,68					
C <sub>18</sub>	0,01	0,00	0,01	0,00	0,68	1,09	0,13	1,12	0,09	0,71
$\omega$ -Hydroxy-säuren	0,03	0,00	0,04	0,00	0,22					
C <sub>16</sub>	0,01	0,00	0,01	0,00	0,54	0,66	0,03	0,77	0,02	<b>0,01</b>
C <sub>18:1</sub>	0,01	0,00	0,01	0,00	0,13	0,83	0,23	1,17	0,15	0,11
C <sub>18:2</sub>	0,01	0,00	0,01	0,00	0,45	1,26	0,24	1,52	0,14	0,20
C <sub>18:3</sub>	0,01	0,00	0,02	0,00	0,28	1,68	0,14	2,12	0,10	<b>0,01</b>
Disäuren	0,25	0,04	0,25	0,03	0,97					
C <sub>16</sub>	0,03	0,00	0,03	0,00	0,73	4,10	0,25	4,33	0,25	0,32
C <sub>18</sub>	0,01	0,00	0,01	0,00	0,81	1,27	0,14	1,42	0,03	0,19
C <sub>18:1</sub>	0,03	0,00	0,03	0,00	0,96	3,71	0,25	4,07	0,23	0,14
C <sub>18:2</sub>	0,18	0,03	0,18	0,02	1,00	22,67	0,17	25,15	0,87	<b>0,03</b>
Mittkettig oxygenierte Säuren	0,01	0,00	0,01	0,00	0,13					
C <sub>16</sub> -HDFS	0,01	0,00	0,01	0,00	0,13	0,83	0,23	1,17	0,15	0,11
2-Hydroxy-säuren	0,31	0,04	0,26	0,04	0,22					
C <sub>16</sub>	0,02	0,00	0,02	0,00	0,26	2,19	0,08	2,15	0,09	0,65
C <sub>22</sub>	0,03	0,00	0,03	0,00	0,64	4,22	0,24	4,47	0,12	0,21
C <sub>24</sub>	0,13	0,02	0,11	0,02	0,23	16,23	0,59	14,96	1,29	0,23
C <sub>24:1</sub>	0,09	0,01	0,07	0,01	0,20	11,02	0,33	10,24	0,61	0,14
C <sub>26</sub>	0,04	0,01	0,03	0,01	0,12	4,62	0,24	3,76	0,53	0,09
C <sub>26:1</sub>	0,01	0,00	0,01	0,00	0,26	1,21	0,08	1,12	0,11	0,34



**Abbildung 7-20** Relative Suberinbestandteile der *shn1/2/3*-Linie

Relative Suberinbestandteile der Mutante und des Wildtyps. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel aus 3 Parallelen mit Standardabweichung. Mittels zweiseitigem *Student's* t-Test wurde auf statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante geprüft. \*: p-Werte 0,01-0,05, \*\*: p-Werte <0,01.

**Tabelle 7-22 Absolute und relative Suberinbestandteile der shn1/2/3-Linie und des Wildtyps**

Aufgelistet sind die arithmetischen Mittel (Mw) und Standardabweichungen (Stabw) der absoluten und relativen Werte, und die p-Werte nach einem zweiseitigen Student's t-Test mit ungleicher Varianz aus drei Parallelen. p-Werte <0,05 in fetten Lettern

Substanz	Gehalt [ $\mu\text{g mg}^{-2}$ ]					Gehalt [%]				
	Wildtyp		shn1/2/3		t-Test p-Wert	Wildtyp		shn1/2/3		t-Test p-Wert
	Mw	Stabw	Mw	Stabw		Mw	Stabw	Mw	Stabw	
<b>Säuren</b>	1,47	0,39	1,85	0,11	0,14					
C <sub>16</sub>	0,45	0,11	0,60	0,03	0,07	2,68	0,11	2,97	0,17	<b>0,03</b>
C <sub>22</sub>	0,90	0,25	1,10	0,08	0,21	5,34	0,43	5,44	0,34	0,75
C <sub>24</sub>	0,13	0,03	0,15	0,01	0,14	0,76	0,07	0,75	0,03	0,73
<b>Alkohole</b>	1,24	0,31	1,46	0,09	0,25					
C <sub>18</sub>	0,65	0,15	0,81	0,04	0,12	3,93	0,19	3,99	0,04	0,60
C <sub>20</sub>	0,36	0,10	0,39	0,07	0,62	2,14	0,15	1,95	0,37	0,39
C <sub>22</sub>	0,23	0,06	0,26	0,01	0,38	1,35	0,10	1,29	0,04	0,32
<b><math>\omega</math>-Hydroxy-säuren</b>	9,49	2,10	11,37	0,66	0,17					
C <sub>16</sub>	1,22	0,27	1,48	0,07	0,15	7,31	0,17	7,31	0,18	0,98
C <sub>18</sub>	0,54	0,12	0,62	0,04	0,26	3,23	0,09	3,05	0,17	0,13
C <sub>18:1</sub>	5,53	1,17	6,70	0,44	0,14	33,36	1,51	33,06	1,53	0,79
C <sub>20</sub>	0,69	0,15	0,82	0,04	0,18	4,15	0,10	4,07	0,07	0,25
C <sub>22</sub>	1,43	0,38	1,66	0,09	0,32	8,54	0,42	8,21	0,12	0,21
C <sub>24</sub>	0,08	0,02	0,09	0,01	0,31	0,46	0,04	0,43	0,02	0,35
<b>Disäuren</b>	4,43	1,05	5,51	0,23	0,13					
C <sub>16</sub>	1,09	0,25	1,35	0,07	0,13	6,53	0,16	6,67	0,10	0,22
C <sub>18</sub>	0,47	0,20	0,68	0,21	0,20	2,78	0,93	3,38	1,08	0,43
C <sub>18:1</sub>	2,36	0,54	2,86	0,15	0,16	14,17	0,20	14,14	0,24	0,86
C <sub>20</sub>	0,29	0,06	0,36	0,02	0,12	1,74	0,06	1,78	0,01	0,37
C <sub>22</sub>	0,22	0,05	0,26	0,06	0,44	1,34	0,03	1,28	0,30	0,71
<b>2-Hydroxy-Säuren</b>	0,03	0,01	0,05	0,01	<b>0,01</b>					
C <sub>24</sub>	0,03	0,01	0,05	0,01	<b>0,01</b>	0,20	0,01	0,26	0,04	0,05
<b>Gesamt</b>	16,67	3,82	20,25	0,75	0,16					

## 7.5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Schematische Darstellung der Kutikula im Querschnitt .....	3
Abbildung 1-2 Suberinisierte Gewebe .....	5
Abbildung 1-3 Transportwege des Wassers und darin gelöster Nährstoffe in der Wurzel .....	6
Abbildung 1-4 Synthese von VLCFA im Fettsäureelongationskomplex.....	9
Abbildung 1-5 Syntheschema der Biopolyester Kutin und Suberin.....	11
Abbildung 1-6 Synthese von $\omega$ -Hydroxysäureglycerin.....	13
Abbildung 1-7 Syntheseweg der Polyesterhauptbestandteile im Kutin und Suberin .....	14
Abbildung 1-8 Modell zum Reaktionsmechanismus der BAHD-Acyltransferasen .....	16
Abbildung 2-1 Versuchsaufbau der Transpirationsstudie .....	31
Abbildung 2-2 Korrelation der Oberfläche zur Einwaage.....	34
Abbildung 2-3 Schematische Darstellung der Umesterungsreaktion .....	37
Abbildung 2-4 Schematische Darstellung der Derivatisierungsreaktion.....	38
Abbildung 3-1 Zusammensetzung des Antherenwachses der Bncyp704b1-Linie und des korrespondierenden Wildtyps.....	43
Abbildung 3-2 Zusammensetzung des Antherenkutins der Bncyp704b1-Linie und des korrespondierenden Wildtyps.....	45
Abbildung 3-3 Makroskopische Untersuchung der Tomatenfruchtkutikeln der Sldcr-Linien und des Wildtyps.....	46
Abbildung 3-4 Mikroskopische Untersuchung der Kutikulaoberflächen der Sldcr-Linien und des Wildtyps.....	47
Abbildung 3-5 Mikroskopische Untersuchung der Kutikulaquerschnitte der Sldcr-Linien und des Wildtyps.....	48
Abbildung 3-6 REM-Untersuchung der Tomatenfruchtkutikeln der Sldcr-Linien und des Wildtyps ....	49
Abbildung 3-7 Flussraten ermittelt an Kutikeln der Sldcr-Linien und des Wildtyps .....	51
Abbildung 3-8 Leitwerte der Tomatenfruchtkutikeln der Sldcr-Linien und des Wildtyps .....	52
Abbildung 3-9 Leitwerte der Sldcr-Linien und des Wildtyps in Abhängigkeit des Massenflächen- Verhältnis .....	52
Abbildung 3-10 Zusammensetzung des Tomatenfruchtwachses der Sldcr-Linien und des korrespondierenden Wildtyps.....	54
Abbildung 3-11 Zusammensetzung des Tomatenfruchtwachses der Sldcr-Linien und des korrespondierenden Wildtyps.....	55
Abbildung 3-12 Zusammensetzung des Tomatenfruchtkutins der Sldcr-Linien und des korrespondierenden Wildtyps.....	57
Abbildung 3-13 Zusammensetzung des Tomatenfruchtkutins der Sldcr-Linien und des korrespondierenden Wildtyps.....	58
Abbildung 3-14 Zusammensetzung des Sprossachsenwachses der abcg11-Linie und des korrespondierenden Wildtyps.....	60
Abbildung 3-15 Zusammensetzung des Sprossachsenkutins der abcg11-Linie und des korrespondierenden Wildtyps.....	61
Abbildung 3-16 Zusammensetzung des Sprossachsenkutins der ABCG11-OE-Linie und des korrespondierenden Wildtyps.....	62
Abbildung 3-17 Zusammensetzung des Blattkutins der abcg11-Linie und des korrespondierenden Wildtyps.....	64

Abbildung 3-18 Zusammensetzung des Blattkutins der Überexpressionslinie ABCG11-OE und des korrespondierenden Wildtyps.....	65
Abbildung 3-19 Zusammensetzung des Blütenkutins der <i>abcg11</i> -Linie und des korrespondierenden Wildtyps.....	66
Abbildung 3-20 Zusammensetzung des Schotenkutins der <i>abcg11</i> -Linie und des korrespondierenden Wildtyps.....	68
Abbildung 3-21 Zusammensetzung des Wurzelsuberins der <i>abcg11</i> -Linie und des korrespondierenden Wildtyps.....	69
Abbildung 3-22 Zusammensetzung des Wurzelsuberins der Überexpressionslinie ABCG11-OE und des korrespondierenden Wildtyps.....	71
Abbildung 3-23 Zusammensetzung des Blütenwachses der <i>shn1/2/3</i> -Linie und des korrespondierenden Wildtyps.....	73
Abbildung 3-24 Zusammensetzung des Blütenkutins der <i>shn1/2/3</i> -Linie und des korrespondierenden Wildtyps.....	75
Abbildung 3-25 Zusammensetzung des Blattwachses <i>shn1/2/3</i> -Linie und des korrespondierenden Wildtyps.....	76
Abbildung 3-26 Zusammensetzung des Blattkutins der <i>shn1/2/3</i> -Linie und des korrespondierenden Wildtyps.....	78
Abbildung 3-27 Zusammensetzung des Wurzelsuberins der <i>shn1/2/3</i> -Linie und des korrespondierenden Wildtyps.....	79
Abbildung 4-1 Rolle der BnCYP704B1 $\omega$ Hydroxylase in der Kutinbiosynthese.....	83
Abbildung 4-2 Einordnung der untersuchten Gene in das Modell der Polyester synthese.....	101
Abbildung 7-1 Relative Verteilung des Rapsantherenwachses von Bncyp704b1 und Wildtyps .....	116
Abbildung 7-2 Zusammensetzung des Antherenkutins der Bncyp704b1-Linie und Wildtyps .....	117
Abbildung 7-3 Relative Verteilung der Wachsbestandteile der Sldcr-Linien und des Wildtyps .....	120
Abbildung 7-4 Relative Verteilung der Kutinbestandteile der Sldcr-Linien und des Wildtyps.....	125
Abbildung 7-5 Relative Verteilung der Wachsbestandteile der <i>abcg11</i> -Linie und des Wildtyps.....	128
Abbildung 7-6 Relative Verteilung des Sprossachsenkutins der ABCG11-Überexpressionslinie und des Wildtyps.....	130
Abbildung 7-7 Relative Verteilung des Sprossachsenkutins der <i>abcg11</i> -Knockdownlinie und des Wildtyps.....	130
Abbildung 7-8 Relative Zusammensetzung des Blattkutins der ABCG11-Überexpressionslinie und des Wildtyps.....	133
Abbildung 7-9 Relative Zusammensetzung des Blattkutins der <i>abcg11</i> -Knockdownlinie und des Wildtyps.....	133
Abbildung 7-10 Relative Verteilung der Blütenkutinbestandteile der <i>abcg11</i> -Knockdownlinie .....	136
Abbildung 7-11 Relative Verteilung der Schotenkutinbestandteile der <i>abcg11</i> -Knockdownlinie.....	137
Abbildung 7-12 Relative Verteilung der Suberinbestandteile der <i>abcg11</i> -Knockdownlinie und des Wildtyps.....	140
Abbildung 7-13 Relative Verteilung der Suberinbestandteile der <i>abcg11</i> -Überexpressionslinie und des Wildtyps.....	142
Abbildung 7-14 In silico-Studie der Gewebsexpression von SHN1 .....	144
Abbildung 7-15 Coexpression von SHN1 und SHN3 .....	145
Abbildung 7-16 Relative Verteilung der Blütenwachsbestandteile der <i>shn1/2/3</i> -Linie und des Wildtyps .....	146

Abbildung 7-17 Relative Verteilung der Blütenkutinbestandteile der <i>shn1/2/3</i> -Linie und des Wildtyps .....	147
Abbildung 7-18 Relative Blütenwachsbestandteile der <i>shn1/2/3</i> -Linie und des Wildtyps.....	150
Abbildung 7-19 Relative Blattkutinbestandteile der <i>shn1/2/3</i> -Linie und des Wildtyps.....	150
Abbildung 7-20 Relative Suberinbestandteile der <i>shn1/2/3</i> -Linie.....	153

## 7.6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1 Zusammensetzung des Kutin- und Suberinpolyesters höherer Pflanzen.....	7
Tabelle 2-1 Pflanzenmaterialmenge zur Wachsextraktion .....	35
Tabelle 2-2 Pflanzenmaterialmenge zur Umesterung.....	36
Tabelle 2-3 Einstellungen der Gaschromatographen für die Wachs-, Kutin- und Suberinanalyse .....	39
Tabelle 3-1 Signifikant verschiedene Kutinmengen der Säuren, Alkohole und 2-Hydroxysäuren.....	45
Tabelle 3-2 Signifikant unterschiedliche Suberinmengen .....	71
Tabelle 3-3 Signifikant verschiedene Kutinmengen .....	75
Tabelle 7-1 Gehalte des Rapsantherenwachs .....	107
Tabelle 7-2 Gehalte des Rapsantherenkutins .....	109
Tabelle 7-3 Leitwerte und statistische Tests zur Transpirationsstudie .....	110
Tabelle 7-4 Massenflächen der Kutikeln aus der Transpirationsstudie .....	110
Tabelle 7-5 Absolute Gehalte der Tomatenkutikulawachse .....	112
Tabelle 7-6 Relative Gehalte der Tomatenkutikulawachse.....	113
Tabelle 7-7 Absolute Gehalte des Tomatenfruchtkutins .....	114
Tabelle 7-8 Relative Gehalte des Tomatenfruchtkutins.....	117
Tabelle 7-9 Absolute und relative Gehalte der Sprossachsenwachse.....	121
Tabelle 7-10 Gehalte des Sprossachsenkutins der <i>abcg11</i> -Knockdownlinie .....	123
Tabelle 7-11 Gehalte des Sprossachsenkutins der <i>ABCG11</i> -Überexpressionslinie.....	124
Tabelle 7-12 Gehalte des Blattkutins der <i>abcg11</i> -Knockdownlinie.....	126
Tabelle 7-13 Gehalte des Blattkutins der <i>ABCG11</i> -Überexpressionslinie .....	127
Tabelle 7-14 Absolute und relative Gehalte des Blütenkutins.....	130
Tabelle 7-15 Absolute und relative Gehalte des Schotenkutins .....	131
Tabelle 7-16 Gehalte des Wurzelsuberins der <i>abcg11</i> -Knockdownlinie.....	133
Tabelle 7-17 Gehalte des Wurzelsuberins der <i>ABCG11</i> -Überexpressionslinie .....	135
Tabelle 7-18 Absolute und relative Blütenwachsgehalte der <i>shn1/2/3</i> -Linie.....	140
Tabelle 7-19 Absolute und relative Blütenkutingehalte der <i>shn1/2/3</i> -Linie.....	141
Tabelle 7-20 Absolute und relative Blattwachsgehalte der <i>shn1/2/3</i> -Linie und des Wildtyps.....	143
Tabelle 7-21 Absolute und relative Blattkutinbestandteile der <i>shn1/2/3</i> -Linie und des Wildtyps.....	144
Tabelle 7-22 Absolute und relative Suberinbestandteile der <i>shn1/2/3</i> -Linie und des Wildtyps.....	146

## **Erklärung**

---

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfsmittel 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

## Publikationen

---

**Chen W, Yu XH, Zhang K, Shi JX, De Oliveira S, Schreiber L, Shanklin J, Zhang D (2011)**

Male Sterile 2 encodes a plastid-localized fatty acyl carrier protein reductase required for pollen exine development in Arabidopsis. *Plant Physiology* Vol. 157 No. 2 842-853

**Shi JX, Malitsky S, De Oliveira S, Branigan C, Franke R, Schreiber L, Aharoni A (2011)**

SHINE transcription factors act redundantly to pattern the archetypal surface of Arabidopsis flower organs. *PLoS Genetics* Vol. 7 Issue 5 e1001388

**Remus-Emsermann MNP, De Oliveira S, Schreiber L, Leveau JH (2011)**

Quantification of lateral heterogeneity in carbohydrate permeability of isolated plant leaf cuticles. *Frontiers Microbiology* 2:197. doi:10.3389

**Ballmann C, De Oliveira S, Gutenberger A, Waßmann F, Schreiber L (2011)**

A radioactive assay allowing the quantitative measurement of cuticular permeability of intact Arabidopsis thaliana leaves. *Planta* Vol. 234 No. 1 9-20

**Tamaoki D, Karahara I, Nishiuchi T, De Oliveira S, Schreiber L, Wakasugi T, Yamada K, Yamaguchi K, Kamisaka S (2009)**

Transcriptome profiling in Arabidopsis inflorescence stems grown under hypergravity in terms of cell walls and plant hormones. *Advances in Space Research* Vol. 44 No. 2 245-253

## Danksagung

---

Ich möchte mich außerordentlich bei Prof. Dr. Lukas Schreiber und PD Rochus Benni Franke für die Möglichkeit bedanken in der Arbeitsgruppe zu promovieren, sowie für die konstruktive Kritik und Motivation, die mir halfen diese Arbeit abzuschließen.

Mein Dank geht auch an die lieben Kollegen der AG, sowie die Ehemaligen, die stets für eine gute Ablenkung sorgten.

Bei Daniela Nosbüsch und Viktoria Zeisler möchte ich mich für das Korrekturlesen bedanken.

Und ein ultimatives Riesen-Danke-schön an die Korrektoren Fritz Waßmann und Marc Frenger für den zeitlichen und nervlichen Aufwand, die vielen Gespräche und offenen Türen.

Und zum Schluss einen weisen Rat:

Tatsachen muss man kennen, bevor man sie verdrehen kann.

Mark Twain