

Die pflanzliche Kutikula

Aufbau, Funktion und epiphyller Lebensraum

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Viktoria Valeska Zeisler

aus Bonn

Bonn 2013

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Lukas Schreiber

2. Gutachter: Prof. Dr. Wilhelm Barthlott

Tag der Promotion: 22.11.2013

Erscheinungsjahr: 2013

1	Einleitung.....	6
1.1	Die Kutikula als Grenzfläche zur Atmosphäre	7
1.2	Kutikuläre Wachse, Synthese und Zusammensetzung	10
1.3	Die Kutikula als Transpirationsbarriere am Blatt.....	10
1.4	Die Rolle der Kutikula bei der Aufnahme von Wirkstoffen ins Blatt.....	11
1.5	Die Kutikula in der Phyllosphärenforschung.....	13
1.6	Zielsetzung der Arbeit	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Gewinnung isolierter Kutikulamembranen.....	18
2.1.1	Herstellung wachsfreier Matrixmembranen (MX)	18
2.2	Analytische Untersuchungen	19
2.2.1	Gesamtwachsextraktionen isolierter Kutikulamembranen und intakter Blätter	19
2.2.2	Selektive Entfernung der epikutikulären Wachse	20
2.2.3	Selektive Entfernung der epikutikulären Wachse mit Kollodium	20
2.2.4	Selektive Entfernung der epikutikulären Wachse mit Gummi arabicum.....	21
2.2.5	Selektive Entfernung der epikutikulären Wachse mit Celluloseacetat	22
2.2.6	Bestimmung der Restwachsmenge.....	22
2.2.7	Wachsextraktion von der Ober- und Unterseite von <i>Solanum tuberosum</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Vitis vinifera</i> und <i>Malus domestica</i> Blätter unterschiedlichen Alters	23
2.3	Derivatisierung und gaschromatographische Untersuchungen	25
2.3.1	Gaschromatografie	25
2.3.2	Massenspektrometrie.....	26
2.3.3	Vorgang zur Überprüfung der Säulenqualität	26
2.3.4	Statistische Auswertung und graphische Darstellung der analytischen Daten	27
2.4	Radioaktive Transpirationmessungen	28
2.4.1	Messung der Transpiration vor und nach selektivem Entfernen der Oberflächenwachse	28
2.4.2	Messung der Transpiration vor und nach Lösungsmittelapplikation	30
2.4.3	Bestimmung der Transpiration und statistische Auswertung	31
2.5	Bakterienanzucht und Herstellung von Bateriaüberständen für Transpirationsstudien	32
2.5.1	Anzucht von <i>Pseudomonas syringae</i> Bakterien	32
2.5.2	Herstellung von Bakteriensuspensionen für Transpirationmessungen.....	33
2.5.3	Herstellung von Bakterienüberständen für Transpirationmessungen.....	33
2.5.4	Überprüfung der Tensidproduktion.....	33
2.6	Einfluss von Bakteriensuspensionen, Bakterienüberständen und auf gereinigten Extrakten auf die Transpiration.....	34
2.6.1	Einfluss von Bakteriensuspensionen auf die Transpiration von <i>Prunus laurocerasus</i> und <i>Populus canescens</i> Kutikulamembranen	34

2.6.2	Einfluss von Bakterienüberständen auf die Transpiration von <i>Prunus laurocerasus</i> und <i>Populus canescens</i> Kutikulamembranen	34
2.6.3	Einfluss von auf gereinigten Biotensid-Extrakten auf die Transpiration von <i>Prunus laurocerasus</i> Kutikulamembranen.....	35
2.6.4	Auswertung der Transpirationsstudien und Statistik.....	36
2.7	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen	36
2.8	Kontaktwinkelmessungen	37
2.8.1	Kontaktwinkelmessungen isolierter Kutikulamembranen und intakter Blattscheiben	38
2.9	Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen	38
2.9.1	Das Herbizid Bentazon	39
2.9.2	Vorgang der Versuche und Versuchsaufbau.....	39
2.9.3	Statistische Auswertung und graphische Darstellung der Chlorophyll-Fluoreszenz Daten.....	41
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Oberflächencharakterisierung ausgewählter Nutzpflanzen.....	43
3.1.1	Verwendetes Blattmaterial und morphologische Beschreibung der Pflanzen ..	43
3.1.2	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen	44
3.1.2.1	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von <i>Solanum tuberosum</i> Blättern	44
3.1.2.2	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von <i>Solanum lycopersicum</i> Blättern	47
3.1.2.3	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von <i>Vitis vinifera</i> Blättern	50
3.1.2.4	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von <i>Malus domestica</i> Blättern	53
3.1.3	Chemisch analytische Untersuchungen der Blattoberflächenwachse.....	56
3.1.3.1	Chemisch analytische Untersuchungen von <i>Solanum tuberosum</i> Blattwachsen.....	56
3.1.3.1.1	Selektive Entfernung der Wachse von <i>Solanum tuberosum</i> Blattoberseiten mittels Kollodium	60
3.1.3.2	Chemisch analytische Untersuchungen von <i>Solanum lycopersicum</i> Blattwachsen.....	63
3.1.3.2.1	Selektive Entfernung der Oberflächenwachse von <i>Solanum lycopersicum</i> Blättern mittels Kollodium	65
3.1.3.3	Chemisch analytische Untersuchungen von <i>Vitis vinifera</i> Blattwachsen..	65
3.1.3.3.1	Selektive Entfernung der Wachse von <i>Vitis vinifera</i> Blattoberseiten mittels Kollodium.....	68
3.1.3.4	Chemisch analytische Untersuchungen von <i>Malus domestica</i> Blattwachsen.....	72
3.1.3.4.1	Selektive Entfernung der Wachse von <i>Malus domestica</i> Blattoberseiten mittels Kollodium.....	75

3.1.4	Benetzungseigenschaften.....	78
3.1.4.1	Kontaktwinkelmessungen	79
3.1.5	Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen	80
3.1.5.1	Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen an <i>Solanum tuberosum</i> Blättern ...	81
3.1.5.2	Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen an <i>Solanum lycopersicum</i> Blättern	82
3.1.5.3	Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen an <i>Vitis vinifera</i> Blättern.....	83
3.1.5.4	Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen an <i>Malus domestica</i> Blättern.....	84
3.2	Die Kutikula als Transpirationsbarriere.....	85
3.2.1	Analytische Untersuchungen	85
3.2.1.1	Abheben der epikutikulären Wachse von <i>Monstera deliciosa</i> Blattscheiben mit Kollodium.....	86
3.2.1.2	Abheben der epikutikulären Wachse von <i>Prunus laurocerasus</i> Blattscheiben mit Gummi arabicum	89
3.2.1.3	Abheben der epikutikulären Wachse von <i>Prunus laurocerasus</i> Kutikeln mit Celluloseacetat.....	92
3.2.2	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen	95
3.2.2.1	Die selektive Entfernung der Oberflächenwachse mit drei verschiedenen Ansätzen	95
3.2.3	Transpirationsmessungen.....	100
3.2.3.1	Messung der Transpiration vor und nach selektivem Entfernen der Oberflächenwachse von isolierten Kutikulamembranen und intakten Blattscheiben mit Hilfe von Kollodium.....	100
3.2.3.2	Messung der Transpiration vor und nach selektivem Entfernen der Oberflächenwachse von intakten Blattscheiben mit Gummi arabicum	102
3.2.3.3	Messung der Transpiration vor und nach selektivem Entfernen der Oberflächenwachse von isolierten Kutikulamembranen mit Celluloseacetat.....	103
3.2.4	Der Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf die kutikuläre Barriere	103
3.3	Die Kutikula als epiphyller Lebensraum	105
3.3.1	Analytische Untersuchungen	105
3.3.1.1	Gesamtwachsanalyse von <i>Prunus laurocerasus</i> Kutikulamembranen ..	105
3.3.1.2	Gesamtwachsanalyse von <i>Populus canescens</i> Kutikulamembranen	107
3.3.2	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der <i>Pseudomonas syringae</i> Bakterien.....	109
3.3.3	Überprüfung der Bakteriensuspensionen, Überstände und Extrakte auf Tensidproduktion, Spreitungsverhalten auf Parafilm und Kontaktwinkelmessungen ..	110
3.3.4	Transpirationsmessungen.....	111
3.3.4.1	Einfluss tensidproduzierender Bakterien auf die Transpiration von <i>Prunus laurocerasus</i> Kutikulamembranen	111
3.3.4.2	Einfluss von Bakterienüberständen auf die Transpiration von <i>Prunus laurocerasus</i> Kutikulamembranen	113
3.3.4.3	Einfluss von grob auf gereinigten Biotensid-Extrakten auf die Transpiration von <i>Prunus laurocerasus</i> Kutikulamembranen.....	114

3.3.4.4	Einfluss tensidproduzierender Bakterien auf die Transpiration von <i>Populus canescens</i> Kutikulamembranen.....	115
3.3.4.5	Einfluss von Bakterienüberständen auf die Transpiration von <i>Populus canescens</i> Kutikulamembranen.....	116
4	Diskussion	118
4.1	Oberflächencharakterisierung ausgewählter Nutzpflanzen.....	119
4.1.1	Verwendetes Blattmaterial und morphologische Beschreibung der Pflanzen.....	120
4.1.2	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen	121
4.1.3	Chemisch analytische Untersuchungen der Blattoberflächenwachse.....	122
4.1.4	Benetzungseigenschaften.....	127
4.1.5	Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen	130
4.1.6	Oberflächencharakterisierung ausgewählter Nutzpflanzen, Zusammenfassung.	132
4.2	Die Kutikula als Transpirationsbarriere.....	134
4.2.1	Analytische Untersuchungen	136
4.2.1.1	Abheben der epikutikulären Wachse von <i>Monstera deliciosa</i> Blattscheiben mit Kollodium.....	136
4.2.1.2	Abheben der epikutikulären Wachse von <i>Prunus laurocerasus</i> Blattscheiben mit Gummi arabicum	137
4.2.1.3	Abheben der epikutikulären Wachse von <i>Prunus laurocerasus</i> Kutikeln mit Celluloseacetat.....	138
4.2.2	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen	139
4.2.2.1	Die selektive Entfernung der Oberflächenwachse mit drei verschiedenen Ansätzen	139
4.2.3	Transpirationsmessungen.....	141
4.2.3.1	Messung der Transpiration vor und nach selektivem Entfernen der Oberflächenwachse von isolierten Kutikulamembranen und intakten Blattscheiben mit Kollodium	141
4.2.3.2	Messung der Transpiration vor und nach selektivem Entfernen der Oberflächenwachse von intakten Blattscheiben mit Gummi arabicum	143
4.2.3.3	Messung der Transpiration vor und nach selektivem Entfernen der Oberflächenwachse von isolierten Kutikulamembranen durch Celluloseacetat.....	143
4.2.4	Der Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf die Barriere	144
4.2.5	Die Kutikula als Transpirationsbarriere, Zusammenfassung.....	145
4.3	Die Kutikula als epiphyller Lebensraum	147
4.3.1	Analytische Untersuchungen	149
4.3.1.1	Gesamtwachsanalyse von <i>Prunus laurocerasus</i> und <i>Populus canescens</i> Kutikulamembranen.....	149
4.3.2	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der <i>Pseudomonas syringae</i> Bakterien.....	150
4.3.3	Überprüfung der Bakteriensuspensionen, Überstände und Extrakte auf Tensidproduktion, Spreitungsverhalten auf Parafilm und Kontaktwinkelmessungen ..	150
4.3.4	Transpirationsmessungen.....	151

4.3.4.1	Einfluss tensidproduzierender Bakterien auf die Transpiration von <i>Prunus laurocerasus</i> Kutikulamembranen	152
4.3.4.2	Einfluss von Bakterienüberständen auf die Transpiration von <i>Prunus laurocerasus</i> Kutikulamembranen	152
4.3.4.3	Einfluss von auf gereinigten Biotensid-Extrakten auf die Transpiration von <i>Prunus laurocerasus</i> Kutikulamembranen	153
4.3.4.4	Einfluss tensidproduzierender Bakterien auf die Transpiration von <i>Populus canescens</i> Kutikulamembranen.....	154
4.3.4.5	Einfluss von Bakterienüberständen auf die Transpiration von <i>Populus canescens</i> Kutikulamembranen.....	156
4.3.5	Die Kutikula als epiphyller Lebensraum, Zusammenfassung	157
5	Zusammenfassung	159
6	Literaturverzeichnis.....	162
7	Anhang	170
7.1	Abbildungsverzeichnis	171
7.2	Tabellenverzeichnis	175
7.3	Formelverzeichnis.....	175
7.4	Abkürzungsverzeichnis	176
7.5	Chemikalienliste.....	178
7.6	Lösungen und Medien	178
7.6.1	Enzymlösung	178
7.6.2	Borax-Lösung	179
7.6.3	KB Agar	179

1 Einleitung

1.1 Die Kutikula als Grenzfläche zur Atmosphäre

Fossilienfunde belegen, dass schon die ersten Landpflanzen vor über 400 Millionen Jahren eine Kutikulamembran aufwiesen. Auch wenn sich Aufbau und chemische Zusammensetzung dieser Kutikulamembran von der moderner Landpflanzen unterscheidet, war die Funktion dieselbe (Edwards *et al.*, 1996). Sie stellte einen Schutz vor Austrocknung und UV-Strahlung dar und ermöglichte den kontrollierten Gasaustausch zwischen der Pflanze und der Atmosphäre. Durch die enzymatische Isolation von Kutikulamembranen und der Verwendung von chemischen und mikroskopischen Untersuchungen, konnte der Aufbau der Kutikulamembranen höherer Landpflanzen detailliert beschrieben werden. Die Kutikula bedeckt die Epidermis aller primären oberirdischen Pflanzenorgane wie Früchte, Blätter, Stängel und Blüten. Sie kann in drei große Abschnitte unterteilt werden (Abbildung 1). In und auf der lamellierten pektin- und zellulosefreien Schicht findet man auf- und eingelagerte Wachse (CP). Unter ihr ist eine mit Polysaccharid-Fasern durchsetzte Schicht zu finden, in denen weitere intrakutikuläre Wachse lokalisiert sind (CL). Diese mit Polysaccharid-Fasern durchzogene Schicht wird durch eine pektinreiche Schicht an die Zellwände der Epidermis gebunden (CW).

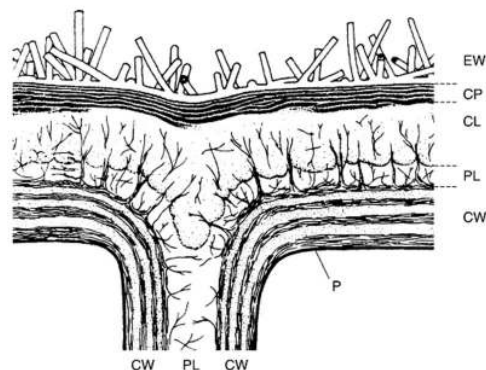


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer pflanzlichen Kutikula (geändert nach Jeffree, 1986)

Die Abbildung zeigt einen Querschnitt durch eine generalisierte Pflanzenkutikula: EW, epikutikuläre Wachse; CP *cuticular proper*, mit lamellenartiger Struktur, Vorkommen von intrakutikulären Wachsen; CL *cuticular layer*, mit Polysaccharid-Fasern durchsetzter Teil der Kutikula, Vorkommen von intrakutikulären Wachsen; PL, Pektinreiche Schicht und Mittellamelle; CW, Zellwand; PI, Plasmalemma.

Die Dicke der Kutikulamembran kann zwischen verschiedenen Arten stark variieren. Die Kutikula von *Arabidopsis thaliana* Blättern weist eine Dicke von ca. 30 nm, die von Apfelfrüchten von 30 µm auf (Schreiber und Schönherr, 2009).

Chemisch betrachtet besteht sie aus zwei großen Hauptkomponenten, dem Kutinpolymer und auf- und eingelagerten Wachsen. Das Kutinpolymer, die mechanisch stabile Matrix der Kutikula, kann durch Depolymerisation in seine Monomere abgebaut und chemisch analysiert werden (Walton, 1990). Es besteht vornehmlich aus C₁₆ und C₁₈

ω -Hydroxyfettsäuren, die über Esterbindungen miteinander verknüpft sind (Espelie *et al.*, 1980; Kolattukudy, 1981). Weiter können aromatische Komponenten (Hunt und Baker, 1980) und Kohlenhydrate (Fang *et al.*, 2001) im Kutinpolymer nachgewiesen werden, die aber nur einen Bruchteil der Gesamtmasse ausmachen.

Wachse sind im Gegensatz zum Kutin in organischen Lösungsmitteln löslich und stellen die Hauptbarriere der Pflanze gegen den Wasserverlust an die Atmosphäre dar (Schönherr, 1976). Die Wachse werden in den Epidermiszellen synthetisiert (Kunst und Samuels, 2003). Sie stellen eine Mischung aus aliphatischen Lipiden dar, deren Zusammensetzung artspezifisch variieren kann (Jetter *et al.*, 2008). Neben den beiden Hauptkomponenten Kutin und Wachs kann das Polymer Cutan gefunden werden, dessen Funktion und Struktur bisher nur unzureichend aufgeklärt ist (Nip *et al.*, 1986). Die Möglichkeit der Kutikulaisolation durch enzymatischen Verdau bietet Vorteile in vielen transportphysiologischen Experimenten. Dabei kann die Interaktion der Kutikula mit Mikroorganismen, die Rolle der Wachse als Transpirationsbarriere und der Schutz vor Schäden durch UV-Strahlung unter kontrollierten Bedingungen untersucht werden. Der Einsatz von molekularbiologischen Methoden und die Untersuchung verschiedener Wachs- und Kutinmutanten ermöglichte es, nähere Einblicke in die genetischen und enzymatischen Prozesse der Wachs- und Kutinbiosynthese zu erhalten.

Die pflanzliche Kutikula weist eine Heterogenität auf. Die Dicke der Kutikulaschicht als auch die Wachskomposition kann innerhalb eines Blattes je nach Lokalisation unterschiedlich sein. Mikroskopische Untersuchungen mit diffundierenden Farbstoffen haben gezeigt, dass die kutikulären Bereiche, die Trichome umgeben, im Vergleich zur Restkutikula permeabler sind (Schönherr, 2006). Auch die Wachszusammensetzung zeigt lokale Heterogenität. Die Wachszusammensetzung und Menge der Blattober- und Unterseiten können starke Unterschiede aufweisen. Dies kann zum einen durch unterschiedlich wirkende Umweltfaktoren und zum anderen durch unterschiedliche Enzymaktivitäten in Epidermiszellen der Blattober- und Unterseite erklärt werden (Gülz, 1994). Bestimmte Substanzklassen zeigen ebenfalls eine heterogene Verteilung. Diese Verteilung ist sowohl im Querschnitt als auch im Längsschnitt der Kutikula zu erkennen. Pentazyklische Triterpene machen bei vielen Rosaceae, wie auch bei *Prunus laurocerasus* den Hauptbestandteil der Wachse aus (Jetter *et al.*, 2000). Untersuchungen mittels FTIR (Fourier-Transform-Infrarotspektrometer) und Gaschromatografie haben in der Vergangenheit gezeigt, dass die Triterpene vornehmlich in tieferen Schichten der Kutikula lokalisiert sind und demnach den intrakutikulären Wachsen zugeordnet werden. Langkettige aliphatische Bestandteile konnten im Vergleich dazu sowohl auf als auch in der Kutikula nachgewiesen werden.

Die Wachszusammensetzung der Blätter ist keinesfalls statisch. Während der Ontogenese vom jungen zum alten Blatt kann es zu einer morphologischen und chemischen Veränderung der Wachse kommen (Jetter und Schäffer, 2001). Neben der Heterogenität der Kutikula aufgrund unterschiedlicher Wachszusammensetzungen, Wachsmorphologien und unterschiedlicher Kutikuladicken, ist bekannt, dass der Transport von polaren organischen Molekülen und geladenen Ionen in das Blatt und aus dem Blatt an die Blattoberfläche bevorzugt an besonderen Stellen, den sogenannten polaren Poren stattfindet. Polare und geladene Stoffe können aufgrund ihrer Ladung und Größe nicht oder nur schwer durch die lipophile Kutikula diffundieren und bevorzugen die Diffusion durch polare Poren (Abbildung 2). Das erhöhte Vorkommen polarer Transportpfade an der Basis von Trichomen, der Blattnervatur und in der Kutikula über antiklinen Zellwänden und über Stomata konnte mikroskopisch durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen werden (Schönherr, 2006).

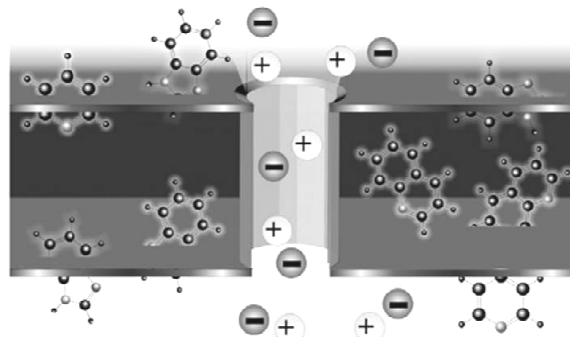


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer polaren Pore

Gezeigt ist eine polare Pore, die eine Membran durchquert. Die nicht geladenen kleinen Teilchen können durch die Membran diffundieren. Die geladenen Substanzen können nur den Weg durch die polaren Poren nehmen (Schönherr, 2006).

Die inhomogene Verteilung der polaren Poren und die damit einhergehende Ungleichverteilung von polaren organischen Substanzen auf der Blattoberfläche hat Auswirkungen auf die Ansiedlung epiphyller Bakterien. Bakterien besiedeln bevorzugt die Kutikula im Bereich der polaren Poren (Krimm *et al.*, 2005). Ungleiche Verteilungen von Trichomen, Stomata auf der Blattober- und Blattunterseite und auch die Topographie des Blattes selber tragen weiter zu der Heterogenität der Blattoberfläche bei. All diese morphologischen, physiologischen und chemischen Unterschiede müssen berücksichtigt werden, um Ergebnisse aus Interaktionsstudien mit Bakterien, Transpirationmessungen und Aufnahmeexperimenten besser verstehen und interpretieren zu können.

1.2 Kutikuläre Wachse, Synthese und Zusammensetzung

Die Synthese und Funktionalisierung der Wachse findet in den Plastiden, dem Zytoplasma und dem Endoplasmatischen Reticulum statt. Im Stroma der Plastiden, welches der Lokalisationsort der Fettsäuresynthasekomplexe ist, findet der erste Schritt der Wachsbiosynthese, die Bildung von C₁₆ (Palmitinsäure) und C₁₈ (Stearinsäure) Fettsäuren, statt. Am Endoplasmatischen Reticulum werden diese durch *Fatty Acid Elongation* Komplexe sequenziell um zwei Kohlenstoffatome verlängert und durch Hydroxylierung oder Oxygenierung funktionalisiert. Eine Reduktion führt zu Aldehyden, eine Decarbonylierung zu ungeradzahligen Alkanen und zwei hintereinander geschaltete Oxidationsreaktionen zu sekundären Alkoholen und Ketonen. Primäre Alkohole entstehen durch eine weitere Reduktion und β -Diketone und Acyl-Ester durch eine β -ketoacyl-Elongation (Lemieux, 1996). Neben langkettigen aliphatischen Bestandteilen besteht das Wachs einiger Arten zudem aus Triterpenen, die über den Triterpensyntheseweg gebildet werden (Guhling *et al.*, 2006). Die häufigsten Terpene sind pentazyklische Terpenalkohole, wie das Triterpen β -Amyrin bei *Hedera helix*, oder Säuren, wie die von *Prunus laurocerasus* bekannten Oleanol- und Ursolsäuren (Jetter *et al.*, 2000). Der genaue Transportmechanismus der Wachse vom Endoplasmatischen Reticulum durch Plasmamembran und Zellwand an die Oberfläche ist nicht identifiziert. Durch molekularbiologische Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana* konnten zwei *ATP binding cassette* (ABC) Transporter charakterisiert werden, die vermutlich diese Funktion übernehmen (Bird, 2008). Weiter soll der Transport an die Oberfläche gemeinsam mit dem Durchtritt von Wasser durch die Kutikula (Neinhuis *et al.*, 2001), oder durch Lipid-Transfer-Proteine (Pyee *et al.*, 1994) und kutikuläre Mikrokanäle erfolgen können.

1.3 Die Kutikula als Transpirationsbarriere am Blatt

Mit dem Landgang der Pflanzen aus einer aquatischen Umgebung mussten diese Schutzmechanismen ausbilden, um sich vor einem unkontrollierten Wasserverlust aufgrund des negativen Wasserpotentials der Atmosphäre, zu schützen. Es musste ein Gleichgewicht zwischen Wasserverlust durch Transpiration und gleichzeitiger Aufnahme von Wasser und gelösten Nährstoffen über die Wurzel etabliert werden. Unter dem Begriff Transpiration versteht man die Abgabe von Wasser durch Blätter, Blüten und Stängel an die Umwelt. Dabei wird zwischen der stomatären und kutikulären Transpiration unterschieden. Der Transport von Wasser kann auf zwei Wegen durch die Kutikulamembran erfolgen. Im Falle der kutikulären Transpiration kann Wasser zum einen durch den lipophilen Weg, zum anderen über den hydrophilen Weg der polaren Poren diffundieren (Schreiber, 2005). Eine aktive Regulation der Transpiration durch Öffnung und Schließung der Stomata wird erst

funktional durch Einlagerung von Wachsen in die Kutikula, welche die Hauptbarriere gegen den Wasserverlust darstellen, ergänzt. Transpirationsexperimente mit totalextrahierten Membranen (MX) konnten die Wichtigkeit der Wachse als Transpirationsschutz unterstreichen (Schönherr und Riederer, 1989). Die Transpiration steigt je nach Pflanzenart nach der Wachsextraktion in organischem Lösungsmittel um 2-3 Größenordnungen an.

Weiter ist die Transpiration von abiotischen Faktoren wie der Temperatur (Riederer und Schneider, 1990), der Lichtintensität und der herrschenden Luftfeuchte (Schreiber *et al.*, 2001) abhängig. Eine erhöhte Luftfeuchte führt durch die Bindung von Wasser an den polaren Domänen der Kutikula zu einer Erhöhung der Transpiration (Chamel *et al.*, 1991). Neben der Zunahme der Transpiration durch UV-Strahlung, hohe Temperaturen oder erhöhte Luftfeuchtigkeit kann die Transpiration durch die Applikation von technischen (Schönherr und Baur, 1994), oder bakterienproduzierten Tensiden erhöht werden.

Während der Evolution haben sich trotz gleicher Umgebung bei verschiedenen Pflanzenarten oder sogar innerartlich zwischen verschiedenen Organen einer Pflanze starke Unterschiede in der Wachszusammensetzung und Permeabilität ausgebildet. Bis heute ist der Grund dieser Unterschiede nicht aufgeklärt. Der Einsatz isolierter Kutikulamembranen in Transpirationsmessungen, parallel durchgeführten chemischen Analysen und mikroskopischen Untersuchungen sind zur Aufklärung der Funktionsweise der kutikulären Transpirationsbarriere unersetzlich.

1.4 Die Rolle der Kutikula bei der Aufnahme von Wirkstoffen ins Blatt

Isolierte Kutikulamembranen können sowohl in Transpirationsstudien, als auch für die Untersuchung der Wirkstoffaufnahme über die Blattoberfläche verwendet werden. Die Aufnahme eines Wirkstoffes ins Blatt erfolgt durch seine Sorption in der Kutikula, der Diffusion durch die Kutikula und der anschließenden Desorption in den Apoplasten der Epidermisaußenwand (Kirkwood, 1999) (Abbildung 3).

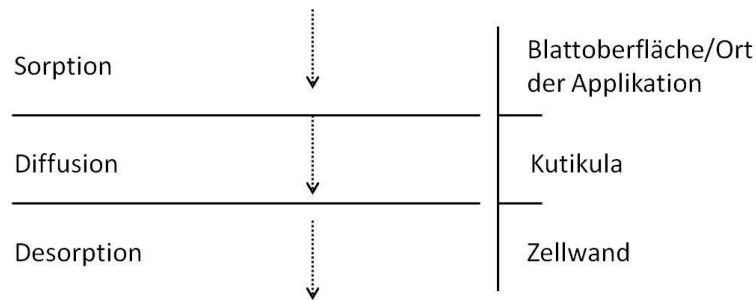


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Wirkstoffaufnahme durch die Kutikula ins Blatt

Dargestellt ist der dreistufige Prozess der Wirkstoffaufnahme bestehend aus: Sorption, Diffusion und Desorption.

Die Aufnahme rate ins Blatt hängt von der Größe und Polarität des Wirkstoffes ab und kann bei verschiedenen Spezies unterschiedlich schnell erfolgen. Ferner hat die Temperatur einen Einfluss auf die Aufnahme rate. Je höher die Temperatur, desto schneller die Aufnahme rate, da die Diffusion beschleunigt ist. Die erhöhte Aufnahme bei erhöhter Temperatur kann zusätzlich durch strukturelle Veränderung der Kutikula erklärt werden. Kleine Risse in der Wachsbelegung als auch die Veränderung des Kutinpolymers selbst können die Aufnahme rate erhöhen (Duda und Zielinski, 1996). Bei der Aufnahme rate ist weder die Dicke der Kutikula noch die Wachsmenge entscheidend (Buchholz, 2006). Es konnte ferner auch kein Zusammenhang zwischen der Wachszusammensetzung und zugehöriger Permeabilität gefunden werden (Riederer und Schneider, 1990). Versuche mit rekristallisiertem Wachs haben jedoch zeigen können, dass das Verhältnis von amorphem zu kristallinem Wachs eine große Rolle bei der Aufnahme der Wirkstoffe spielt (Schreiber *et al.*, 1997).

Neben den physiko-chemischen Eigenschaften der pflanzlichen Kutikula haben auch morphologische Eigenschaften des Blattes wie Trichome einen entscheidenden Einfluss bei den Aufnahmeprozessen eines Wirkstoffes (Hall *et al.*, 1997). Um der Eintrocknung und der damit einhergehenden Aufkonzentrierung eines Wirkstoffes oder dem Abwehen entgegenzuwirken, werden den Wirkstoffen häufig Adjuvantien beigemischt (Baur, 1998). Adjuvantien haben tensidähnliche Eigenschaften. Sie setzen die Oberflächenspannung der Lösung herab und erhöhen die Benetzungsfähigkeit der Blattoberfläche. Adjuvantien können die Aufnahme eines Wirkstoffes in das Blatt erhöhen (Schönherr, 1993) indem sie z.B. die Wachsstruktur reversibel verändern (Schreiber *et al.*, 1996a). Adjuvantien mit diesen Eigenschaften werden als *plasticizer* bezeichnet. Manche Pestizide wie Chlorfenvinphos (Baur *et al.*, 1996) weisen selbst ohne Adjuvant eine beschleunigende Wirkung auf. Um die genauen Aufnahmeprozesse eines Wirkstoffes in die Pflanze verstehen zu können, ist neben dem Gebrauch isolierter, trichom- und stomatafreier Kutikulamembranen auch die Verwendung von intakten Blättern notwendig (Burghardt *et al.*, 2006). Desweiteren ist es

sinnvoll, die im Feld applizierten Wirkstoffe an der Kulturpflanze selber und nicht nur an Modellorganismen zu testen.

1.5 Die Kutikula in der Phyllosphärenforschung

Die Blattoberfläche stellt ein Habitat für epiphyllie Bakterien, Pilze und Hefen dar. Dieses Habitat wird als Phyllosphäre bezeichnet und ist charakterisiert durch die Interaktion der Mikroorganismen mit der aus Wachs und Kutin bestehenden Kutikula (Schreiber *et al.*, 2005b). Da die zweidimensionalen Blätter die größte Oberfläche der oberirdischen Biomasse höherer Landpflanzen bilden, beziehen sich die meisten in der Literatur beschriebenen Interaktionsstudien auf die Charakterisierung der Blattmikroflora (Lindow und Brandl, 2003). Schätzungen haben ergeben, dass die mit Bakterien besiedelte Blattoberfläche eine Größe von $6,4 \times 10^8 \text{ km}^2$ aufweist.

Das Bakterienvorkommen auf Blättern kann zwischen verschiedenen Pflanzenspezies und zwischen verschiedenen Organen derselben Pflanzen stark variieren. Eine Veränderung der Bakterienzusammensetzung kann ferner während der Ontogenese der Pflanze beobachtet werden (Ercolani, 1991). Junge Blätter weisen im Vergleich zu alten Blättern eine höhere Bakterienvielfalt auf. Dies kann durch unterschiedliche physiko-chemische Eigenschaften der Blattoberfläche als auch durch unterschiedlich wirkende Umweltfaktoren erklärt werden. Umweltfaktoren wie UV-Strahlung, Temperaturschwankungen und Regen haben einen großen Einfluss auf die Kolonisation der Blattoberfläche durch Bakterien (Lindow und Brandl, 2003).

Die Kutikula stellt aufgrund ihres lipophilen Charakters einen lebensfeindlichen Lebensraum für Bakterien dar. Neben den ständig wechselnden Umweltbedingungen müssen die Bakterien mit geringer Nährstoffverfügbarkeit auf der Blattoberfläche auskommen (Wilson und Lindow, 1994). Oberflächenstrukturen wie Wachskristalle machen die Blattoberfläche zusätzlich schwerer benetzbar und erschweren die Kolonisation. Um diesen Stressfaktoren zu entgehen, versuchen Bakterien über die Stomata ins Blattinnere zu gelangen (Mercier und Lindow, 2000). Einmal in das Blattinnere gelangt, können sie sich in der gesamten Pflanze ausbreiten und Krankheitssymptome auslösen. Neben dem Eindringen in das lebende Pflanzengewebe über Stomata sind Bakterien in der Lage, den lebensfeindlichen Lebensraum Kutikula hinsichtlich der Nährstoffverfügbarkeit zu verändern. Manche Bakterienspezies, wie auch *Pseudomonas syringae*, sind in der Lage, Biotenside zu bilden, die die Benetzbarkeit der Blätter erhöhen (Bunster *et al.*, 1989a). Durch die Sekretion dieser Biotenside können sie sich auf der Blattoberfläche bewegen und leichter Stomata infiltrieren. Gleichzeitig bildet sich bei Regen, Nebel und Tau leichter ein Wasserfilm auf der Blattoberfläche aus, der den *leaching* Prozess, den Transport von organischen Komponenten aus dem Blatt an die Oberfläche, fördert (Abbildung 4).

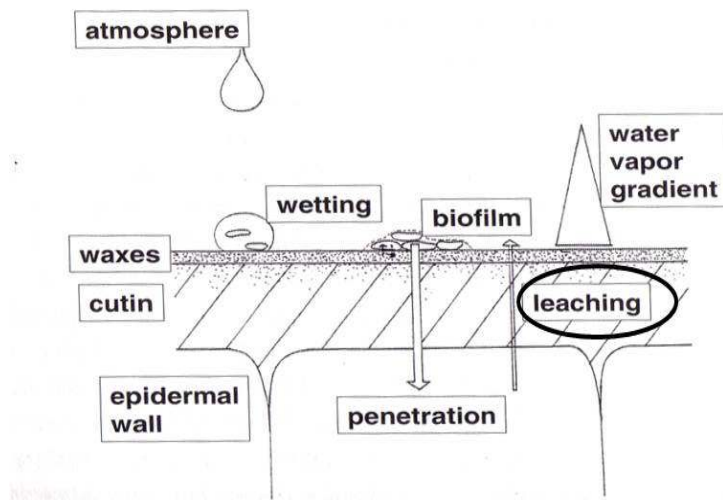


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Phyllosphäre

Dargestellt ist ein Modell über die hypothetischen Veränderungen der Phyllosphäre durch bakterielle Biotenside (Schreiber *et al.*, 2008).

Neben der Bildung von Biotensiden, können *Pseudomonas syringae* Bakterien Toxine synthetisieren, die zum lokalem Zelltod der Pflanze und zur Auswaschung von Metaboliten führen können (Quigley und Gross, 1994). Die Formation zu Aggregaten schützt Bakterien ferner vor Austrocknung durch Wassermangel (Lindow und Brandl, 2003) und erhöht die Verfügbarkeit von Nährstoffen (Costerton *et al.*, 1995).

Die Phyllosphäre als Interaktionsort zwischen Pflanzen und Mikroorganismen ist nicht nur aus der wissenschaftlichen, sondern auch aus der ökonomischen Perspektive sehr interessant. Epiphyllie Bakterien sind nicht nur in vielen Nährstoffkreisläufen involviert, sondern sind häufig Auslöser von Pflanzenkrankheiten. Ein tieferes Verständnis der Bakterien/Pflanzeninteraktionen ist unbedingt notwendig, um z.B. Ernteauffälle durch Bakterienbefall besser kontrollieren zu können.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Intakte Blattoberflächen und isolierte Kutikulamembranen weisen eine heterogene Oberflächenbeschaffenheit auf. Die Verteilung und Dichte von Stomata und Trichomen kann je nach Art variieren. Auch die Wachszusammensetzung ist keinesfalls homogen (Jetter *et al.*, 2000) und unterliegt jahreszeitlichen und ontogenetischen (Jetter und Schäffer, 2001) Veränderung. Das Vorkommen von epiphyllen Bakterien ist an den Stellen erhöht, an denen vermehrt der Transport von organischen Substanzen aus dem Blattinneren an die Blattoberfläche stattfindet (Remus-Emsermann *et al.*, 2011).

Das Ziel dieser Arbeit ist zum einen die Charakterisierung der Oberflächen der ausgewählten Nutzpflanzen *Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum*, *Vitis vinifera* und *Malus domestica*. Neben rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen der Blattoberflächen und Tests zur Bestimmung der Benetzungseigenschaften, werden chemische Analysen der Wachse durchgeführt und die Ergebnisse mit denen von Aufnahmeexperimenten eines Herbizids in Verbindung gebracht. Bei diesen experimentellen Ansätzen werden Unterschiede zwischen Blattober- und Unterseite und Veränderungen während der Ontogenese (altes und junges Blatt) herausgestellt. Eine genaue Charakterisierung der Blattoberfläche einer Art, aber auch der Vergleich zwischen verschiedenen Arten ist wichtig um anatomische, morphologische und physiologische Unterschiede zu erkennen und diese bei durchgeführten Aufnahmeexperimenten im Feld zu berücksichtigen.

Weiterhin ist das Ziel dieser Arbeit die Untersuchung der chemischen Zusammensetzung und Barrierefunktion der epikutikulären Wachse bei der Transpiration. Wachse stellen die Hauptbarriere bei der Transpiration dar (Schreiber und Schönherr, 2009). Unklar dabei ist jedoch welche Wachsfraktion maßgeblich für die Barriere verantwortlich ist (Schreiber, 2010). Die Entwicklung und Anwendung einer Methode ist notwendig, die die selektive Entfernung der Oberflächenwachse erlaubt, ohne dabei die Kutikula zu schädigen. Es werden dabei verschiedene aus der Literatur bekannte Methoden sowohl an dem artifiziellen System Kutikula als auch an intakten Blattscheiben getestet und verglichen. Transpirationmessungen vor und nach selektiver Entfernung der Oberflächenwachse sollen die Frage beantworten, in wie weit die epikutikulären Wachse bei der Bildung der Transpirationsbarriere eine Rolle spielen. Neben der chemischen Analyse der Oberflächenwachse verschiedener Arten wird die selektive Entfernung mittels Rasterelektronenmikroskopie überprüft.

Pseudomonas syringae Bakterien können Biotenside, sogenannte *Biosurfactants*, bilden (Burch *et al.*, 2010), die die Benetzungsfähigkeit von Blättern erhöhen und ihre Beweglichkeit auf der heterogenen Blattoberfläche erleichtern. Von zweien dieser Biotenside

ist die chemische Struktur bekannt (Déziel *et al.*, 1999; Berti *et al.*, 2007). In dieser Arbeit wird der Einfluss von *Pseudomonas syringae* Bakteriensuspensionen, Tensidüberständen und grob auf gereinigten Tensidextrakten auf die Transpiration von *P. laurocerasus* und *P. canescens* Kutikulamembranen untersucht. Es wird dabei zwischen der Applikation von WT- (Wildtyp) und MT- (Mutante) Bakterien unterschieden, die in der Synthese eines oder beider Biotenside einen *knockout* aufweisen. Der Einsatz von isolierten Kutikulamembranen in Transpirationsmessungen ermöglicht die kontrollierte Untersuchung, in wie weit die Barriere durch die Biotenside verändert wird. Aus der Literatur ist bekannt, dass ein Co-Transport von Wasser und lipophilen organischen Substanzen aus dem Inneren des Blattes an die Oberfläche stattfindet (Niederl *et al.*, 1998). Eine Erhöhung der Transpiration könnte demnach auch zu einer Erhöhung der Nährstoffverfügbarkeit auf dem Blatt führen. Der Einsatz der verschiedenen *knockout* Mutanten ermöglicht es die Wirkungsweise jedes einzelnen Biotensids näher zu verstehen. Die erhobenen Ergebnisse werden zwischen den beiden Pflanzenarten verglichen, die sich in ihrer Wachszusammensetzung und dem Vorkommen von polaren Transportpfaden unterscheiden. Die Bakterienmorphologie wird durch Rasterelektronenmikroskopie untersucht und die Bakteriensuspensionen, Überstände und Extrakte vor den Transpirationsmessungen durch ihr Spreitungsverhalten und durch Kontaktwinkelmessungen auf Biotensidproduktion getestet.

2 Material und Methoden

2.1 Gewinnung isolierter Kutikulamembranen

Für die Gewinnung isolierter Kutikulamembranen (CM; *cuticular membrane*) wurden Blätter der Arten *Prunus laurocerasus*, *Ficus elastica* und *Hedera helix* vom Institutsgelände des IZMB der Universität Bonn geerntet. Früchte der Art *Solanum lycopersicum* wurden in einem Lebensmittelfachgeschäft käuflich erworben. Blattkutikeln der Arten *Malus domestica* und *Vitis vinifera* wurden von Versuchspflanzen der BASF SE, Limburgerhof isoliert. Blätter der Arten *Camellia sinensis*, *Clivia miniata*, *Clusia spec.*, *Monstera deliciosa*, *Philodendron spec.*, *Schefflera arboricola* und *Vinca major* wurden aus dem botanischen Garten der Universität Bonn geerntet. Für die Gewinnung von Blattkutikeln wurden die Blätter auf ihrer abaxialen Seiten mit einem schwarzen Filzstift markiert. Dies ermöglichte eine leichte Trennung der oberen und unteren Membran nach der Isolation. Mit Hilfe eines Korkbohrers der Größe 14 (Ø 2 cm) wurden Blattscheiben der jeweiligen Blätter ausgestanzt und in Erlenmeyerkolben mit Enzymlösung für mehrere Tage inkubiert. Die Fruchtkutikeln wurden mit einem Korkbohrer der Größe 7 (Ø 1,1 cm) aus den Früchten gestanzt. Vor der Überführung in Erlenmeyerkolben mit Enzymlösung wurde von diesen mit einer Rasierklinge so viel Fruchtfleisch wie möglich abgetragen. Die Blatt- und Fruchtscheiben wurden mit Enzymlösung vakuumfiltriert und die Erlenmeyerkolben mit Parafilm verschlossen. Die Enzymlösung wurde täglich gegen Frische ausgetauscht. Sobald eine Ablösung der oberen und unteren Kutikula bei den Blättern sichtbar wurde, wurden die Kutikulamembranen mit Hilfe einer Pinzette gelöst, abaxiale Kutikeln verworfen und adaxiale Kutikeln erneut für einige Tage in frische Enzymlösung transferiert. Nach vollständigem Ablösen der Zellwand- bzw. Fruchtfleischreste wurden die Kutikeln in Boraxpuffer überführt. Der Puffer wurde nach zwei, vier und sechs Tagen ausgetauscht. Die Kutikeln wurden anschließend in *Aqua demin* überführt, unter einem sanftem Luftstrom geglättet und bis zur Verwendung in analytischen Experimenten, Transportuntersuchungen und rasterelektronenmikroskopischen Ansätzen in Petrischalen gelagert.

2.1.1 Herstellung wachsfreier Matrixmembranen (MX)

Enzymatisch isolierte Kutikulamembranen wurden in Analysegläsern mit Chloroform auf der Rollbank über Nacht inkubiert. Das Lösungsmittel wurde dann täglich gegen ein neues nach folgender Reihenfolge ausgetauscht: Aceton, Hexan, Ethanol und *Aqua demin*. Die so hergestellten wachsfreien MX wurden unter seichtem Luftstrom auf Teflonplättchen geglättet und bis zur Verwendung in Petrischalen aufbewahrt.

2.2 Analytische Untersuchungen

Neben Gesamtwachsanalysen der untersuchten Arten wurden die mit der Kollodium-, Gummi arabicum und Celluloseacetat-Behandlung von der Oberfläche von intakten Blattscheiben und isolierten Kutikulamembranen abgehobenen Wachse mittels Gaschromatografie/Massenspektrometrie und dem Gaschromatographen/Flammenionisationsdetektor analysiert. Bei den Arten *Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum*, *Vitis vinifera* und *Malus domestica* wurde zwischen Wachsextrakten der Blattober- und Blattunterseiten und verschieden alten Blättern unterschieden. Um eine mögliche Kontamination der untersuchten Proben zu verhindern, wurden alle verwendeten Gläser, Pinzetten, Objektträger und Deckgläser zuvor mit Chloroform gereinigt. Den einzelnen Proben wurde vor der Analyse, direkt nach der Extraktion eine definierte Menge an internen Standard beigefügt. Die direkte Zugabe stellte sicher, dass sich jeder weitere Schritt der Probenbehandlung gleichermaßen auf die Wachsmenge, als auch auf die Standardmenge auswirkte. Als interner Standard wurde das C₂₄ Alkan gewählt, da es kein Bestandteil des Wachses ist.

2.2.1 Gesamtwachsextraktionen isolierter Kutikulamembranen und intakter Blätter

Für die Gesamtwachsanalyse (Summe aus epi- und intrakutikulären Wachsen) der einzelnen Arten wurden 1-3 isolierte Kutikulamembranen in ein mit 4 ml Chloroform befülltes Analysegläschen gegeben. 50 µl des internen Standards C₂₄ Alkan (20 mg/100 ml) wurden zu den Proben direkt nach der Extraktion hinzugefügt. Die Analysegläschen samt Kutikulamembranen wurden über Nacht bei Raumtemperatur auf der Rollbank inkubiert. Die Gesamtwachsmenge von *Solanum tuberosum* und *Solanum lycopersicum* wurde bestimmt, indem intakte, unbeschädigte Blätter für 10 s in ein mit 10 ml Chloroform befülltes Analyseglas getaucht wurden. Das Chloroformvolumen der Proben wurde nach Entfernen der Membranen bzw. Blattscheiben mit einer Pinzette bei 60 °C unter Stickstoffstrom auf ein Volumen von etwa 1 ml eingedampft. Nach Überführung dieses Überstandes in ein zuvor mit Chloroform gereinigtes Reacti-Vial wurde die Probe erneut unter Wärmezufuhr unter dem Stickstoffstrom auf ein Endvolumen von 50 µl eingengt. Parallel zu allen Analysen wurde immer auch eine Negativkontrolle durchgeführt. Diese enthielt Chloroform und 50 µl des C₂₄ Standards. Die Negativprobe wurde analog zu den Wachsproben behandelt.

2.2.2 Selektive Entfernung der epikutikulären Wachse

Die selektive Entfernung der epikutikulären Wachse isolierter Kutikulamembranen oder intakter Blattscheiben erfolgte mit Kollodium (Nitrozellulose gelöst in Diethylether-Ethanol), Gummi arabicum (Polysaccharid gelöst in *Aqua demin*) oder Celluloseacetat (gelöst in Aceton). Die Kutikulamembranen wurden vor der Verwendung sowohl visuell als auch durch das Auftragen von 15 µl Ethanol auf Löcher überprüft. Membranen die sich nach dem Auftragen des Alkohols dunkel verfärbten, da das Ethanol als vollständig benetzendes Lösungsmittel auch kaum oder nicht sichtbare Löcher in der Kutikula infiltriert und sich als Folge der Lichtbrechung ändert, wurden aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen und gegen intakte ausgetauscht. Die zu behandelnde Oberfläche (isolierte Kutikula) wurde für das selektive Abheben der Wachse mit Kollodium und Celluloseacetat in eine mit 800 µl *Aqua demin* befüllte Transpirationskammer eingebaut (Abbildung 5). Um eine Abdichtung der Transpirationskammer mit der Membran zu garantieren, wurde der Rand der Kammer mit Silikonfett versehen. Die Kammern wurden beschriftet, der Rand mit Klebestreifen abgedichtet und die Kammern kopfüber über Nacht bei 25 °C über aktivierten Silica-Kugeln inkubiert. Das selektive Abheben der Oberflächenwachse mit der Gummi arabicum Methode erfolgte wie in Abbildung 6 gezeigt. Auf einem intakten *Prunus laurocerasus* Blatt wurden Deckel von Transpirationskammern platziert (Abbildung 6). Die Platzierung der Deckel garantierte eine mehrmalige Behandlung exakt derselben Fläche.

2.2.3 Selektive Entfernung der epikutikulären Wachse mit Kollodium

Kollodium wurde während der Experimente fünf Mal hintereinander mit einem Pinsel auf die Oberfläche von *Monstera deliciosa* Blattscheiben aufgetragen. Um ein Tiefenprofil der Wachse bei den Arten *Solanum tuberosum*, *Vitis vinifera* und *Malus domestica* zu erhalten, wurde Kollodium zwei Mal in Folge auf die Blattoberfläche aufgetragen. Nach Verdunsten des Diethylether-Ethanol (ca. 30 s.), konnte der sich teilweise schon von alleine ablösende Kollodiumfilm samt Oberflächenwachsen (Stripps) mit Hilfe einer Pinzette von der Oberfläche abgezogen werden (Abbildung 5). Diese Stripps wurden direkt in mit 4 ml Chloroform versehene Gläschen gegeben und 50 µl des internen Standards C₂₄ Alkan dazupipettiert. Die Gläschen wurden bei Raumtemperatur über Nacht auf der Rollbank inkubiert. Als Negativkontrolle diente eine äquivalente Menge Kollodium, welches auf einem Chloroform-gereinigten Objektträger aufgetragen wurde. Vor der Volumenverringernung unter dem Stickstoffstrom und anschließender Derivatisierung wurden die Kollodium-Stripps mit einer Pinzette aus den Probengläsern entfernt.

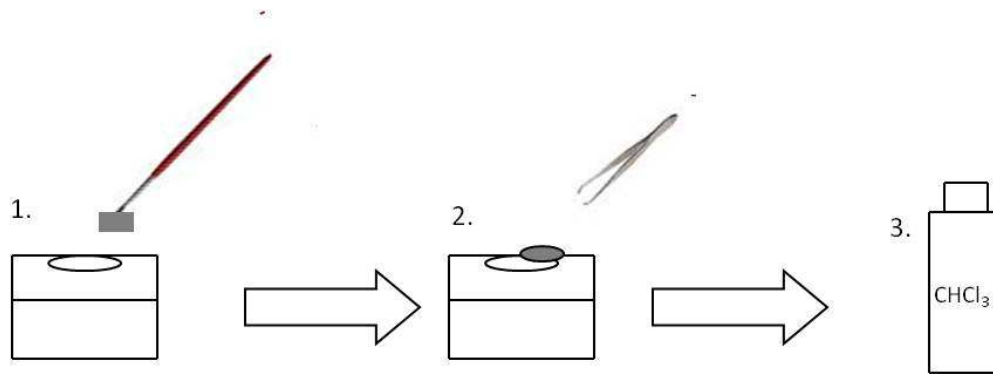


Abbildung 5: Abheben der Wachse mit Hilfe von Kollodium und Celluloseacetat

Die Abbildung zeigt die Methode zur selektiven Entfernung der Oberflächenwachse von der Kutikula, Blattscheibe. Schritt 1: Auftragen von Kollodium bzw. Celluloseacetat auf die Kutikula oder Blattscheibe; Schritt 2: Abheben der getrockneten Stripps; Schritt 3: Analyse der Stripps.

2.2.4 Selektive Entfernung der epikutikulären Wachse mit Gummi arabicum

Gummi arabicum stellte das zweite Agens zur selektiven Entfernung der Oberflächenwachse von *Prunus laurocerasus* dar (Jetter und Schäffer, 2001). In diesem Ansatz wurden mehrere Transpirationsdeckel auf ein intaktes Blatt gelegt, da diese Methode aufgrund der vergleichsweise großen mechanischen Belastung mit isolierten Kutikeln nicht funktioniert. Die Blattfläche innerhalb des Deckels ($1,13 \text{ cm}^2$) wurde fünf Mal in Folge mit Gummi arabicum behandelt, welches vor der Verwendung in Chloroform bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ für mehrere Stunden gewaschen wurde. Das nach der Waschung getrocknete Gummi arabicum wurde mit *Aqua demin* zu einer viskosen Lösung vermischt und mit einem Pinsel auf die Flächen der Transpirationskammern aufgetragen (Abbildung 6). Nach einer Trocknungsphase von mindestens 45 min pro Behandlung (insgesamt fünf Behandlungen in Folge), musste das Gummi arabicum stückweise von der Oberfläche mit einer gereinigten Pinzette entfernt werden, wobei zur leichteren Ablösung das Blatt gebogen werden musste. Die einzelnen Stücke wurden direkt in ein Analyseglas mit 4 ml Chloroform und $50 \text{ }\mu\text{l}$ des C_{24} internen Standards gegeben. Als Negativkontrolle diente eine äquivalente Menge Gummi arabicum, welches auf einem gereinigten Objektträger getrocknet ist. Das Chloroformvolumen der einzelnen Proben wurde unter einem sanften Stickstoffstrom bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ eingedampft und in ein Reacti-Vial überführt.

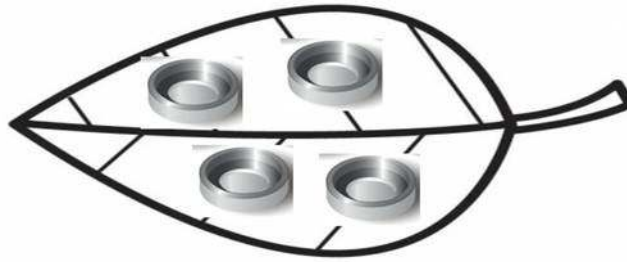


Abbildung 6: Abheben der Oberflächenwachse mit Hilfe von Gummi arabicum

Deckel von Transpirationskammern werden auf die Oberfläche eines Blattes platziert. Dies ermöglicht die mehrmalige Behandlung exakt derselben Fläche.

2.2.5 Selektive Entfernung der epikutikulären Wachse mit Celluloseacetat

Eine weitere Methode der selektiven Entfernung der Oberflächenwachse ist die Verwendung von Celluloseacetat (Silcox und Holloway, 1986). Die Anwendung von Celluloseacetat erfolgte an *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen und ist der mit Kollodium in der Handhabung vergleichbar. Das handelsübliche Celluloseacetat wurde vor dem Gebrauch mit Aceton zu einer 5 % Lösung angesetzt. Oberflächenwachse wurden durch das fünfmalige Auftragen von Celluloseacetat mit einem Pinsel auf die Oberfläche abgehoben. Die abgehobenen Stripps samt Wachse wurden in 4 ml Chloroform und 50 µl C₂₄ internen Standard extrahiert. Vor der Überführung in Reacti-Vials und anschließender Derivatisierung wurden die Cellulosestripps mit einer Pinzette aus den Gläsern entfernt. Als Negativkontrolle diente in diesem Ansatz eine äquivalente Menge Celluloseacetat, welches auf einem gereinigten Objektträger getrocknet und abgehoben wurde.

2.2.6 Bestimmung der Restwachsmenge

Die Restwachsmenge wurde nach fünfmaligem Behandeln der Oberflächen bestimmt, indem die Kutikulamembranen mit Hilfe eines Skalpell aus der Transpirationskammer geschnitten und einer Chloroformextraktion unterzogen wurden. Im Falle von behandelten Blattscheiben, wurden die Kutikulamembranen enzymatisch isoliert und zur Wachsextraktion ebenfalls in Chloroform extrahiert.

2.2.7 Wachsextraktion von der Ober- und Unterseite von *Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum*, *Vitis vinifera* und *Malus domestica* Blätter unterschiedlichen Alters

Die Wachszusammensetzung der Blattober- und Blattunterseite von Blättern unterschiedlichen Alters der Arten *Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum*, *Vitis vinifera* und *Malus domestica* wurde quantitativ und qualitativ mittels GC-MS und GC-FID bestimmt. Die Wachsextraktion erfolgte nach einem Protokoll von Jetter *et al.* (2000). Dabei wurde bei *Solanum lycopersicum* (Abbildung 7A) die Endfieder der Primärblätter als altes Blatt definiert und für analytische und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen verwendet. Als das jüngere Blatt wurde das endständige Blatt der dritten Verzweigung, ausgehend vom Keimblatt, definiert. Bei *Solanum tuberosum* (B) wurde das endständige Blatt der ersten Verzweigung als altes Blatt definiert und das endständige Blatt der fünften Verzweigung als junges Blatt definiert.

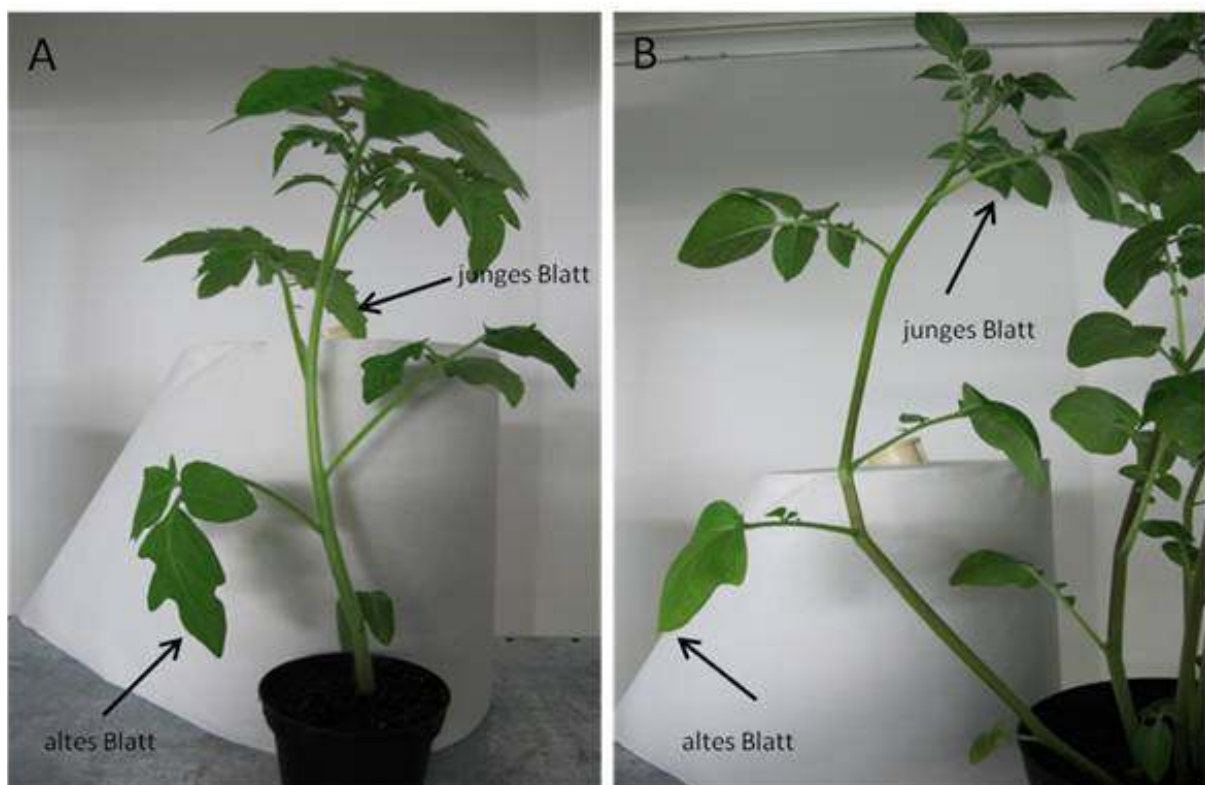


Abbildung 7: Die bei allen Versuchen verwendeten Blätter von *S. lycopersicum* und *S. tuberosum*

Bei *Solanum lycopersicum* (A) wurde die erste Endfieder als altes Blatt, die dritte Endfieder als junges Blatt definiert. Bei *Solanum tuberosum* (B) galt das erste Blatt als alt, das fünfte als jung.

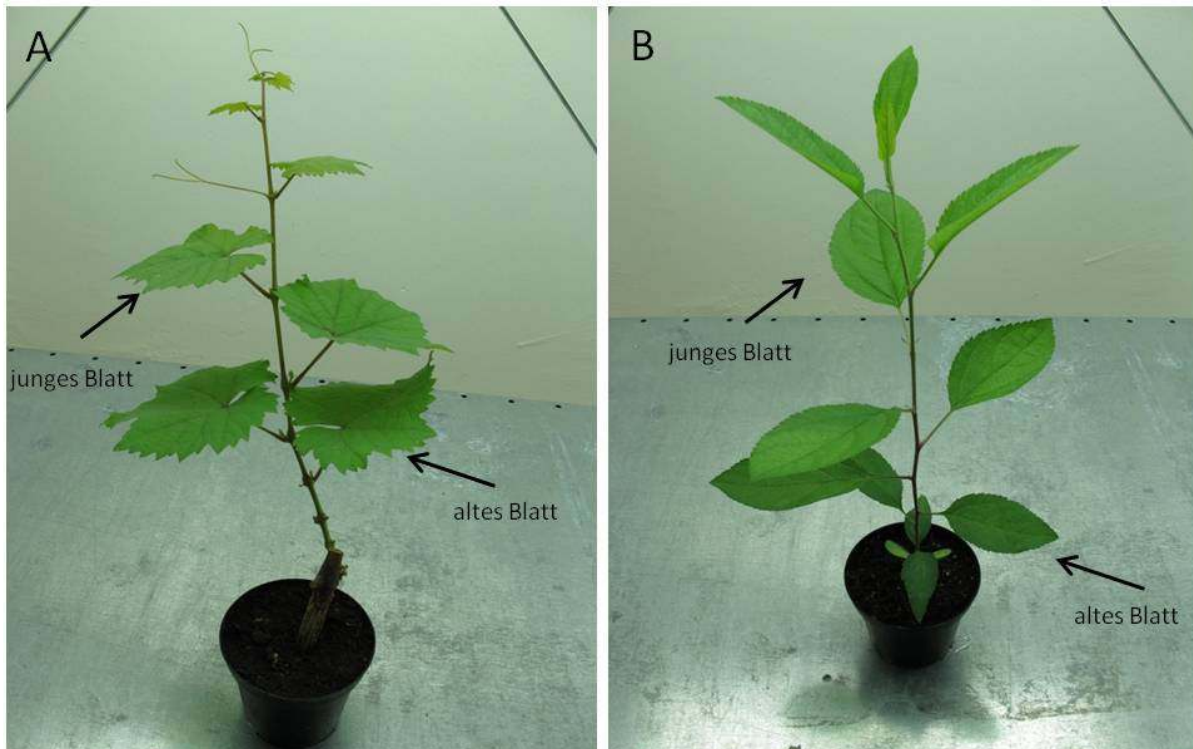


Abbildung 8: Die bei allen Versuchen verwendeten Blätter von *V. vinifera* und *M. domestica*

Bei *Vitis vinifera* (A) wurde das erste als altes Blatt, das fünfte als junges Blatt definiert. Bei *Malus domestica* (B) galt das vierte Blatt als alt, das achte als jung.

Bei *Vitis vinifera* (Abbildung 8 A) wurden die aller untersten Blätter als alt definiert, das fünfte als junges. Als altes Blatt wurde bei *Malus domestica* (Abbildung 8 B) das vierte Blatt nach den Keimblättern definiert. Das achte Blatt nach dem Keimblatt galt bei dieser Art als junges Blatt. Die für die analytischen Untersuchungen verwendeten Blätter wurden je nach gewünschter Probe mit der Blattober- oder Blattunterseite auf ein mit Chloroform gesäubertes Teflonplättchen platziert. Ein Analysegläschen mit abgeflachtem Rand (1,28 cm²) wurde mit 4 ml Chloroform befüllt und für 10 s auf die zu extrahierende Oberfläche gedrückt. Kreisende Bewegungen des Chloroforms über die Blattoberfläche stellten sicher, dass die gesamte Oberfläche mit Chloroform in Berührung kam und die Wachse gelöst wurden. Proben bei denen das Chloroform unter dem Gläschenrand über die gesamte Blattoberfläche verlaufen ist, wurden verworfen. Neben Wachsextrakten der Blattober- und Blattunterseite unterschiedlich alter Blätter wurden auch Gesamtwachsextrakte von unbeschädigten Blättern hergestellt. Nach der Wachsextraktion wurden die intakten Blätter in eine Klarsichtfolie platziert und ihre Fläche durch einscannen und anhand der Pixelzahl mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop[®] 7.0 bestimmt. Allen Wachsextrakten wurde direkt der interne Standard Tetracosan (C₂₄ Alkan; c = 10 mg/50 ml → 10 µg) beigefügt. Das Chloroformvolumen wurde anschließend unter seichem Stickstoffstrom auf 50 µl eingengt und in gesäuberte Reacti-Vials überführt.

2.3 Derivatisierung und gaschromatographische Untersuchungen

Zu den unter Stickstoffstrom eingeengten Wachsproben wurden 20 µl BSTFA (Bis(trimethylsilyl)-trifluoacetamid) und 20 µl wasserfreies Pyridin gegeben. Um Verunreinigungen zu vermeiden, wurden die verwendeten Spritzen zuvor mehrmals mit sauberem Chloroform gespült. Die Proben wurden gevortext und im Wärmeblock bei 70 °C für 45 min derivatisiert. Die Derivatisierung ermöglicht eine vollständige Auftrennung und Wiederfindung der Substanzen nach Probenauftrennung. In gaschromatographischen Untersuchungen kann es zu Wechselwirkungen zwischen funktionellen Gruppen (Hydroxyl- und Carboxylgruppen) und anderen Stoffen kommen. Eine Überführung dieser Gruppen in Trimethylsilylether und -ester durch die Verwendung von BSTFA erhöht die Flüchtigkeit der Substanzen und verhindert das Anheften dieser Substanzen auf der Säule. Eine nicht durchgeführte Derivatisierung führt zu einer schlechten Auftrennung der Substanzen und zu asymmetrischen Peaks. Pyridin wirkt in der Reaktion als Katalysator.

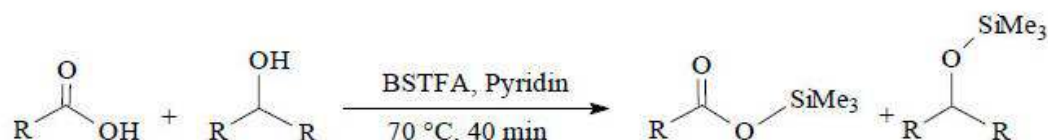


Abbildung 9: Reaktionsmechanismus der Derivatisierung

Die Abbildung zeigt die Umsetzung der reaktiven Gruppen durch BSTFA zu Trimethylsilylethern und -estern. Pyridin wirkt bei der Reaktion als Katalysator.

2.3.1 Gaschromatografie

Substanzen eines Gesamtextraktes werden bei der Gaschromatografie an einer Gaschromatografiesäule (stationäre Phase) zeitlich aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgt nach der Größe und Polarität der einzelnen Substanzen. Verwendet wurde ein 6890N Gaschromatograph (Agilent Deutschland) mit einer Kapillarsäule (DB-1, 30 m x 0,32 mm, 0,1 µm (J&W)) und H₂ als Trägergas (mobile Phase, Flussrate 2 ml/min). Die Quantifizierung der einzelnen Substanzen erfolgte durch eine anschließende Detektion mittels Flammenionisations-Detektor (FID). In einer Knallgasflamme werden dabei die getrennt ankommenden Verbindungen zu CO₂ und H₂O verbrannt (oxidiert). Die dabei frei werdenden Elektronen werden im Detektor abgefangen. Eine am Detektor angelegte Spannung induziert einen Stromfluss, welcher als Signal wahrgenommen wird. Das bei den Wachsenanalysen verwendete Temperaturprogramm ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Temperaturprogramm für die analytische Auftrennung von Wachsbestandteilen

Protokoll zur Analyse der Wachse
Injektion bei 50 °C
2 min bei 50 °C
40 °C/min bis auf 200 °C
2 min Erhaltung bei 200 °C
Erhöhung um 3 °C/min auf 310 °C
30 min bei 310 °C

2.3.2 Massenspektrometrie

Die qualitative Analyse der einzelnen Komponenten aus einem Gemisch erfolgte mit einem Gaschromatographen, dem an Stelle des Flammen-Ionisations-Detektors ein Massenspektrometer (MS) nachgeschaltet war. Die Substanzen werden bei dem Verfahren in die Gasphase überführt, gaschromatografisch aufgetrennt und bei Eintritt in das Massenspektrometer durch Elektronenbeschuss ionisiert. Die dabei entstehenden Ionen sind instabil und zerfallen nach typischen Fragmentierungsmustern. Die Fragmente werden in einem Quadrupol beschleunigt und an einem Analysator nach dem Verhältnis Masse: Ladung aufgetrennt. Die Analyse erfolgte an einem 6890N Gaschromatographen, welcher mit einem 5973 MS verbunden war. Als Trägergas diente H₂, die Säule war eine DB-1MS (30 m x 0,32 mm, 0,1 µm, (J&W)).

2.3.3 Vorgang zur Überprüfung der Säulenqualität

Vor und nach jeder analytischen Untersuchungsreihe wurde die Säulenqualität des GC-FID und GC-MS Systems mittels eines Säurestandards, bestehend aus einem Alkan (Tetracosan) und drei Carbonsäuren bekannter Konzentration (Nonacosan-, Triacontan-, Hentriacontansäure) ermittelt. Die drei Säuren verlieren ihren polaren Charakter trotz Derivatisierung nicht vollständig und gehen dadurch stärkere Wechselwirkungen mit der Säule als das unpolare Alkan ein. Die Qualität der Säule wird anhand des Verhältnisses der integrierten Flächen des Alkans zur letzten Säure (Hentriacontansäure) bestimmt. Der durch die Division der Flächen der Substanzen erhaltene Wert sollte 1,3 nicht überschreiten. Die Form der Substanzpeaks sollte symmetrisch sein. Ist dies nicht gegeben, erfolgte eine Pflege der Säule durch Kürzen, Ausheizen bei 310 °C und Spülen mit Chloroform. Das dabei verwendete Ausheizprogramm entspricht in den einzelnen Schritten dem Spülvorgang mit Chloroform und ist Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Programm zur Überprüfung der Säulenqualität vor und nach jeder analytischen Untersuchung

Protokoll zur Überprüfung der Säulenqualität
Injektion bei 50 °C
1 min bei 50 °C
40 °C/min bis auf 200 °C
2 min Erhaltung bei 200 °C
Erhöhung um 3 °C/min auf 310 °C
20 min bei 310 °C

2.3.4 Statistische Auswertung und graphische Darstellung der analytischen Daten

Die nach den einzelnen Wachsanalysen erhaltenen Chromatogramme wurden mit Hilfe der Software GC-Chemstation (Hewlett Packard Corporation, USA) ausgewertet. Die Peaks des FID-Chromatogramms wurden integriert und ihre Flächen den aus der GC-MS Analyse identifizierten Substanzen zugeordnet. Die Stoffmengen der einzelnen Substanzen aus dem Stoffgemisch wurden anhand der bekannten Menge an eingesetzten internen Standard nach Formel 1 berechnet.

Formel 1: Berechnung der Konzentration der Substanzen

$$\text{Substanzkonzentration} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^2} \right) = \frac{\text{Peakfläche Stoff } x * \text{Masse interner Standard} (\mu\text{g})}{\text{Peakfläche des internen Standards} * \text{Fläche der Probe} (\text{cm}^2)}$$

Die Zuordnung der Peaks zu den Substanzen, als auch die Bildung von Mittelwerten und Standardabweichungen erfolgte in MS-Excel (Microsoft, USA). Neben der absoluten Darstellung der Wachsmengen, wurde auch eine relative Auswertung der Daten durchgeführt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit SigmaPlot (SigmaPlot, USA).

2.4 Radioaktive Transpirationmessungen

Die Transpiration wurde sowohl vor als auch nach der selektiven Entfernung der epikutikulären Wachse von Kutikeln sowie von intakten Blattscheiben gemessen. Dies sollte Auskunft über die Funktion der epikutikulären Wachse in der Ausbildung der kutikulären Transpirationsbarriere geben. Der Effekt der Auftragung verschiedener organischer Lösungsmittel auf die Transpiration als Kontrolle wurde ebenfalls untersucht und mit wachsfreien Kutikulamembranen (MX) und unbehandelten Membranen verglichen. Als Negativkontrolle und zur Dichtigkeitsprüfung der Transpirationskammern diente die Messung des Wasserflusses durch Parafilmscheiben. Alle verwendeten Kutikulamembranen stammten von der astomatären Blattoberseite der beschriebenen Versuchspflanzen. Die verwendeten Blattscheiben wurden vor dem Einbau in Transpirationskammern mit einer Vakuumpumpe mit radioaktivem Wasser infiltriert.

2.4.1 Messung der Transpiration vor und nach selektivem Entfernen der Oberflächenwachse

Die kutikuläre Transpiration isolierter Kutikulamembranen und Blattscheiben wurde vor und nach dem Entfernen der epikutikulären Wachse mit $^3\text{H}_2\text{O}$ (spezifische Aktivität: 37 MBq/g; Hartmann, Braunschweig, Deutschland) gemessen. Die zu untersuchende Membran wurde dafür mit der physiologischen Innenseite nach innen in einer mit einem Adapter verschließbaren Transpirationskammer (Donorkompartiment) eingebaut. Der Rand wurde vorher mit Silikonfett bestrichen und die Kammer mit 800 μl $^3\text{H}_2\text{O}$ (10^6 dpm/ μl) befüllt (Abbildung 10). Das Silikonfett ermöglicht das vollständige Abdichten der Kammer durch die aufliegende Membran. Vor der Verwendung in Transportexperimenten wurden die Kutikulamembranen durch Applikation von Ethanol auf Löcher überprüft. Membranen, die sich durch die Applikation schwarz verfärbten und somit auf ein Loch hinwiesen, wurden gegen Intakte ausgetauscht. Alle Transpirationmessungen erfolgten über 100 % Luftfeuchte (250 μl *Aqua demin* in Receiver). Die dafür benötigten Szintillationsgefäße sowie Kammern wurden vor Versuchsbeginn bei 25 °C für 24 Stunden equilibriert.

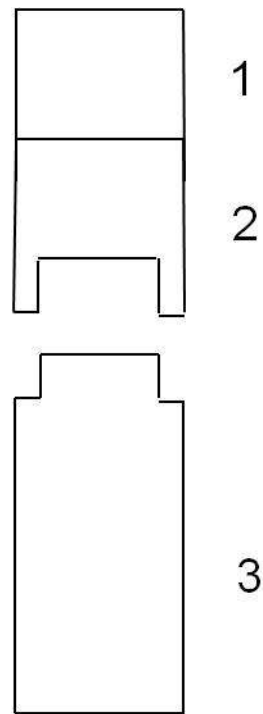


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur radioaktiven Messung der Transpiration

1: Geschlossene Transpirationskammer (Donor) befüllt mit 800 µl $^3\text{H}_2\text{O}$; zwischen 1. und 2. befindet sich die Kutikula, bzw. Blattscheibe mit der physiologischen Innenseite nach oben eingebaut; 2: Adapter zum Platzieren der Kammer auf das Szintillationsgefäß; 3: Szintillationsgefäß (Receiver) befüllt mit 250 µl *Aqua demin.*

Die Anfangstranspiration wurde über einen mindestens einstündigen Zeitraum gemessen. Die Szintillationsgefäße wurden nach 15 min, 30 min und 60 min gegen Frische ausgetauscht, um die treibende Kraft aufrecht zu erhalten. Die Proben wurden mit 5 ml Szintillationscocktail (Ultima Gold XR, Perkin Elmer) versetzt und gevortext. Nach der mindestens einstündigen Messung der Anfangstranspiration wurden die Oberflächenwachse der untersuchten Membranen zweifach in Folge mit den verschiedenen Agenzien entfernt und die Transpiration erneut über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde gemessen. Die bei dem radioaktiven Zerfall freiwerdende Energie wird durch den Szintillationscocktail in Licht umgewandelt. Das Licht kann dann durch einen Photomultiplier (Szintillationszähler, Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2800TR, Perkin Elmer) gemessen werden.

2.4.2 Messung der Transpiration vor und nach Lösungsmittelapplikation

Der Einfluss verschiedener Lösungsmittel mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften (Dipolmoment, Dampfdruck, Tabelle 3) auf die Transpiration wurde bestimmt indem Kutikulamembranen nach einer mindestens einstündigen Messung der Anfangstranspiration mit diesen behandelt wurden.

Tabelle 3: Verwendete Lösungsmittel für Transpirationsstudien samt zugehöriger Dampfdrücke und Dipolmomente

Lösungsmittel	Dampfdruck (mbar)	Dipolmoment (debye)
Aceton	233	2,70
Chloroform	210	1,02
Diethylether	586	1,14
Ethanol	59	1,70
Hexan	160	0
Wasser	23	1,85

Tabelle 4: Übersicht der applizierten Lösungsmittel auf Kutikulamembranen

Aufgeführt sind die verwendeten Volumina, sowie die Häufigkeit der Applikation.

Lösungsmittel	Volumen pro Applikation	Häufigkeit der Applikation
Aceton	15 µl	2
Chloroform	15 µl	2
Diethylether-Ethanol	15 µl	2
Ethanol	15 µl	2
Hexan	15 µl	2
Wasser	100 µl	1

Zwischen dem mehrmaligen Auftragen der Lösungsmittel (Tabelle 4) und der erneuten Transpirationmessung wurde darauf geachtet, dass das Lösungsmittel vollständig verdunstet war. Im Falle von Wasser wurde wegen der schlechten Benetzung ein größeres Volumen aufgetragen um die Fläche vollständig zu bedecken und die Kammern mussten über Nacht unter dem Abzug trocknen, bevor sie auf frische Szintillationsgefäße gesetzt werden konnten. Nach der Lösungsmittelapplikation wurde die Transpiration erneut über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde gemessen. Der Dampfdruck beschreibt das Bestreben von Molekülen in die Gasphase überzugehen. Er ist zum einen abhängig von dem jeweiligen Stoff bzw. Stoffgemisch und zum anderen von der Temperatur. Das

Dipolmoment ist ein Maß für die räumliche Verteilung von elektrischen Ladungen über das Molekül. Neben der Untersuchung des Einflusses verschiedener Lösungsmittel auf die Transpiration wurden ferner Transpirationmessungen mit Parafilmmembranen und totalextrahierten Membranen (MX) durchgeführt. Alle Proben wurde mit 5 ml Cocktail versetzt und vor der Messung mit dem Szintillationszähler gevortext.

2.4.3 Bestimmung der Transpiration und statistische Auswertung

Der Fluss F ($\text{dpm} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-2}$) beschreibt die detektierte Menge einer Substanz (dpm), die pro Zeit (s) über eine Membran bekannter Fläche A ($1,13 \times 10^{-4} \text{m}^2$) diffundiert. Diese Menge ist proportional zur treibenden Kraft, dem Konzentrationsunterschied zwischen Donor und Receiver ($C_{\text{Don}} - C_{\text{Rec}}$ ($\text{dpm} \text{m}^{-3}$)). Der Leitwert (m/s) kann nach Formel 2 berechnet werden und beschreibt die Barriereeigenschaft einer beliebigen Membran unabhängig von der treibenden Kraft für einen bestimmten Stoff.

Formel 2: Berechnung der Leitwerte

P = Leitwert, F = Fluss, A = Fläche der Kutikula, $C_{\text{Don}} - C_{\text{Rec}}$ = treibende Kraft der Transpiration.

$$P = \frac{F}{A(C_{\text{Don}} - C_{\text{Rec}})}$$

Der Donor wurde in jedem experimentellen Durchlauf auf 10000 dpm/ μl normiert. Dies ermöglicht den direkten Vergleich der Kinetiken verschiedener Arten und experimenteller Ansätze. Der Fluss, der daraus resultierende Leitwert und das Bestimmtheitsmass wurden einzeln für jede Kutikulamembran bzw. Blattscheibe berechnet. Membranen die ein Bestimmtheitsmass $r^2 < 0,90$ aufwiesen wurden aus den weiteren Berechnungen herausgenommen. Effekte auf die kutikuläre Transpiration wurden berechnet, indem die Endsteigung (E_2) durch die Anfangssteigung (E_1) dividiert wurde. Ein daraus resultierender Wert größer 1 bedeutet eine Erhöhung, ein Wert kleiner 1 eine Erniedrigung der Transpiration. Ein Wert von 1 bedeutet, dass sich die Transpiration nicht verändert hat. Jedes Experiment bestand aus mindestens fünf, meist aber 10 oder mehr Parallelen. Die Einzelleitwerte und Effekte sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen angegeben.

2.5 Bakterienanzucht und Herstellung von Bateriaenüberständen für Transpirationsstudien

Die verwendeten *Pseudomonas syringae* Stämme wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Steven Lindow, Berkeley USA isoliert und für Interaktionsstudien zur Verfügung gestellt. Von *Pseudomonas syringae* Bakterien ist bekannt, dass sie Biotenside bilden (Burch *et al.*, 2010). Von zweien dieser Biotenside ist die chemische Struktur bekannt. Das Rhamnolipid ist ein Glykopeptid bestehend aus dem Zucker Rhamnose und Fettsäureresten. Es weist eine Gesamtmasse von 475 auf (Déziel *et al.*, 1999). Das zweite Biotensid Syringafaktin ist ein Lipopeptid bestehend aus mindestens acht Aminosäuren und Fettsäureresten. Von der molekularen Masse ist es mit 1083 doppelt so groß wie das Rhamnolipid (Berti *et al.*, 2007). In Transpirationsstudien mit *Prunus laurocerasus* und *Populus canescens* sollte der Effekt der Bakterienapplikation, als auch der Effekt der biotensidhaltenden Überstände auf die Wasserpermeabilität untersucht werden. Des Weiteren wurde der Effekt von grob auf gereinigten Biotensiden (Extrakte) auf die Transpiration von *Prunus laurocerasus* untersucht. Alle durchgeführten Messungen erfolgten bei 100 % Luftfeuchte, um ein Absterben der Bakterien oder ein Auskristallisieren der Biotenside auf der Kutikulamembran zu verhindern.

Tabelle 5: In Transpirationsstudien verwendete *Pseudomonas syringae* Bakterienstämme

Dargestellt sind die für Transpirationsstudien verwendeten Bakterien, unterteilt in ihrer Fähigkeit Biotenside zu produzieren. + symbolisiert die Fähigkeit zur Produktion, - steht für *knockout* der Biotensidproduktion.

	Rhamnolipid	Syringafaktin
	Produktionsfähigkeit	
Wildtyp	+	+
Syringafaktin-ko	+	-
Rhamnolipid- ko	-	+
Double-ko	-	-

2.5.1 Anzucht von *Pseudomonas syringae* Bakterien

Die Zellen wurden für zwei Tage auf KB-Agar mit Rifampicin (5mg/l) bei 25 °C im Wärmeschrank vorkultiviert.

2.5.2 Herstellung von Bakteriensuspensionen für Transpirationsmessungen

Die Bakterienzellen wurden unter der Sterilbank mit 4 ml *Aqua demin* bzw. Phosphatpuffer von der Platte abgehoben und in ein sauberes Falcontube überführt. Die optische Dichte der Bakterienkulturen wurde mit einem Photometer (UV mini 1240, UV/Vis Spectrophotometer, Shimadzu corporation) bei λ 600 nm auf OD 1 eingestellt. Bis zum Gebrauch in Transpirationsstudien, wurden die so hergestellten Bakteriensuspensionen bei 4 °C im Kühlschrank gelagert, um das Wachstum der Bakterien und einer Veränderung der optischen Dichte zu verhindern.

2.5.3 Herstellung von Bakterienüberständen für Transpirationsmessungen

Für die Herstellung der Biotensid enthaltenen Überstände wurden die Bakterien wie in 2.5.1 beschrieben auf KB-Agar angezogen, mit Phosphatpuffer bzw. *Aqua demin* von der Platte abgehoben und auf die optische Dichte von 1 eingestellt. Die so gewonnene Bakteriensuspension wurden bei 25 °C und 2000 g für 20 min zentrifugiert (Hermle Z 300K, Gosheim). Die Überstände wurden vorsichtig, ohne das Pellet zu lösen in ein sauberes Falcontube überführt.

2.5.4 Überprüfung der Tensidproduktion

Vor der Verwendung in Transpirationsstudien wurden die Bakterienüberstände und Suspensionen auf Tensidproduktion getestet. Dafür wurden 20 μ l Tropfen des Überstandes auf Parafilm pipettiert und die Form des Tropfens mit der von *Aqua demin* verglichen. Neben dieser Untersuchung wurden die Überstände kräftig geschüttelt und auf Schaumbildung untersucht, sowie Kontaktwinkelmessungen durchgeführt.

2.6 Einfluss von Bakteriensuspensionen, Bakterienüberständen und auf gereinigten Extrakten auf die Transpiration

2.6.1 Einfluss von Bakteriensuspensionen auf die Transpiration von *Prunus laurocerasus* und *Populus canescens* Kutikulamembranen

Kutikulamembranen wurden in Transpirationskammern mit Adapter eingebaut und über Nacht bei 25 °C über 100 % Luftfeuchte equilibriert. Die Anfangstranspiration wurde über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde gemessen. Hierfür wurden die Kammern nach 15 min, 30 min und 60 min auf frische Szintillationsgefäße umgesetzt. Nach diesem Zeitraum wurden je 100 µl der in Tabelle 5 beschriebenen Bakterienstämme auf die Kutikulamembranen appliziert und die Kammern zum Trocknen bis zum nächsten Tag unter den Abzug gestellt. Die optische Dichte wurde konstant bei 1 gehalten. Nach der Trocknungsphase über Nacht wurde die Transpiration erneut über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde gemessen. Als Negativkontrolle diente die Applikation von 100 µl Phosphatpuffer oder *Aqua demin* auf die Kutikulamembranen.

2.6.2 Einfluss von Bakterienüberständen auf die Transpiration von *Prunus laurocerasus* und *Populus canescens* Kutikulamembranen

Auf isolierte *Prunus laurocerasus* und *Populus canescens* Kutikulamembranen wurden nach Messung der Anfangstranspiration 100 µl der hergestellten Bakterienüberstände appliziert und deren Effekt auf die Transpiration nach Trocknung über Nacht gemessen. Tabelle 6 zeigt die in den Transpirationsstudien der beiden Arten verwendeten Bakterienüberstände.

Tabelle 6: In Transpirationsstudien verwendete Bakterienüberstände

Dargestellt sind die nach den Pflanzenarten unterteilten, verwendeten Bakterienüberstände samt ihrer optischen Dichte.

Verwendete Bakterienüberstände	
<i>Prunus laurocerasus</i>	<i>Populus canescens</i>
WT Bakterienüberstand OD 1 in Phosphatpuffer	WT Bakterienüberstand OD 1 in <i>Aqua demin</i>
Syf- Bakterienüberstand OD 1 in Phosphatpuffer	WT Bakterienüberstand OD 1 in Phosphatpuffer
	Syf- Bakterienüberstand OD 1 in <i>Aqua demin</i>
	Syf- Bakterienüberstand OD 1 in Phosphatpuffer
	Dbl-ko- Bakterienüberstand OD 1 in <i>Aqua demin</i>

2.6.3 Einfluss von auf gereinigten Biotensid-Extrakten auf die Transpiration von *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen

Neben der Applikation von Bakterienstämmen und Bakterienüberständen wurde auch der Effekt der Applikation von grob auf gereinigten Biotensid-Extrakten auf die Transpiration von *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen untersucht (Tabelle 7). Die auf gereinigten Tenside wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Steven Lindow nach Burch *et al.*, (2010) hergestellt. Die Anfangstranspiration wurde erneut über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde über 100 % Luftfeuchte gemessen. Die zur Verfügung gestellten Extrakte wurden mit *Aqua demin* versetzt und vor der Applikation gevortext. Je 30 µl wurden auf die Kutikulamembranen pipettiert. Ein leichtes Drehen der Transpirationskammern ermöglichte die vollständige Verteilung des Tropfens auf der Oberfläche. Nach der Trocknung über Nacht unter dem Abzug wurde die Transpiration erneut für mindestens eine Stunde gemessen.

Tabelle 7: In Transpirationsstudien verwendete auf gereinigte Extrakte

Verwendete Extrakte	
Rh1a ⁻	enthält Syringafaktin, kein Rhamnolipid
HAA	Vorstufe des Rhamnolipids
Rh1a ⁻ /Syf ⁻	Negativkontrolle, kein Syringafaktin, kein Rhamnolipid

2.6.4 Auswertung der Transpirationsstudien und Statistik

Für jeden experimentellen Ansatz wurden mindestens fünf Parallelen angesetzt. Die Flussrate (dpm/h), also die Menge an radioaktivem Wasser welches durch die Kutikulamembran pro Zeit diffundiert, wurde für jede einzelne Membran errechnet. Das Bestimmtheitsmass wurde für jede einzelne Membran vor und nach der Behandlung bestimmt. Kutikulamembranen, die aufgrund eines niedrigen Bestimmtheitsmasses und nicht linearem Kurvenverlauf auf eine Beschädigung hindeuteten, wurden ausgeschlossen. Die Effekte der Behandlung auf die Transpiration von *Prunus laurocerasus* und *Populus canescens* Kutikulamembranen wurden durch die Division des Flusses nach Behandlung durch den Fluss vor Behandlung errechnet. Aus den Einzeleffekten wurde der Mittelwert samt Standardabweichung berechnet.

2.7 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Die selektive Entfernung der Oberflächenwachse von isolierten Kutikulamembranen bzw. intakten Blattscheiben und die Besiedlung der Kutikula mit Bakterien (*Pseudomonas syringae*) wurde mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops (Firma Leitz, Typ AMR 1000, umgerüstet auf digitale Bildtechnik) am Institut für Evolutionsbiologie und Zooökologie der Universität Bonn untersucht. Des Weiteren wurden die Ober- und Unterseiten von Blättern der Arten *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Vitis vinifera* und *Malus domestica* unterschiedlichen Alters rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Für die verschiedenen Ansätze wurden isolierte Kutikulamembranen oder intaktes Blattmaterial mit doppelseitigem Klebeband auf Probetischen (Ø 1,2 cm, Plannet Marburg) fixiert. Bei der Verwendung von intaktem Blattmaterial musste vermieden werden, dass es zu einer Wechselwirkung zwischen dem in lebenden Geweben vorkommenden Wasser und dem Elektronenstrahl kommt. Daher mussten die Blattscheibenproben vor Verwendung über Silica-Kugeln bei -80 °C für mehrere Tage gefriergetrocknet werden. Das Abrastern der Proben erfolgt im Hochvakuum.

Aufladungseffekte, bedingt durch den Elektronenstrahl können besonders bei biologischen Proben zu einer verschlechterten Bildqualität führen. Umgangen werden kann dies durch die Bedampfung der Proben mit einem leitenden Material. Dieser Vorgang wird Sputtern genannt. Als leitendes Material wurde Gold verwendet. Die Bedampfung der Proben erfolgte im Sputterer (E5100) der Firma Polaron Equipment LTD., (Watford, England) des gleichnamigen Instituts. Der Vorgang erfolgte für zwei Minuten bei einer Spannung von 2,4 kV, einem Druck von 0,05 Torr und einem Stromfluss von 15 mA. Als Sputtergas diente Argon. Die Proben wurden für zwei Minuten bedampft. Die Dicke der Bedampfungsschicht kann nach Formel 3 berechnet werden.

Formel 3: Berechnung der Sputterschicht

d= Dicke der Sputterschicht, mA= Entladungsstrom, kV= Hochspannung, t= Zeit (min), k= Konstante (bei Argon= 1).

$$d \text{ (nm)} \approx \text{mA} * \text{kV} * t \text{ (min)} * k$$

Die Visualisierung der Oberflächen beruht auf dem Abtasten einer mit leitendem Material bedampften Oberfläche durch einen Elektronenstrahl. Dieser Elektronenstrahl wird je nach Beschaffenheit des zu untersuchenden Objekts unterschiedlich stark abgelenkt. Das dabei entstehende Signal wird in Grauwertinformationen umgewandelt und auf dem Bildschirm dargestellt. Alle Bilder wurden bei 20 kV erstellt.

2.8 Kontaktwinkelmessungen

Tropfen einer Flüssigkeit bilden zu der Oberfläche eines Feststoffes einen Kontaktwinkel (δ) aus (Abbildung 11). Der Kontaktwinkel beschreibt die Benetzbarkeit einer Festkörperoberfläche und variiert je nach verwendeter Flüssigkeit und vorliegender Oberfläche. Bei geringen Kontaktwinkeln bezeichnet man die untersuchte Oberfläche als gut benetzbar, bei höheren spricht man von einer unbenetzbaren Oberfläche.

Die durchgeführten Messungen wurden mit einem vollautomatischen Kontaktwinkelmesssystem DSA 100, (KRÜSS GmbH, Hamburg, Deutschland) der BASF SE, bzw. mit einem OCA Kontaktwinkelmessgerät, (DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Deutschland) des Nees-Instituts der Universität Bonn, durchgeführt. Als zu messende Flüssigkeit wurde ausschließlich *Aqua demin* verwendet. Die Tröpfchengröße entsprach pro Messung 5 μl .

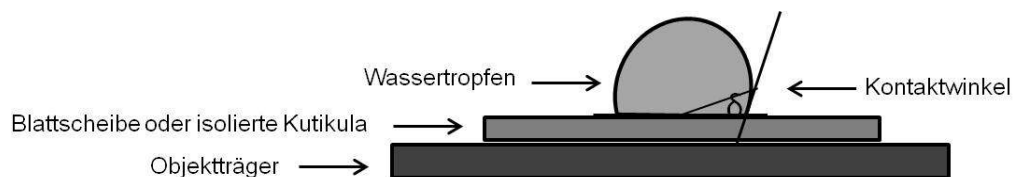


Abbildung 11: Schematische Darstellung einer Kontaktwinkelmessung

Kontaktwinkel (δ) eines Wassertropfens auf einer isolierten Kutikula, oder einer Blattoberfläche mit einer Benetzung größer als 90 Grad.

2.8.1 Kontaktwinkelmessungen isolierter Kutikulamembranen und intakter Blattscheiben

Die Kontaktwinkelmessungen wurden an isolierten *Prunus laurocerasus* und *Populus canescens* Kutikulamembranen mit und ohne vorangegangener Bakterienapplikation durchgeführt. Als Negativkontrolle für die Messung nach Bakterienapplikation diente Phosphatpuffer. Kontaktwinkelmessungen wurden darüber hinaus auch an *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Vitis vinifera* und *Malus domestica* Blättern unterschiedlichen Alters durchgeführt. Dabei wurde zwischen Blattober- und Unterseite unterschieden. Für die Messungen wurden die isolierten Kutikulamembranen bzw. intakten Blätter vorsichtig ohne Beschädigung der Oberfläche in ca. 2 cm lange und 0.5 cm breite Streifen geschnitten und mit doppelseitigem Klebeband auf einem Objektisch befestigt. Bei der Befestigung der Membranen auf dem Tisch wurde darauf geachtet, dass die Oberfläche bündig und ohne Blasenbildung mit dem Träger abschließt. Für jede Probe wurden mindestens drei Messungen des Kontaktwinkels durchgeführt und das arithmetische Mittel und die Standardabweichung ermittelt.

2.9 Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen

Alternativ zu radioaktiven Transportmessungen kann mittels Fluoreszenzmessungen (Junior-PAM Chlorophyll Fluorometer, Walz, Effeltrich, Deutschland) indirekt die kutikuläre Stoffaufnahme von Photosyntheseinhibitoren gemessen werden. Dieser experimentelle Ansatz eignet sich vor allem bei Arten von denen sich Kutikulamembranen nur schwer oder gar nicht isolieren lassen. Der Gebrauch dieser Messmethode ermöglicht verbundene Stichproben und ist nicht invasiv. Alle durchgeführten Messungen erfolgten bei 25 °C und Dauerlicht. Die Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen wurden an den Arten *Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum*, *Vitis vinifera* und *Malus domestica* durchgeführt. Innerhalb der Messungen wurde zwischen alten und jungen Blättern unterschieden. Die Applikation erfolgte auf der Blattoberseite. Es wurde das Herbizid Bentazon als Photosyntheseinhibitor verwendet.

2.9.1 Das Herbizid Bentazon

Das Herbizid (Bentazon (BASF SE, Ludwigshafen)) wurden als fertig vorliegende Formulierung getestet (Abbildung 12, Tabelle 8). Die Wirkungsweise des Herbizids basiert auf der Hemmung der Elektronentransportkette in der Photosynthese und der Hemmung der CO₂-Fixierung. Bentazon wird als Nachläuferherbizid und Selektivherbizid bei Kartoffeln, Mais und Getreide verwendet. Nutzpflanzen können Bentazon mittels Hydroxylierung und anschließender Glycosilierung im Gegensatz zu Unkräutern entgiften. Der Effekt des Herbizids auf die Photosynthese der genannten Arten wurde mittels Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen und einer 1 %-igen wässrigen Bentazonlösung untersucht.

Abbildung 12: Chemische Struktur des verwendeten Herbizids Bentazon

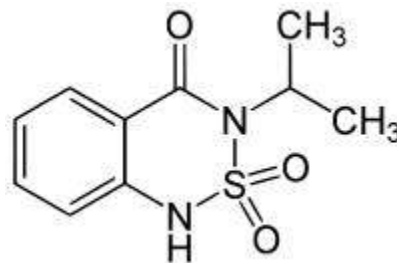


Tabelle 8: Physikalische und chemische Eigenschaften von Bentazon aus BASF SE, Sicherheitsdatenblatt.

Bentazon	
chemische Charakterisierung	wasserlösliches Konzentrat
Form	flüssig
Farbe	gelb bis rot
pH-Wert	6-7
Dichte	ca. 1,19 g/cm ³
Wasserlöslichkeit	vollkommen löslich
Verteilungskoeffizient (log K _{ow})	0,77

2.9.2 Vorgang der Versuche und Versuchsaufbau

Die Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen wurden mit einer Junior-PAM (Walz, Deutschland) durchgeführt. Der Lichtleiter (Glasfaserkabel; Länge: 50 cm, Durchmesser: 1,5 mm) wurde mit Hilfe des *Monitoring Leaf-Clips* in einem Abstand von ca. 1 mm über der Blattoberfläche platziert. Das zu untersuchende Blatt wurde vor den Messungen zwischen zwei verschiebbare Schienen des *Monitoring Leaf-Clips* geklemmt, ohne es dabei zu verletzen. Stabilisiert wurde der Messaufbau mit einem Stativ (Abbildung 13). Der Lichtleiter der mit der Junior-PAM verbunden ist, ist wiederum an einem Computer angeschlossen.

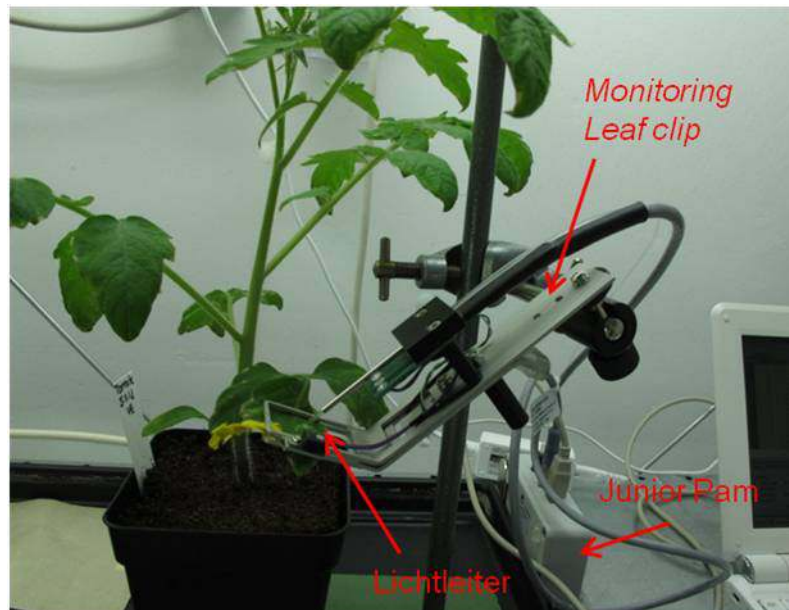


Abbildung 13: Experimenteller Versuchsaufbau der Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen mittels Junior-PAM

Beispiel einer Messung an *Solanum lycopersicum*. Der Lichtleiter wird mit Hilfe des *Leaf clips* auf die Oberseite des Blattes platziert. Sättigungspulse werden abgegeben und die Fluoreszenzwerte über die Junior-Pam an den angeschlossenen Computer übertragen.

Das Messlicht (Frequenz: 5 Hz, Wellenlänge: 465 nm, Intensität: $190 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) wurde kontinuierlich während der gesamten Messung auf das Blatt gestrahlt. Die Bestrahlung regt die Elektronen im Lichtsammelkomplex des Photosystems II an. Da die Intensität des Lichtes jedoch nicht ausreicht, um Elektronencarrier zu beladen, fallen die Elektronen direkt in ihren Grundzustand zurück und geben die Energie als Fluoreszenzdifferenz ab. Diese Fluoreszenz wird von der Junior-PAM gemessen und als Grundfluoreszenz des Blattes (F_0) aufgezeichnet. Neben dem schwachen Messlicht wurden im Abstand von zwei Minuten Sättigungspulse auf das Blatt bestrahlt. Die hohe Intensität dieser Pulse ($10000 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) führt zu einer Anregung der Elektronen in den Lichtsammelkomplexen und vollständigen Schließung aller Reaktionszentren. Da keine Elektronencarrier mehr frei sind und das Photosystem vollständig ausgelastet ist, gibt es die Energie vollständig als Fluoreszenz ab, welche von der PAM Apparatur als maximale Fluoreszenz (F_m) aufgezeichnet wird. Um während den Messungen das Erfassen von Licht kürzerer Wellenlängen zu verhindern, welches sich wiederum auf die Messergebnisse auswirken könnte, wurde ein *short pass filter* verwendet, der Wellenlängen unter 670 nm ausblendet. Ein *long pass filter* stellt sicher, dass der Photodetektor nur die Fluoreszenz des Blattes aufzeichnet und nicht die Fluoreszenz, die durch die Messpulse abgegeben wird. Durch ihn werden Wellenlängen unter 700 nm gefiltert. Durch die Messung von F_0 und F_m kann nach Formel 4 der Yield ($Y(II)$) berechnet werden. Dadurch dass der Yield die Quantenausbeute des Photosystems II wiedergibt, lassen sich direkt durch die Messung Rückschlüsse auf die Photosyntheserate

machen. Je höher Y (II) desto höher die Photosyntheserate. Ein Rückgang in Y (II) bedeutet umgekehrt ein Rückgang in der Photosynthese und eine Zunahme in der Fluoreszenz. Durch ein Abfallen des Yields nach Applikation der Herbizide kann indirekt auf die Aufnahmegeschwindigkeit dieser Stoffe geschlossen werden. Ein schneller Abfall der Photosyntheserate deutet auf eine schnelle Aufnahme, ein langsamer Abfall hingegen auf eine langsamere Aufnahme des Herbizids hin.

Formel 4: Formel zur Berechnung des Yields (Y(II))

Y(II)= Quantenausbeute; Fm= Maximalfluoreszenz; F0= Grundfluoreszenz.

$$Y(II) = \frac{Fm - F0}{Fm}$$

Als Referenz wurde der Yield vor der Behandlung der Pflanzen mit dem Herbizid über einen Zeitraum von 10 min alle zwei Minuten gemessen. Nach der zehnmütigen Messung wurden 40 µl des Herbizids auf die zuvor gemessene Stelle des Blattes appliziert. Es wurde darauf geachtet, dass der Lichtleiter in dem Tropfen positioniert war und in seiner Grundposition nicht verändert wurde. Vorherige Messungen haben zeigen können, dass eine direkte Positionierung des Lichtleiters im Tropfen nicht zu Messungenauigkeiten führt. Nach der Applikation des Herbizids wurden die Messungen erneut alle 2 min durchgeführt, bis der Yield um mindestens 20 % des Ausgangswertes reduziert war. Vor einer neuen Messung an einem anderen Blatt wurde der Lichtleiter gründlich mit Ethanol gereinigt, um Kontaminationen durch das Herbizid zu verhindern.

2.9.3 Statistische Auswertung und graphische Darstellung der Chlorophyll-Fluoreszenz Daten

Die gemessenen Daten konnten aus der zugehörigen PAM-Software in Microsoft Excel[®] importiert werden. Der erste Messpunkt wurde als Startpunkt definiert. Graphisch wurde jedes Blatt einzeln betrachtet, bevor es in anschließende Mittelwerte und Standardabweichungen mit einbezogen wurde. Es wurde dafür auf die Ordinate der Yield (Y(II)) und auf der Abszisse die Zeit in Minuten aufgetragen. Neben der Betrachtung des Kurvenverlaufes wurde auch die Zeit bestimmt, bei der die photochemische Arbeit um 20 % reduziert war. Graphisch konnte diese Zeit ermittelt werden, indem auf der Ordinate 80 % der photochemischen Arbeit bestimmt und auf der Abszisse die zugehörige Zeit abgelesen wurde. Von diesen Werten wurden ebenfalls Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet und die erhaltenen Werte sowohl innerartlich (altes und junges Blatt, Oberseite) als auch zwischen den Arten verglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Oberflächencharakterisierung ausgewählter Nutzpflanzen

Die kutikuläre Transportbarriere von Blättern der Arten *Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum*, *Vitis vinifera* und *Malus domestica* wurde durch Rasterelektronenmikroskopie und chemische Analysen der Oberflächenwachse untersucht. Ergänzend dazu wurde der Kontaktwinkel der Oberflächen und der Transport eines Photosyntheseinhibitors über die Kutikulamembran mittels Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen bestimmt. Bei allen Ansätzen wurde zwischen alten und jungen Blättern und bei den analytischen, mikroskopischen und Kontaktwinkeluntersuchungen zusätzlich noch zwischen Blattober- und Blattunterseite unterschieden.

3.1.1 Verwendetes Blattmaterial und morphologische Beschreibung der Pflanzen

Innerhalb einer Art wurde darauf geachtet, dass die Pflanzen bei jedem Versuchsansatz dasselbe Alter aufwiesen. Die verwendeten *Solanum tuberosum* Blätter stammten von fünf Wochen alten Pflanzen, die eine Höhe von 15-20 cm aufwiesen. Die Stängel und die robusten Blätter waren behaart. Die Behaarung der Blätter war auf der Blattunterseite stärker ausgeprägt als auf der Blattoberseite. Die als alt eingestuftes Blätter wiesen im Mittel eine projizierte Blattfläche von $15,10 \pm 4,82 \text{ cm}^2$ und die als jung eingestuftes eine Blattfläche von $15,86 \pm 4,82 \text{ cm}^2$ auf. Die untersuchten Pflanzen der Art *Solanum lycopersicum* waren bei der Verwendung in den Versuchen zwei Wochen alt und 10 cm hoch. Der Stängel und im Gegensatz zur Kartoffel feineren Blätter waren ebenfalls behaart. Bei jungen Blättern war die Behaarung ausgeprägter als bei Alten und bei allen verstärkt auf der Unterseite lokalisiert. Die meisten Haare waren an der Blattnervatur lokalisiert. Die Bestimmung der Blattflächen ergab für alte Blätter eine projizierte Fläche von $12,49 \pm 2,34 \text{ cm}^2$ und für junge Blätter eine Fläche von $24,15 \pm 4,68 \text{ cm}^2$. Die *Vitis vinifera* Triebe wurden vor dem Erhalt für drei Wochen angezogen und waren bei Beginn der Versuche etwa 20 cm groß. Bei Betrachtung der Pflanzen wurde deutlich, dass die jüngeren Blätter heller und glänzender erschienen. Auch von der Haptik unterschieden sich die Blätter. Die jungen Blätter wiesen im Vergleich zu älteren Blätter eine feinere Struktur auf. Die Blattunterseiten der Blätter waren behaart. Die Haare waren vor allem an der Blattnervatur lokalisiert. Es konnte im Mittel eine projizierte Blattfläche von $39,07 \pm 5,63 \text{ cm}^2$ für die alten Blätter und von $54,58 \pm 4,76 \text{ cm}^2$ für die jungen Blätter bestimmt werden. Die zur Verfügung gestellten *Malus domestica* Pflanzen waren bei Versuchsbeginn vier Wochen alt und wiesen eine Größe von etwa 15 cm auf. Der Stängel war leicht behaart. Die sehr feinen Blätter waren auf der Blattunterseite im Bereich der Blattnervatur behaart. Die alten

Blätter wiesen im Mittel eine Fläche von $17,01 \pm 2,15 \text{ cm}^2$ und die jungen Blätter eine Fläche von $36,34 \pm 4,35 \text{ cm}^2$ auf.

Eine Kutikulaisolation konnte an den *Solanum* Arten nicht durchgeführt werden. Die Blattscheiben zerfielen in der Enzymlyösung. Von *Malus domestica* konnten Kutikulamembranen isoliert werden. Bei *Vitis vinifera* konnte eine Altersabhängigkeit erkannt werden: Von alten Blättern ließen sich ohne weiteres Membranen isolieren, von jungen wiederum nicht, da die isolierten Kutikeln zu instabil waren.

3.1.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Oberflächenproben wurden wie in Kapitel 2.7 beschrieben vorbereitet und rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Es wurde stets intaktes Blattmaterial verwendet. Die aufgetragene Sputterschicht betrug bei allen Proben nach Einsetzen der Variablen in Formel 3: 72 nm. Bei allen Arten wurden sowohl die Blattober- als auch die Blattunterseite der unterschiedlich alten Blätter untersucht.

3.1.2.1 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von *Solanum tuberosum* Blättern

Die Wachsbelegung wies eine schuppen- oder plattenartige Anordnung auf (Abbildung 14 A und B), die an manchen Stellen (C) aufbrach und rauer erschien. In Abbildung 14 D ist die Struktur eines Trichoms zu sehen, welches bei der Probenvorbereitung abgebrochen ist. Es ist zu erkennen, dass das Haar aus einzelnen Segmenten bestand. Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen von alten *Solanum tuberosum* Blättern verdeutlichen auch, dass Stomata sowohl auf der Blattoberseite als auch auf der Unterseite gefunden werden konnten (Abbildung 14 C, E und F). Bei jungen *Solanum tuberosum* Blättern sind die Stomata ebenfalls auf der Blattober- (Abbildung 15 A und B) und Unterseite lokalisiert (Abbildung 15 D, E, F). Die Wachsbelegung war ebenfalls schuppen- bzw. plattenförmig, sie ähnelt einem Wachslayer. Abbildung 16 zeigt eine Nahaufnahme eines *Solanum tuberosum* Trichoms. Die Trichome bestehen aus einzelnen Segmenten (A), die durch eine ringförmige Verankerung (B) mit den Blattoberflächen verbunden sind.

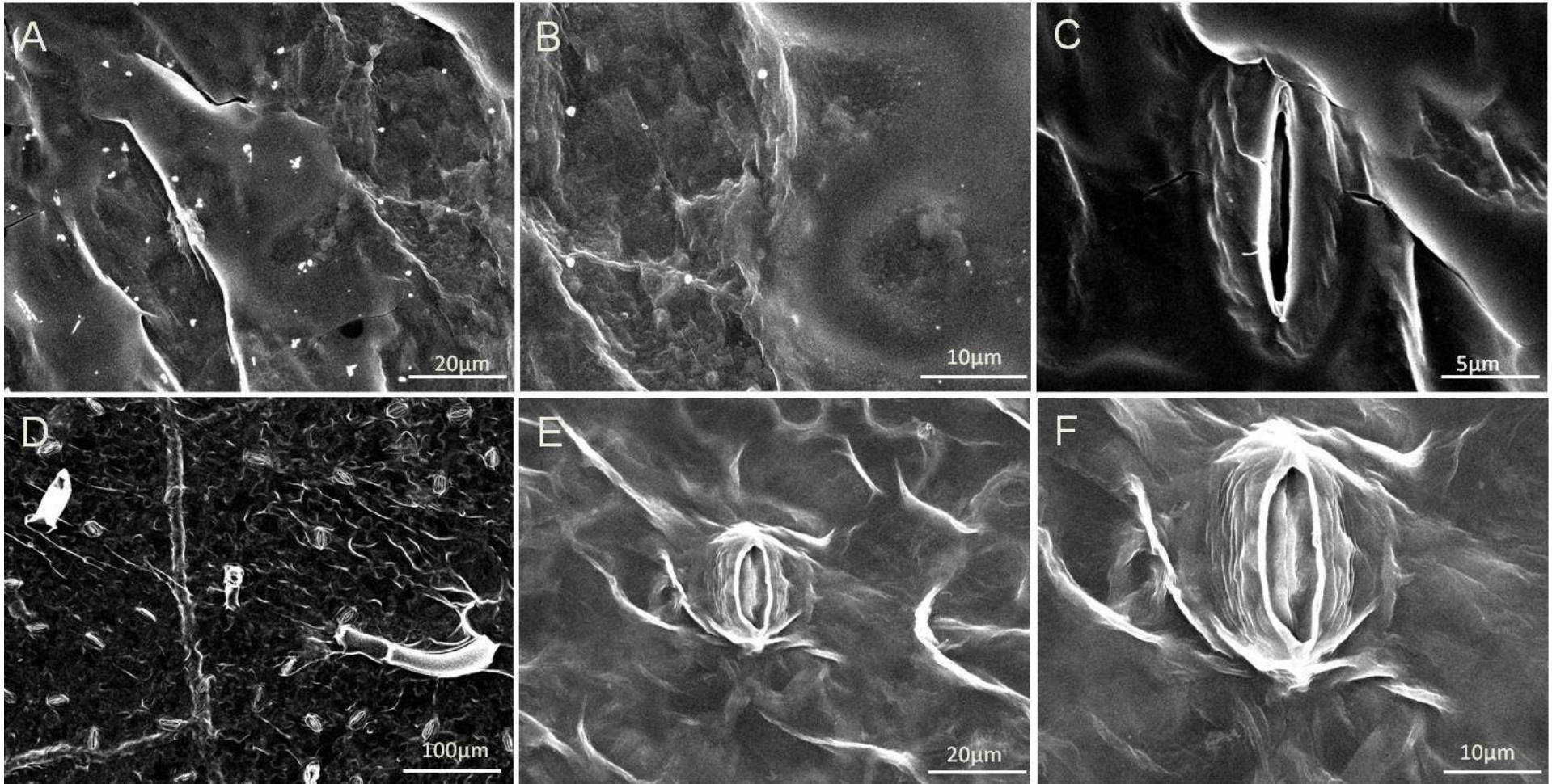


Abbildung 14: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von alten *Solanum tuberosum* Blättern
 A+B+C: Blattoberseite mit Wachsschuppen (A und B) und Stomata (C), D+E+F: Blattunterseite mit Wachslayer und Stomata (D, E und F).

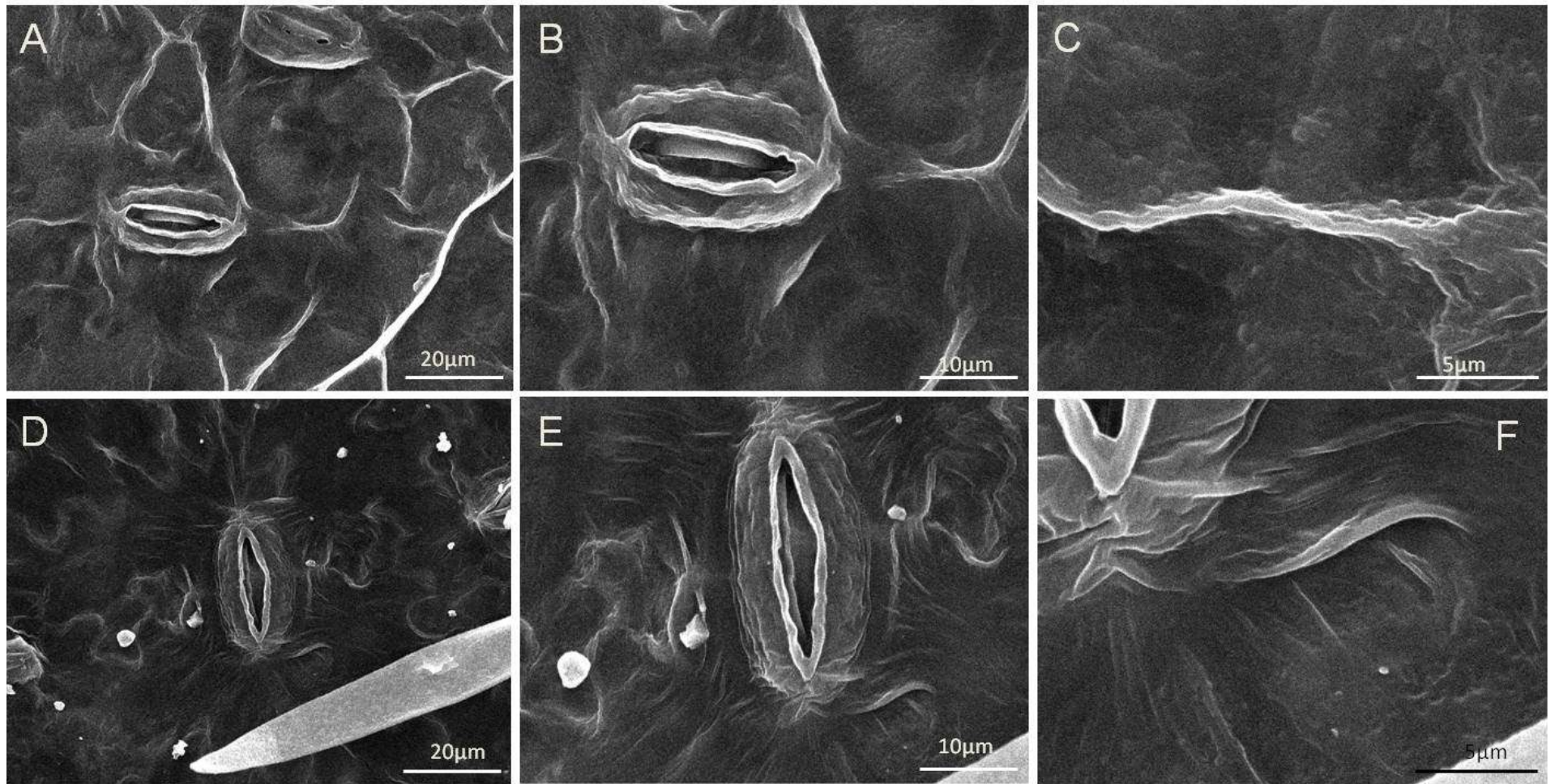


Abbildung 15: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von jungen *Solanum tuberosum* Blättern

A+B+C: Blattoberseite mit Stomata (A und B) und Wachsschuppen (C), D+E+F: Blattunterseite mit Trichomen (D) und Stomata.

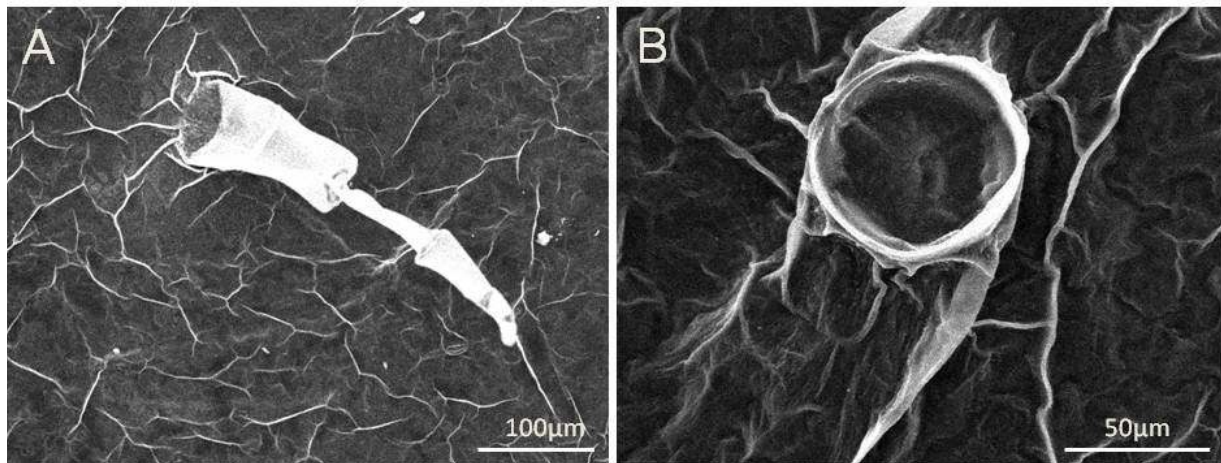


Abbildung 16: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines *Solanum tuberosum* Trichoms

A: Trichom unterteilt in drei Segmente, B: Verankerung eines abgebrochenen Trichoms.

3.1.2.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von *Solanum lycopersicum* Blättern

Bei alten Blättern der Art *Solanum lycopersicum* befanden sich die Stomata sowohl auf der Blattober- als auch auf der Blattunterseite (Abbildung 17). Die Wachse sind als eine homogene Schicht auf der Oberfläche verteilt (Abbildung 17 A, B und C). Vereinzelt sind auch Wachskristalle zu erkennen (E). Weiße Strukturen, die auf der Blattoberseite (Abbildung 17 A und B) und Blattunterseite (Abbildung 17 D und E) zu finden waren könnten aus der Bewässerungslösung stammen, welche mit einem Mineraldünger versehen war. Stomata waren bei jungen *Solanum lycopersicum* Blätter ebenfalls auf der Blattoberseite (Abbildung 18 C) und Unterseite (Abbildung 18 D und E) lokalisiert. Auf der Blattoberseite (Abbildung 18 A und B) und Blattunterseite (Abbildung 18 E und F) konnten kristalline Formationen gefunden werden. Diese sind nicht zu den Oberflächenwachsen zu zählen, sondern sind anorganischer Natur (Salze aus der Bewässerungslösung). Die Oberflächenwachse wiesen wie auch bei den alten Blättern dieser Art eine homogene Form auf. Wachskristalle sind nicht zu erkennen. Ähnlich wie bei *Solanum tuberosum* bestehen die Haare von *Solanum lycopersicum* aus drei Segmenten, die über eine Verankerung mit der Oberfläche des Blattes verbunden sind (Abbildung 19). Diese Haare konnten sowohl auf der Ober- als auch auf der Unterseite gefunden werden.

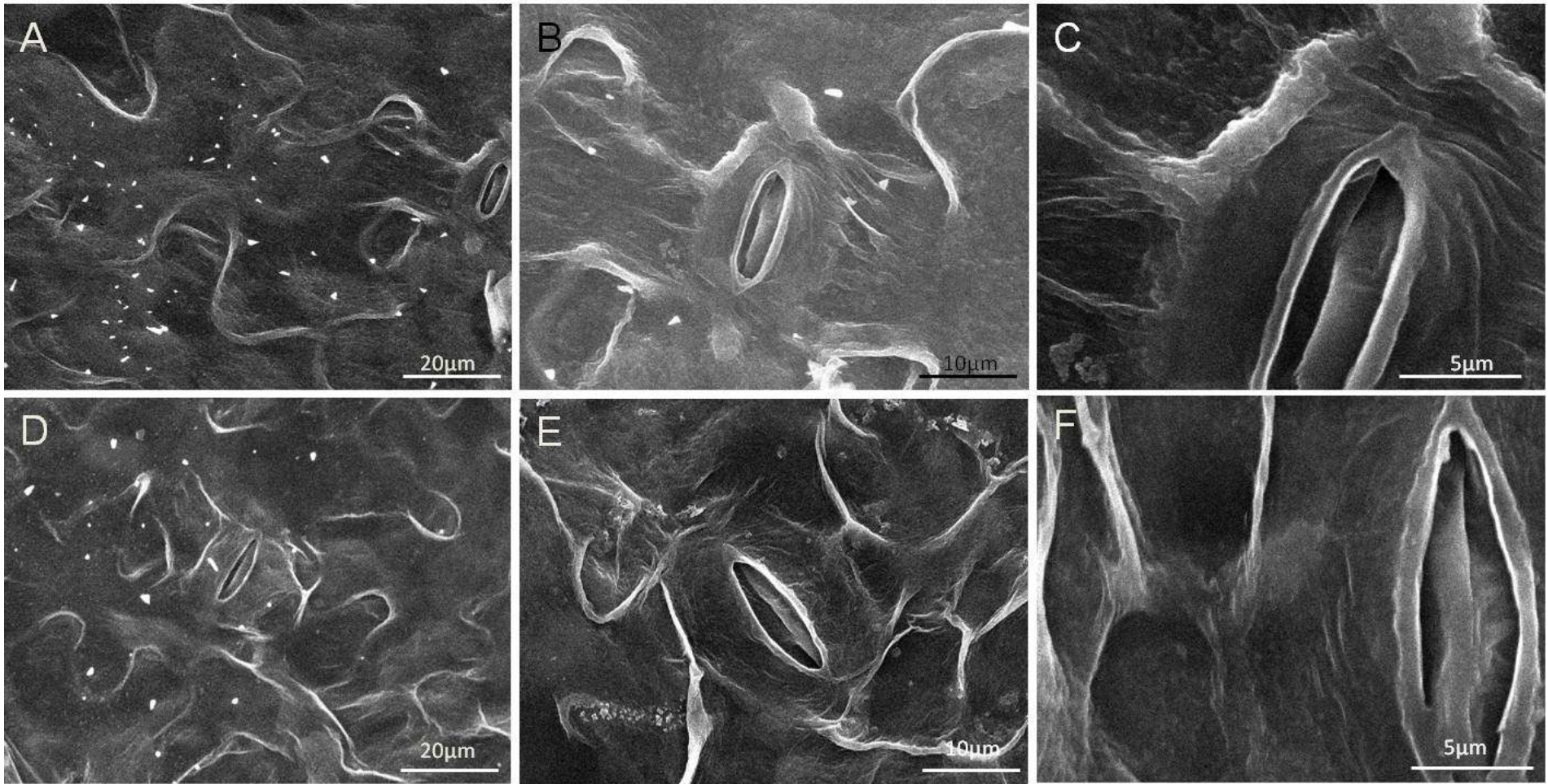


Abbildung 17: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von alten *Solanum lycopersicum* Blättern
A+B+C: Blattoberseite mit Wachsschuppen und Stomata, D+E+F: Blattunterseite mit Stomata.

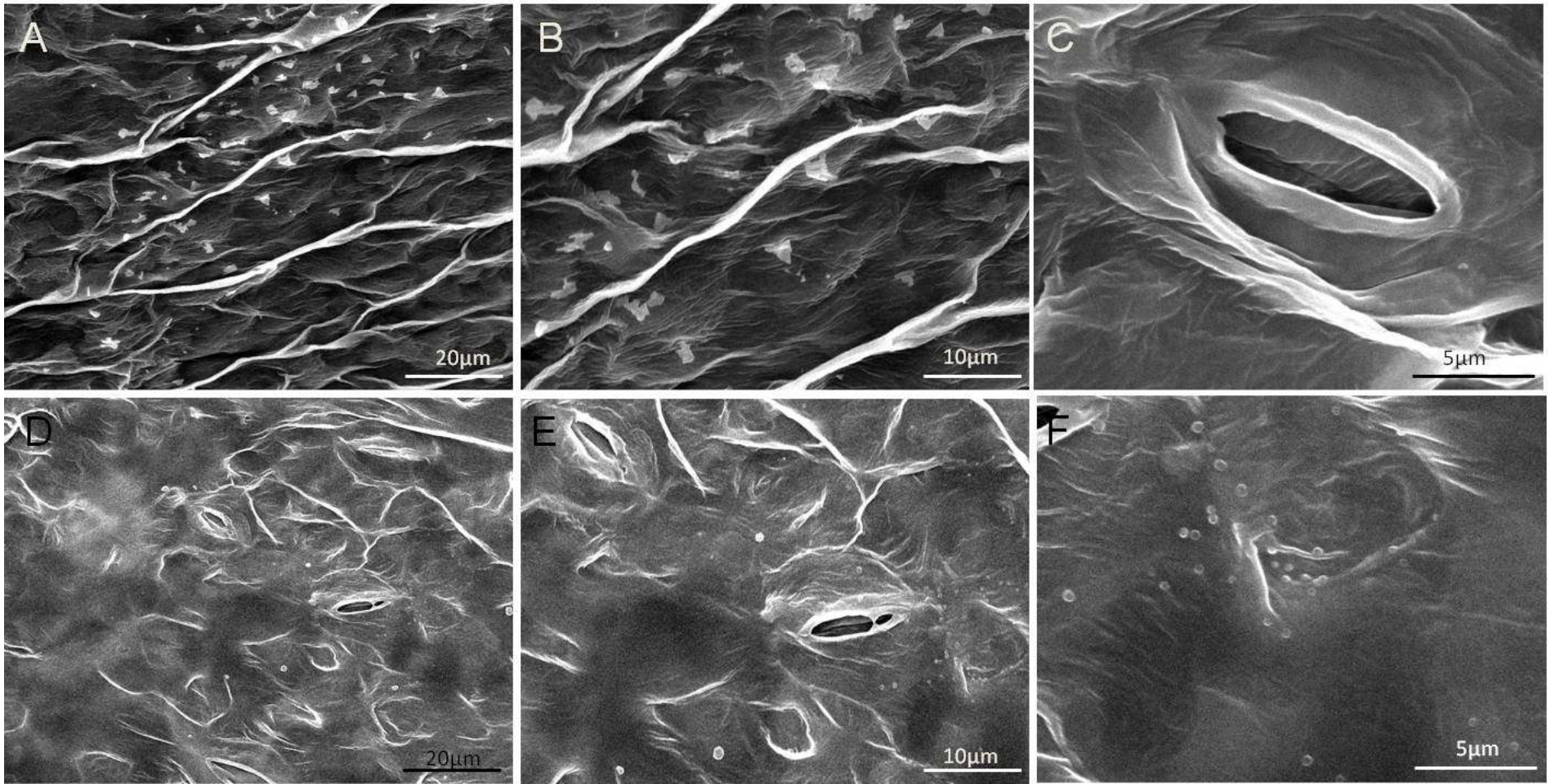


Abbildung 18: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von jungen *Solanum lycopersicum* Blättern
A+B+C: Blattoberseite mit Wachsschuppen und Stomata (C), D+E+F: Blattunterseite mit Wachsschuppen und Stomata (D und E).

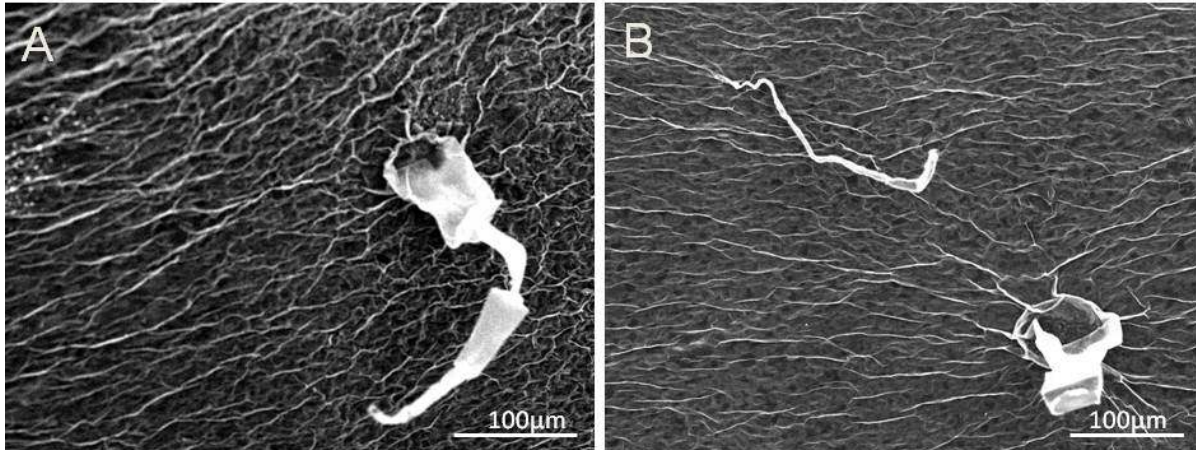


Abbildung 19: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von *Solanum lycopersicum* Trichomen

A: Trichom mit Trocknungsartefakten unterteilt in drei Segmente, B: Trichom aus Verankerung gebrochen.

3.1.2.3 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von *Vitis vinifera* Blättern

Die Oberflächenwachse der Blattoberfläche wiesen eine plattenförmige Struktur auf (Abbildung 20 A-C). Diese Inkrustierungen brachen an manchen Stellen auf und bildeten scharfe Kanten (B, C). Bei alten Blättern der Art *Vitis vinifera* konnten Stomata nur auf der Blattunterseite (Abbildung 20 D) gefunden werden. Die Wachse der Blattunterseite ähnelten einem Wachsfilm. Dieser Film wurde an manchen Stellen durch kugelförmige Wachsexformationen unterbrochen (Abbildung 20 E und F). Ob diese Formationen jedoch reiner Wachsart waren, bleibt unklar. Auch hier könnten sich Salze aus dem Mineraldünger des Gießwassers an der Oberfläche abgelagert haben. Bei jungen *Vitis vinifera* Blättern waren auf der Blattoberseite Kutikularfalten zu sehen. (Abbildung 21 A, B und C) Wie bei alten *Vitis vinifera* Blättern befanden sich die Stomata bei jungen Blättern ebenfalls nur auf der Blattunterseite (Abbildung 21 D). Auch die Wachse der Unterseite wiesen eine schuppen- bzw. plattenförmige Formation auf (Abbildung 21 E und F).

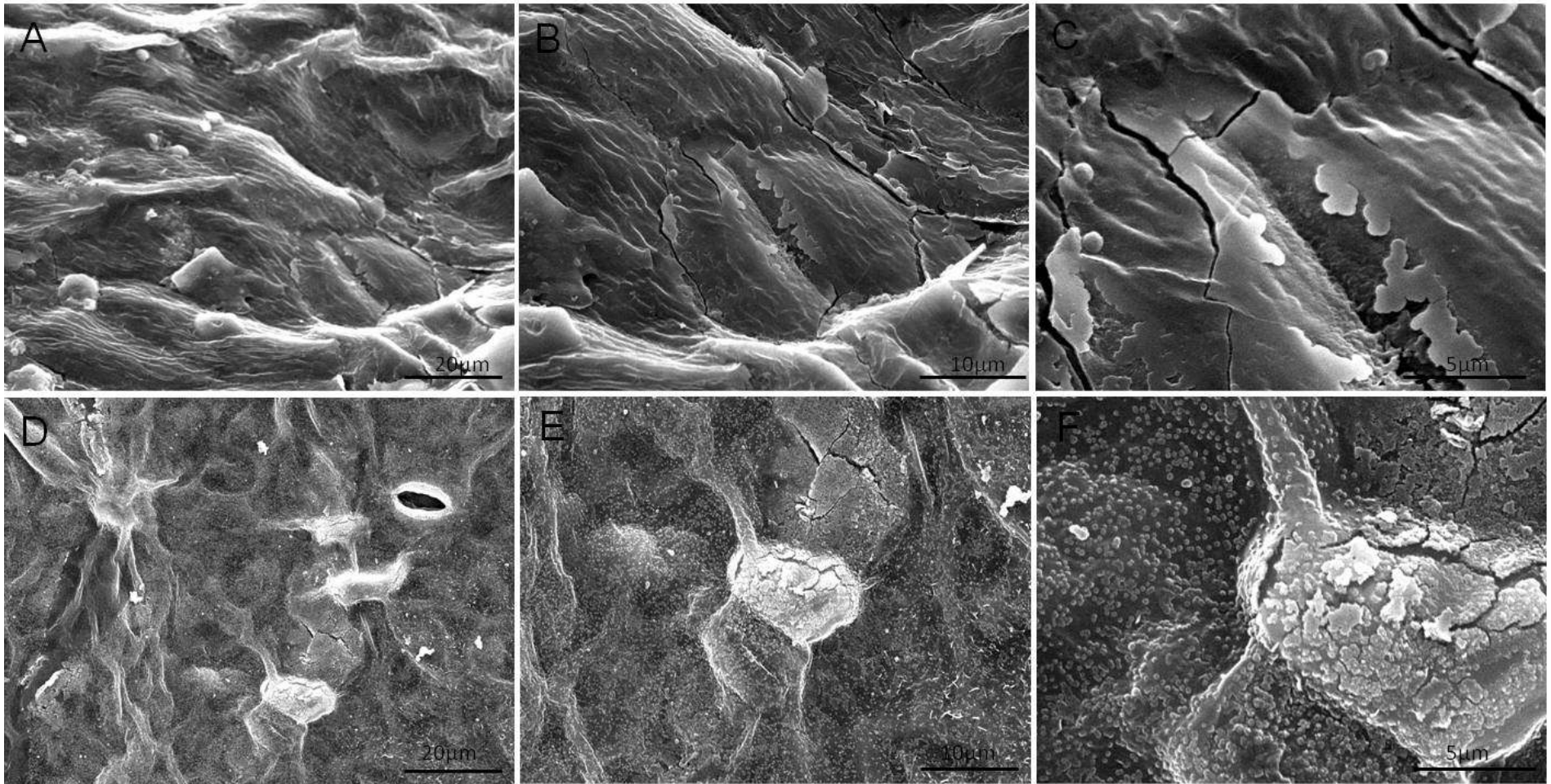


Abbildung 20: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von alten *Vitis vinifera* Blättern

A+B+C: Blattoberseite mit plattenförmigen Wachsen, D+E+F: Blattunterseite mit Stomata (D) und kugelförmigen Wachsformationen.

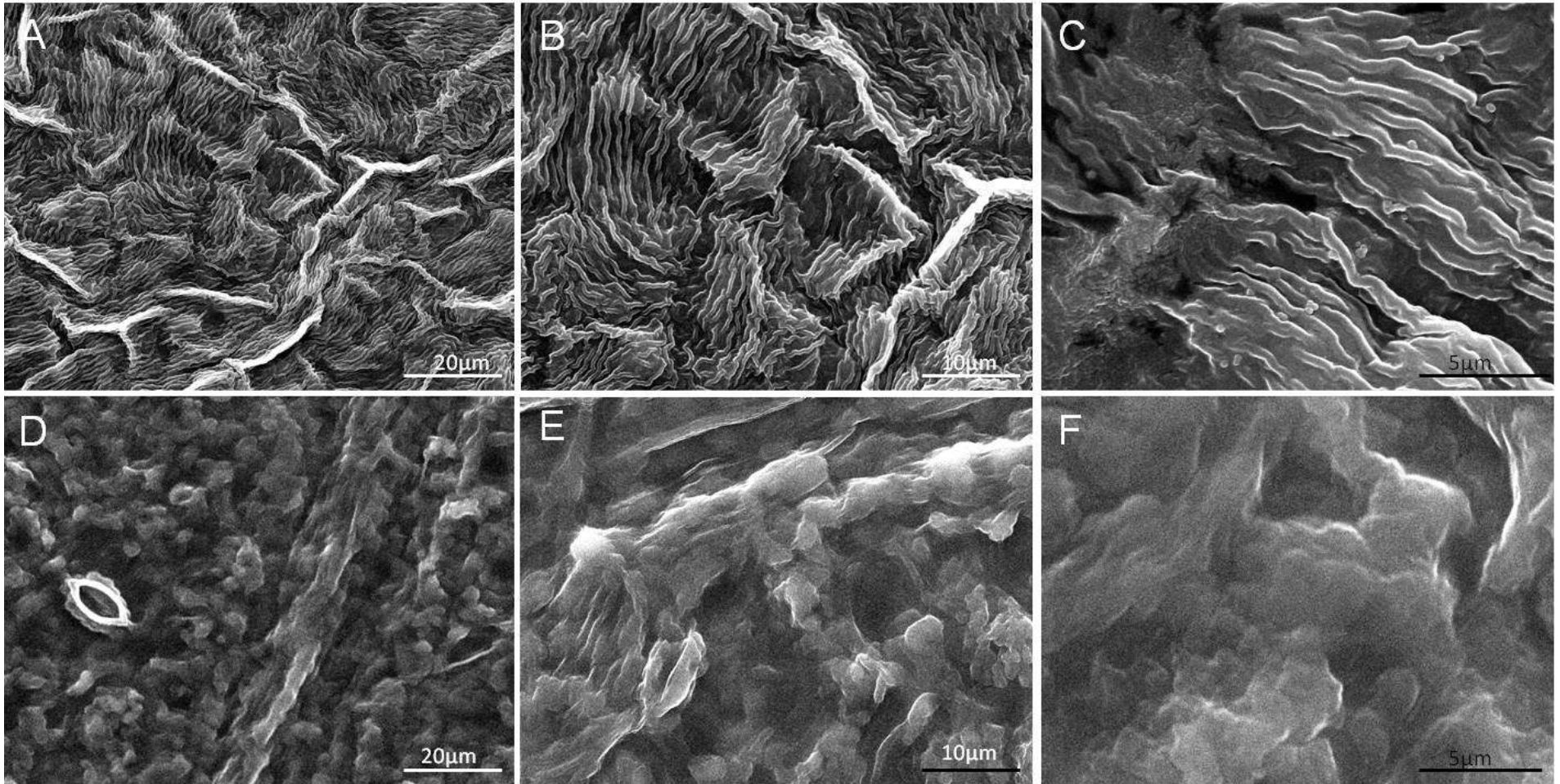


Abbildung 21: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von jungen *Vitis vinifera* Blättern
 A+B+C: Blattoberseite mit Kutikularfalten, D+E+F: Blattunterseite mit schuppenartigen Wachsen und Stomata (D).

3.1.2.4 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von *Malus domestica* Blättern

Die Oberflächenwachse der Blattober- und Unterseite von alten *Malus domestica* Blättern wiesen eine plattenähnliche Struktur auf (Abbildung 22 A, B und F). Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen Stomata nur auf der Blattunterseite (Abbildung 22 D und E). Auf der Blattoberseite konnten Regionen gefunden werden, in denen die plattenförmigen, glatten Strukturen der Wachse durch kristallartige Formationen unterbrochen wurden (C). Durch die Probenvorbereitung im Hochvakuum sind die darunterliegenden antiklinen Zellwände sichtbar geworden (D, E). Bei jungen *Malus domestica* Blättern wiesen die Wachse der Ober- und Unterseite eine glatte, plattenförmige Formation auf (Abbildung 23 A, B, C und F). Stomata konnten nur auf der Unterseite nachgewiesen werden (Abbildung 23 D und E).

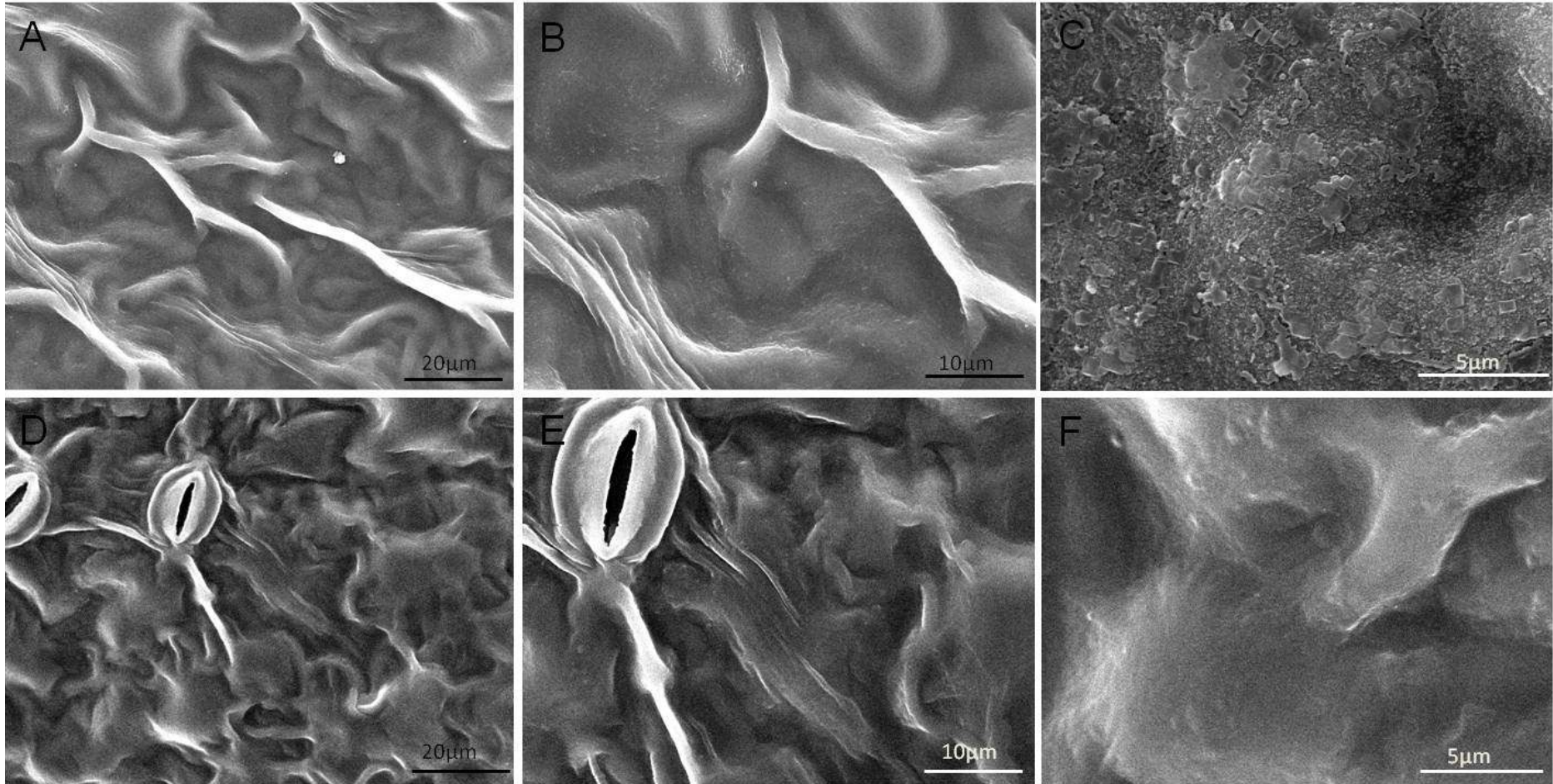


Abbildung 22: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von alten *Malus domestica* Blättern
A+B+C: Blattoberseite mit plattenähnlichen Strukturen, D+E+F: Blattunterseite mit Stomata (D und E).

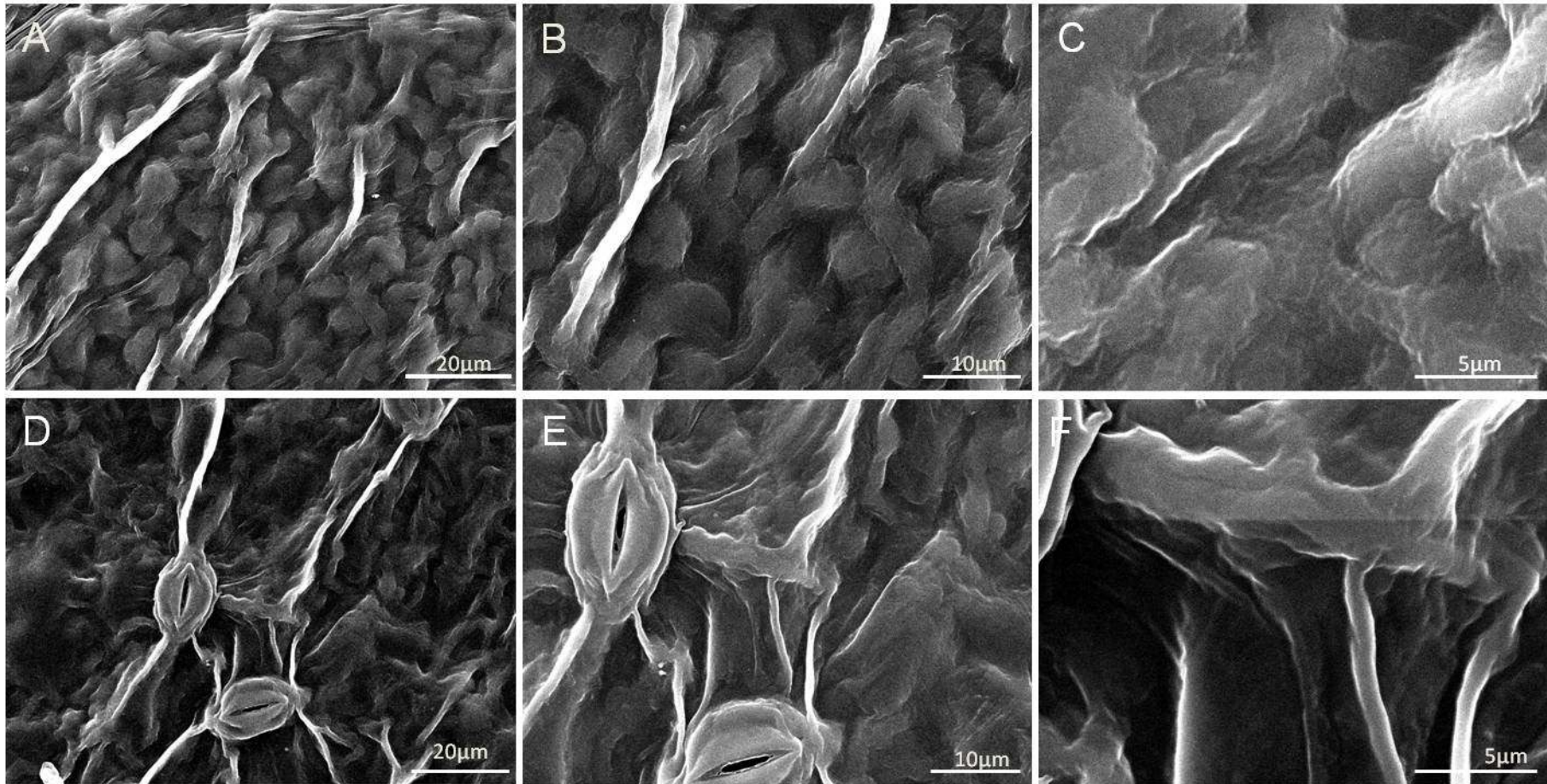


Abbildung 23: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von jungen *Malus domestica* Blättern
A+B+C: Blattoberseite mit glatten plattenähnlichen Wachsstrukturen, D+E+F: Blattunterseite mit Stomata (D und E).

3.1.3 Chemisch analytische Untersuchungen der Blattoberflächenwachse

Neben getrennten Wachsanalysen der Blattober- und Blattunterseiten junger und alter Blätter (Kapitel 2.2.7), wurden auch Wachsanalysen ganzer Blätter durchgeführt. Um ein Tiefenprofil der Oberflächenwachse zu erstellen, wurden die Blattoberseiten von *Solanum tuberosum*, *Vitis vinifera* und *Malus domestica* zwei Mal in Folge mit Kollodium behandelt (Kapitel 2.2.3) und die so erhaltenen Wachsmengen mit der Menge der Totalextraktionen verglichen. Bei Blättern der Art *Solanum lycopersicum* konnte der Ansatz der selektiven Wachs Entfernung nicht durchgeführt werden, da die Blätter aufgrund ihres filigranen Aufbaus und der Vielzahl der Trichome sofort beschädigt wurden. Eine Unterscheidung in epi- und intrakutikuläre Wachse und die Erstellung eines Tiefenprofils war somit hier nicht möglich. Im Folgenden werden die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei parallelen Analysen dargestellt. Bei der selektiven Entfernung der Oberflächenwachse wurden die Wachsmengen aufsummiert. In der Wachsmenge der zweiten Behandlung ist die Menge der Ersten bereits enthalten. Die Ergebnisse der chemischen Analysen wurden sowohl innerartlich als auch zwischen den Arten verglichen.

3.1.3.1 Chemisch analytische Untersuchungen von *Solanum tuberosum* Blattwachsen

Die Gesamtwachsextraktion ganzer Blätter erfolgte wie in 2.2.1 beschrieben. Bei der Gesamtwachsextraktion von alten *Solanum tuberosum* Blättern konnten insgesamt 26 Einzelsubstanzen (Abbildung 24) der Substanzklassen der Säuren ($0,08 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Alkohole ($0,29 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Alkane ($0,74 \pm 0,13 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), anteiso-Alkane ($0,08 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), iso-Alkane ($0,16 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und Sterole ($0,05 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) nachgewiesen werden. Neben diesen Stoffklassen konnten Substanzen gefunden werden, die nach ihrem Zerfallsspektrum her aller Voraussicht nach den Zuckerestern zu zuordnen sind. Diese Substanzen wurden als nicht-identifizierte Substanzen X bezeichnet und wiesen einen Gehalt von $0,04 \pm 0,0007 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf. Auch bei der Gesamtwachsextraktion junger *Solanum tuberosum* Blättern konnten 26 Einzelsubstanzen (Abbildung 24) identifiziert werden. Wie bei den alten Blättern machten ebenfalls bei jungen Blättern die unverzweigten Alkane mit $0,54 \pm 0,15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ den größten Anteil aus, gefolgt von den Alkoholen ($0,32 \pm 0,08 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und den iso-Alkanen ($0,20 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Neben diesen Substanzklassen konnten ferner Säuren ($0,09 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), anteiso-Alkane ($0,08 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Sterole ($0,08 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und die den Zuckerestern zugeordneten Substanzen X ($0,05 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) gefunden werden.

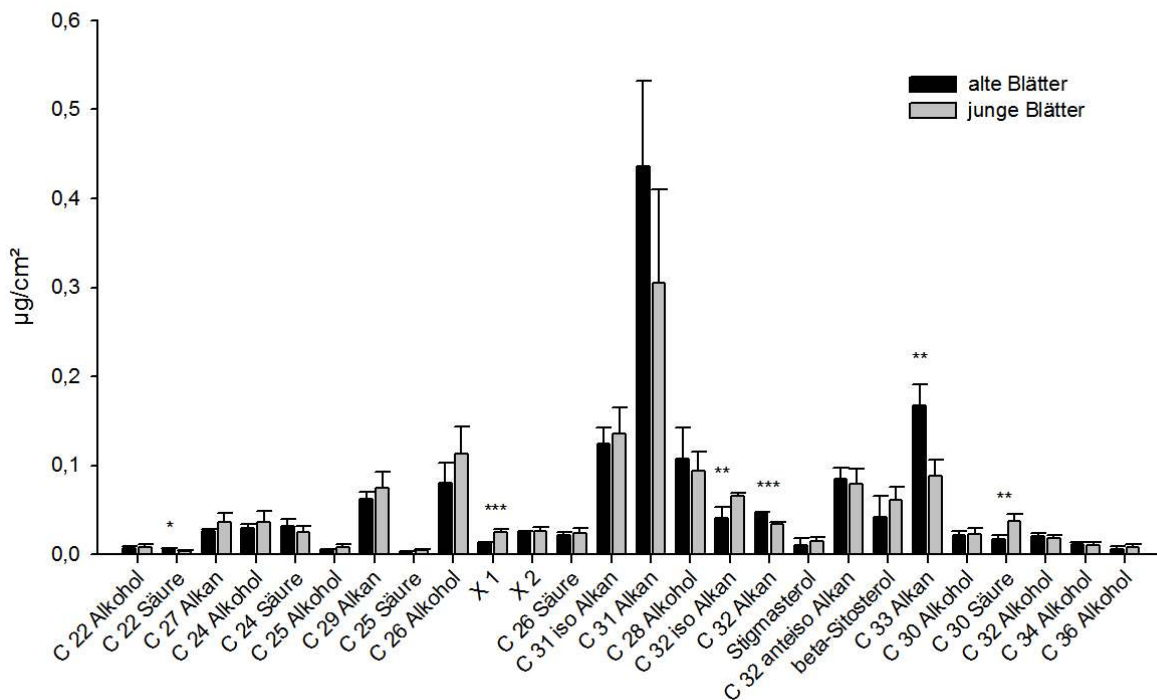


Abbildung 24: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Gesamtwachsanalyse von alten und jungen *Solanum tuberosum* Blättern geordnet nach der Retentionszeit der Substanzen

Dargestellt sind die Einzelsubstanzen der Analyse. Die Grafik zeigt die Mittelwerte samt Standardabweichungen, *** $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; * $p < 0,10$ =signifikante Änderungen zwischen alten und jungen Blättern.

Die getrennte Extraktion der Blattwaxe der Ober- und Unterseite von alten Blättern konnte deutlich zeigen, dass der Anteil der Alkohole ($0,52 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Alkane ($0,94 \pm 0,17 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), der Substanzen X ($0,06 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und der Sterole ($0,09 \pm 0,10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) auf der Blattoberseite erhöht ist (Abbildung 25 A). Der Anteil der anteiso-Alkane ($0,06 \pm 0,001 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und iso-Alkane ($0,09 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) war dagegen im Vergleich dazu auf der Blattunterseite erhöht. Die Stoffklassenverteilung auf der Blattober- und Blattunterseite wiederholte sich bei der Betrachtung von jungen Blättern (Abbildung 25 B). Auch da waren die Säuren ($0,09 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Alkohole ($0,74 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Alkane ($0,72 \pm 0,27 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Sterole ($0,16 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und Substanzen X ($0,09 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) vermehrt auf der Blattoberseite und die anteiso-Alkane ($0,08 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und iso-Alkane ($0,2 \pm 0,08 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) vermehrt auf der Blattunterseite zu finden.

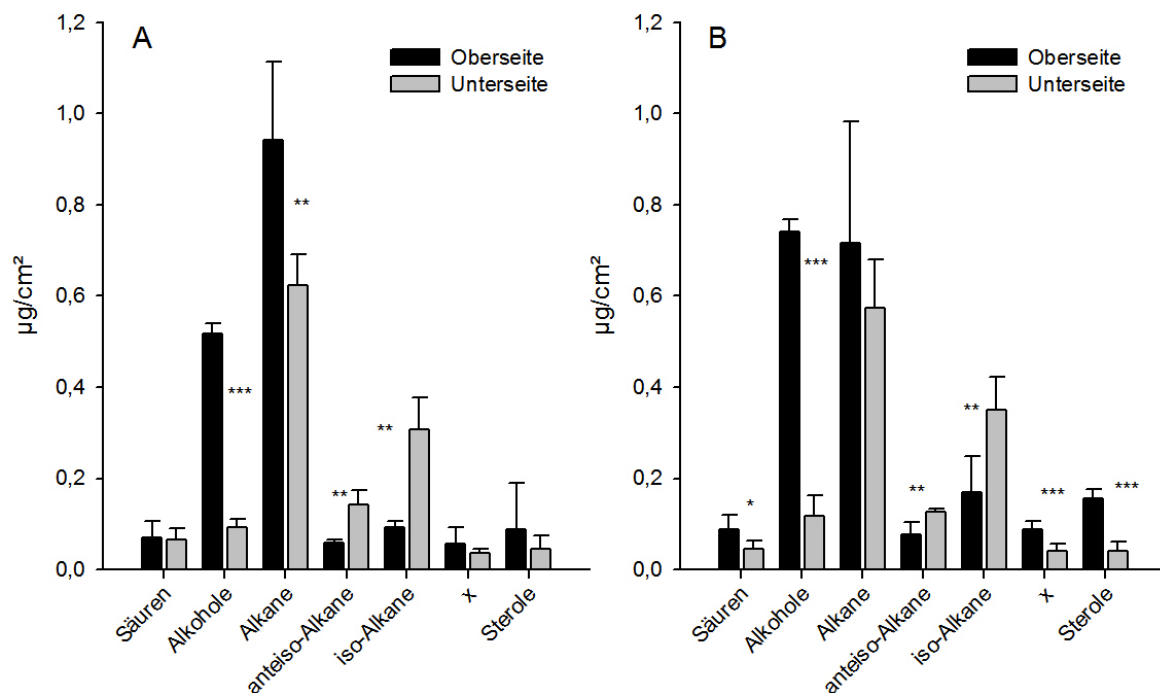


Abbildung 25: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalyse der Ober- und Unterseite alter (A) und junger (B) *Solanum tuberosum* Blätter

Dargestellt sind die einzelnen Substanzklassen der Oberflächenwache. Die Grafik zeigt die Mittelwerte samt Standardabweichungen, *** $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; * $p < 0,10$ =signifikante Änderungen zwischen Ober- und Unterseiten der Blätter.

Die Betrachtung der Kettenlängenverteilung machte deutlich, dass sowohl bei alten (Abbildung 26 A), als auch bei jungen (Abbildung 26 B) *Solanum tuberosum* Blättern bestimmte Kettenlängen und Substanzen vermehrt auf der Blattoberseite auftraten. Dazu zählten kurzkettigere Monomere der Kettenlängen C_{24} , C_{26} , C_{27} und C_{28} , aber auch längerkettige Monomere der Kettenlänge C_{33} , C_{34} , als auch zyklische Substanzen wie Sterole.

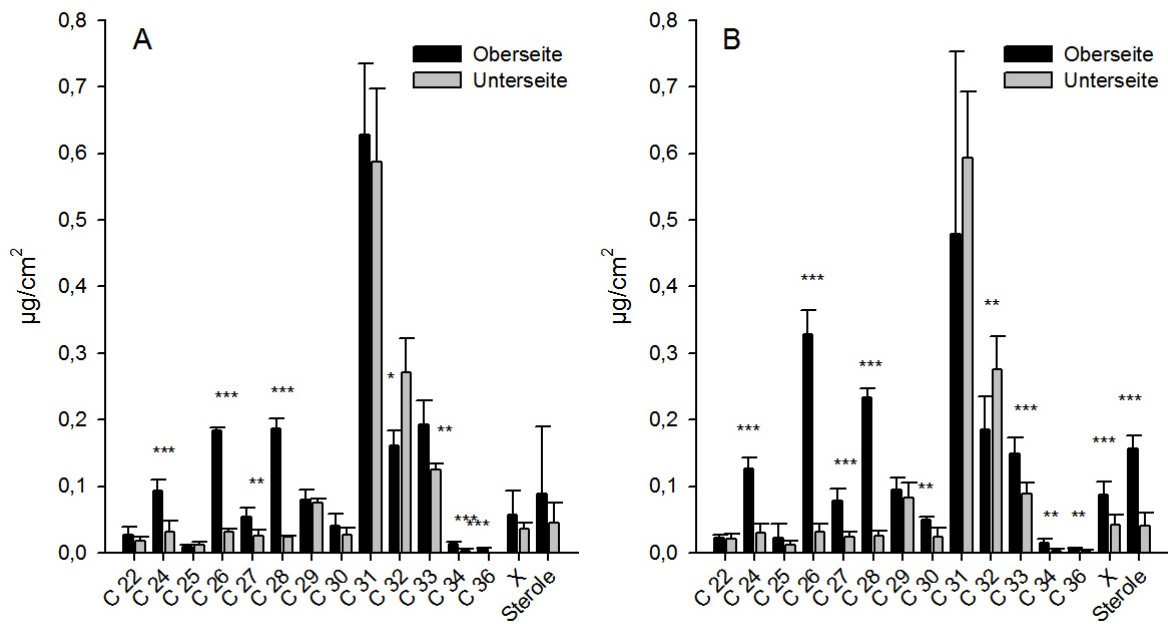


Abbildung 26: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalyse der Ober- und Unterseite alter (A) und junger (B) *Solanum tuberosum* Blätter

Dargestellt ist das Wachs aufgeteilt nach einzelnen Kettenlängen. Die Grafik zeigt die Mittelwerte samt Standardabweichungen, *** $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; * $p < 0,10$ =signifikante Änderungen zwischen Ober- und Unterseiten der Blätter.

3.1.3.1.1 Selektive Entfernung der Wachse von *Solanum tuberosum*

Blattoberseiten mittels Kollodium

Eine Betrachtung der Wachsmengen, die durch das Behandeln der Blattoberseiten mit Kollodium entfernt werden konnten, machte deutlich, dass mit dem ersten Stripp die größte Wachsmenge entfernt werden konnte (Abbildung 27 A und B). Dies waren bei alten Blättern $0,40 \pm 0,11 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Abbildung 27 A) und bei jungen Blättern $0,45 \pm 0,20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (B). Die Wachsmenge stieg mit der zweiten Behandlung aufsummiert auf $0,67 \pm 0,11 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bei alten Blättern und auf $0,79 \pm 0,28 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bei jungen Blättern an. Eine parallele Gesamtwachsextraktion in Chloroform ergab für alte Blätter eine Wachsmenge von $1,44 \pm 0,22 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und für junge Blätter eine Gesamtwachsmenge von $1,36 \pm 0,32 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

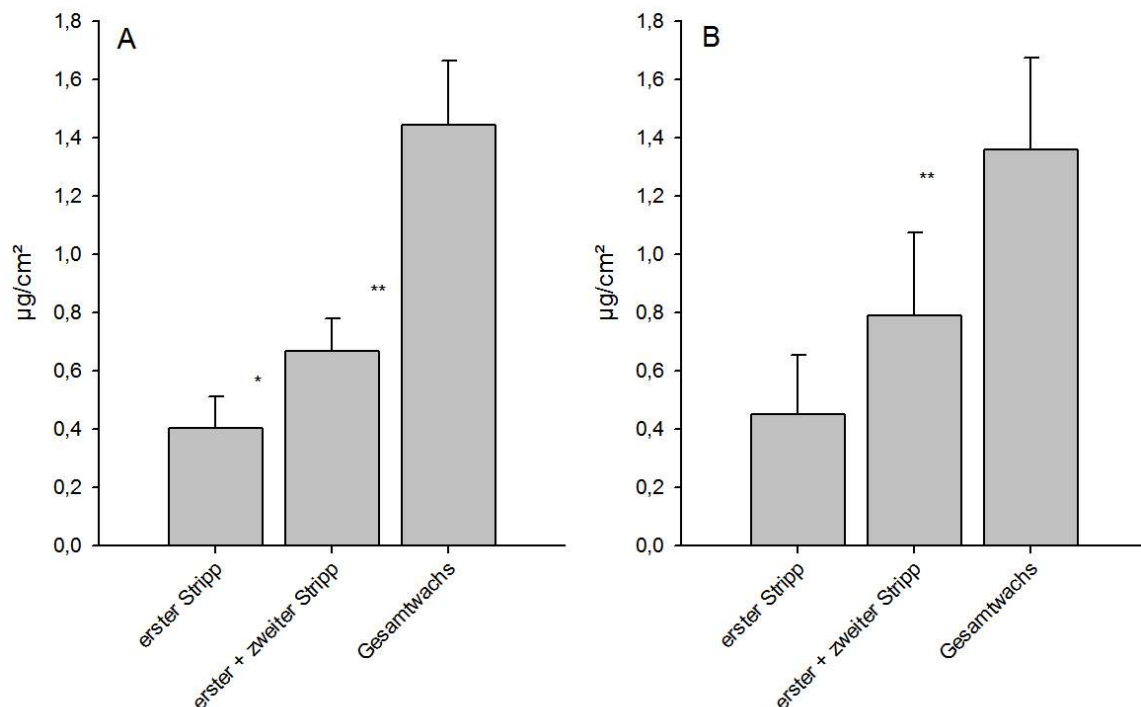


Abbildung 27: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Analyse der abgehobenen Wachse von *Solanum tuberosum* Blattoberseiten mit Kollodium

Dargestellt ist die aufsummierte Menge der abgehobenen Wachse von alten (A) und jungen (B) *S. tuberosum* Blättern. Die Grafik zeigt die Mittelwerte aus drei parallelen Analysen samt Standardabweichungen, *** $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; * $p < 0,10$ =signifikante Änderungen zwischen den Behandlungen bzw. zum Gesamtwachs.

Eine Betrachtung der einzelnen Substanzklassen machte deutlich, dass mit der ersten Behandlung vor allem Alkane ($0,25 \pm 0,09 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), gefolgt von Alkoholen ($0,09 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) von der Oberfläche alter Blätter entfernt wurden. Der Anteil der Säuren ($0,02 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), iso-Alkanen ($0,01 \pm 0,005 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), der Substanzen X ($0,02 \pm 0,006 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), anteiso-Alkanen ($0,009 \pm 0,003 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und Sterolen ($0,008 \pm 0,003 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) war im Vergleich dazu gering und konnte in höheren Mengen erst

durch eine Gesamtwachsextraktion isoliert werden (Abbildung 28 A). Der Wachsgehalt stieg stetig bei allen Substanzen von der ersten zu der zweiten Behandlung an. Bei jungen *Solanum tuberosum* Blättern konnten mit der ersten Behandlung vor allem Alkane ($0,19 \pm 0,10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Alkohole ($0,10 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und auch Sterole ($0,06 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) von der Blattoberseite entfernt werden (Abbildung 28 B). Die Menge an Säuren ($0,03 \pm 0,004 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), iso-Alkanen ($0,02 \pm 0,002 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), der Substanzen X ($0,02 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und der anteiso-Alkane ($0,01 \pm 0,003 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) war dagegen geringer. Die Menge der einzelnen Substanzen stieg ebenfalls mit der zweiten Behandlung an und ähnelte, ausgenommen von der Menge der iso-Alkane, den Mengen der Gesamtwachsextraktion. Eine signifikante Menge an iso-Alkanen ($0,20 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) konnte erst durch die Gesamtwachsextraktion isoliert werden.

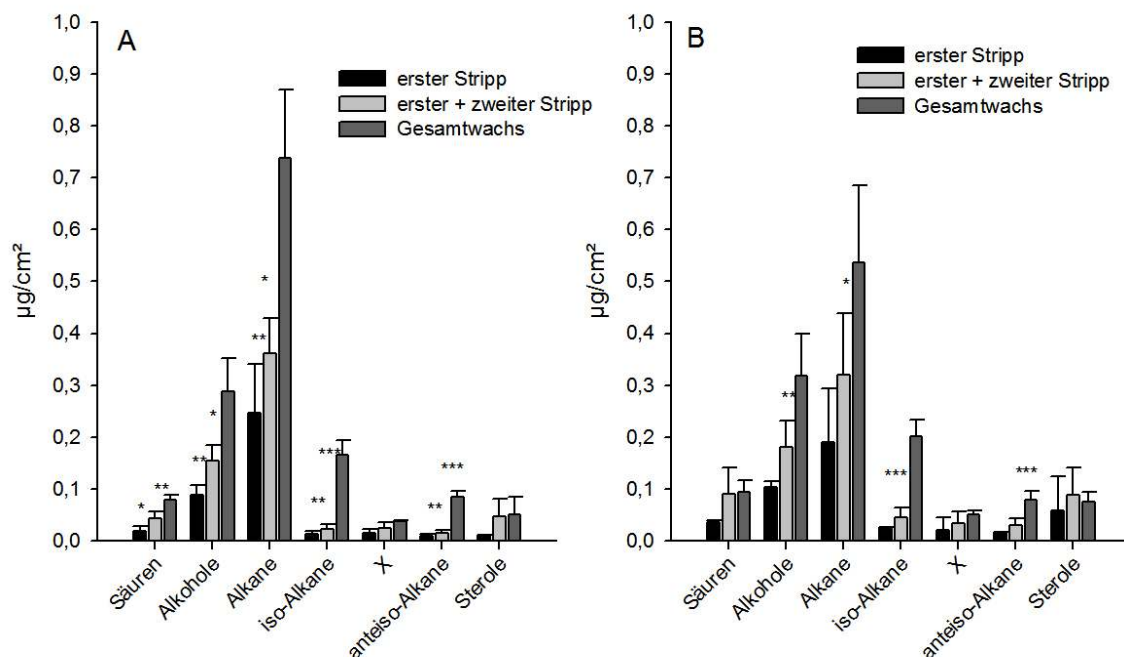


Abbildung 28: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Analysen der abgehobenen Wachse von *Solanum tuberosum* Blattoberseiten mit Kollodium

Dargestellt ist die aufsummierte Menge der abgehobenen Wachse von alten (A) und jungen (B) *S. tuberosum* Blättern, aufgeteilt nach Substanzklassen. Die Grafik zeigt die Mittelwerte aus drei parallelen Analysen samt Standardabweichungen, ***p < 0,01; **p < 0,05; *p < 0,10=signifikante Änderungen zwischen den Behandlungen bzw. zum Gesamtwachs.

Eine Diskriminierung in den Kettenlängen konnte weder bei den alten (Abbildung 29 A) noch bei den jungen *Solanum tuberosum* Blättern (Abbildung 29 B) gefunden werden. Durch die Behandlung der Oberfläche mit Kollodium konnten sowohl kurzkettenige als auch langkettige Monomere entfernt werden. Die Menge der einzelnen Kettenlängen (außer C₃₁) entsprach nach der zweiten Behandlung statistisch der Menge der Kettenlängen der

Gesamtwachsextraktion. Substanzen der Kettenlänge C₃₁ konnten erst durch eine Gesamtwachsextraktion in größeren Mengen erhalten werden.

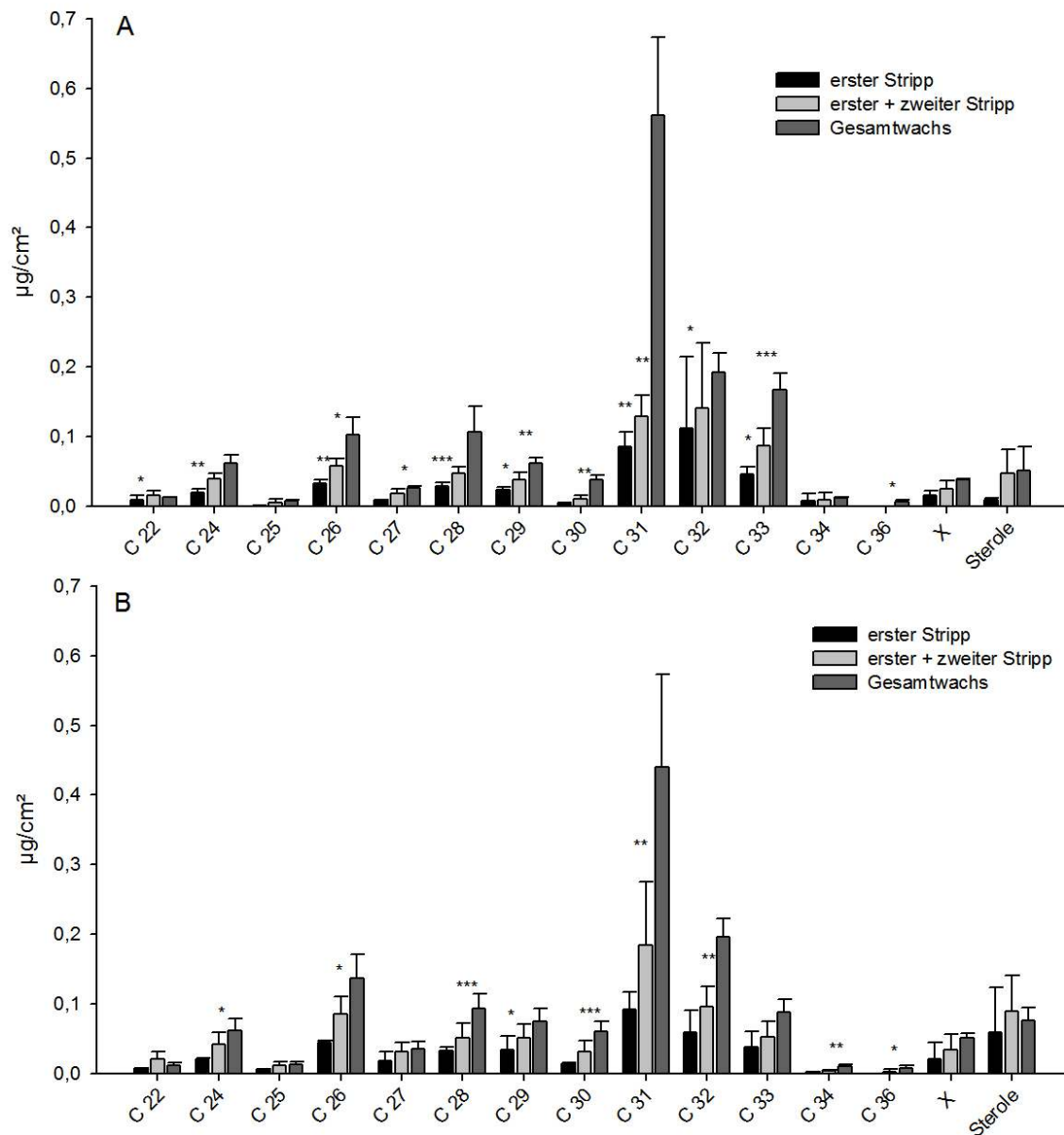


Abbildung 29: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Analysen der abgehobenen Wachse von *Solanum tuberosum* Blattoberseiten mit Kollodium

Dargestellt ist die aufsummierte Menge der abgehobenen Wachse von alten (A) und jungen (B) *S. tuberosum* Blättern nach Kettenlängen. Die Grafik zeigt die Mittelwerte aus drei parallelen Analysen samt Standardabweichungen, *** $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; * $p < 0,10$ =signifikante Änderungen zwischen den Behandlungen bzw. zum Gesamtwachs.

3.1.3.2 Chemisch analytische Untersuchungen von *Solanum*

lycopersicum Blattwachsen

Eine Totalwachsextraktion von jeweils drei alten und drei jungen *Solanum lycopersicum* Blättern ergab im Mittel für alte Blätter eine Gesamtwachsmenge von $1,6 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und für junge Blätter eine Wachsmenge von $1,2 \pm 0,16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Es konnten 16 Einzelsubstanzen der Substanzklassen der Alkane, anteiso-Alkane, iso-Alkane und der Substanzen X gefunden werden (Abbildung 30). Die Substanzen X wiesen analog zu *Solanum tuberosum* ein Zerfallsspektrum auf, welches auf Zuckerester hinwies. Der Hauptbestandteil des Wachses war bei *Solanum lycopersicum* Gesamtwachsextrakten das C₃₁ Alkan (alte Blätter: $0,62 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, junge Blätter: $0,43 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), gefolgt von dem C₃₁ iso-Alkan (alte Blätter: $0,25 \pm 0,07 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, junge Blätter: $0,18 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), dem C₃₃ Alkan (alte Blätter: $0,21 \pm 0,002 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, junge Blätter: $0,14 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und dem C₃₃ iso-Alkan (alte Blätter: $0,13 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, junge Blätter: $0,09 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

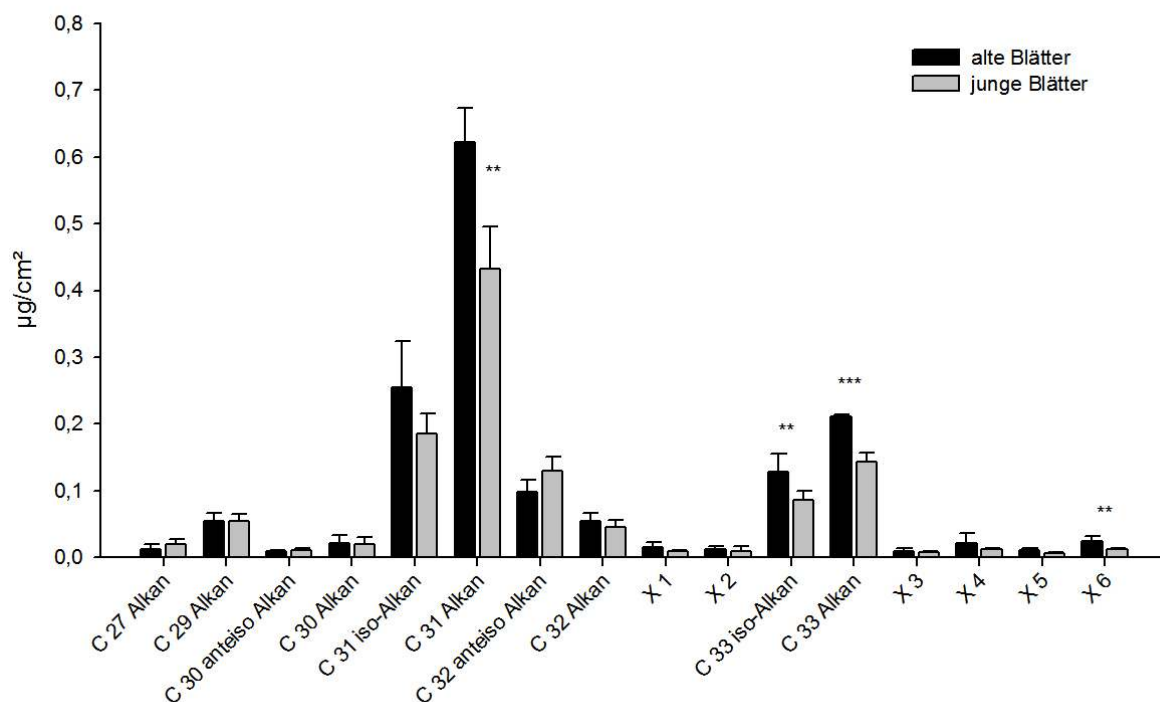


Abbildung 30: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Gesamtwachsanalyse von alten und jungen *Solanum lycopersicum* Blättern geordnet nach der Retentionszeit der Substanzen
Dargestellt sind die Einzelsubstanzen der Analyse. Die Grafik zeigt die Mittelwerte samt Standardabweichungen, ***p < 0,01; **p < 0,05; *p < 0,10=signifikante Änderungen zwischen alten und jungen Blättern.

Bei der Betrachtung der Substanzklassenverteilung fiel auf, dass sich die langkettigen, unverzweigten Alkane sowohl bei den alten (Abbildung 31 A) als auch bei den jungen Blättern (Abbildung 31 B) vermehrt auf der Blattoberseite befanden (altes Blatt Oberseite: $1,24 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, junges Blatt Oberseite: $0,79 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Die anteiso-Alkane und die Substanzen X waren bei beiden Altersstadien der Blätter zu fast gleichen Teilen auf der Blattober- und Blattunterseite lokalisiert. Die iso-Alkane waren bei allen untersuchten *Solanum lycopersicum* Blättern vermehrt auf der Blattunterseite zu finden (altes Blatt Unterseite: $0,61 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, junges Blatt Unterseite: $0,48 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

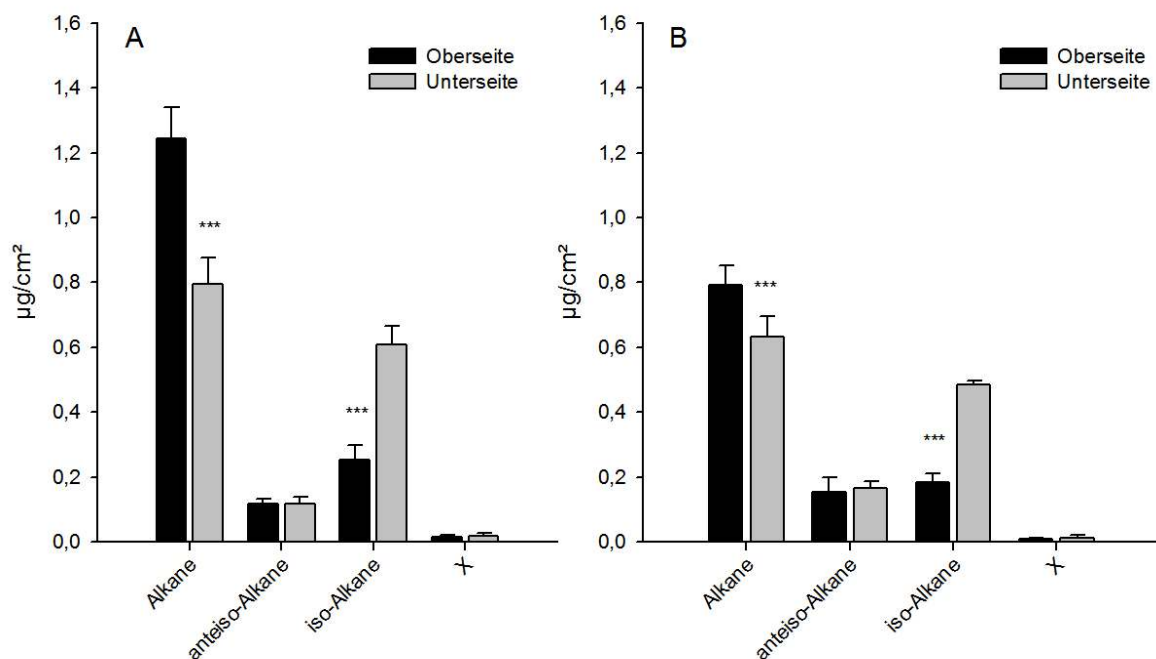


Abbildung 31: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalyse der Ober- und Unterseite alter (A) und junger (B) *Solanum lycopersicum* Blätter

Dargestellt sind die Substanzklassen der Oberflächenwachse. Die Grafik zeigt die Mittelwerte samt Standardabweichungen, *** $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; * $p < 0,10$ =signifikante Änderungen zwischen Ober- und Unterseiten der Blätter.

Bei alten (Abbildung 32 A) und jungen (Abbildung 32 B) *Solanum lycopersicum* Blattwachsen war die prominenteste Kettenlänge C_{31} , gefolgt von Substanzen der Kettenlängen C_{33} und C_{32} . Kurzkettigere Monomere der Längen C_{27} - C_{30} kamen bei beiden Altersstufen vermehrt auf der Blattoberseite vor, wohingegen Substanzen der Kettenlänge C_{33} tendenziell eher auf der Blattunterseite vorkamen. Die Substanzen X kamen zu etwa gleichen Teilen auf der Ober- und Unterseite vor.

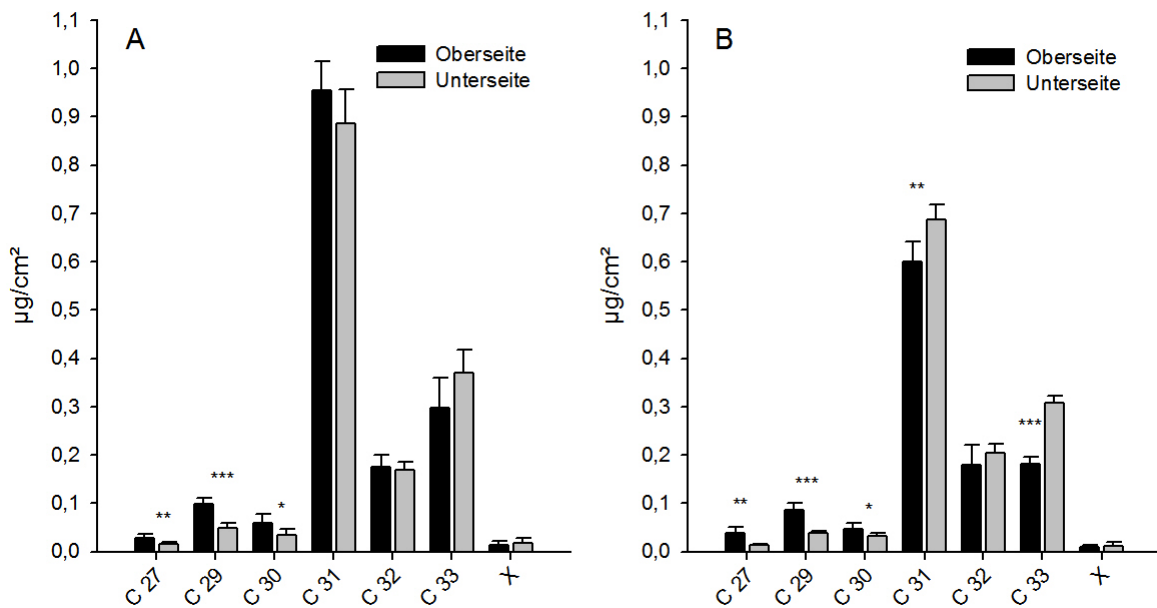


Abbildung 32: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalyse der Ober- und Unterseite alter (A) und junger (B) *Solanum lycopersicum* Blätter

Dargestellt ist das Kettenlängenspektrum der Oberflächenwachse. Die Grafik zeigt die Mittelwerte samt Standardabweichungen, *** $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; * $p < 0,10$ =signifikante Änderungen zwischen Ober- und Unterseiten der Blätter.

3.1.3.2.1 Selektive Entfernung der Oberflächenwachse von *Solanum lycopersicum* Blättern mittels Kollodium

Das selektive Entfernen der Oberflächenwachse mit Hilfe von Kollodium konnte an *Solanum lycopersicum* Blättern nicht erfolgen, da sich die Strips nicht von selbst von der Oberfläche lösten. Der Versuch den Stripp mit der Pinzette zu entfernen führte zu Verletzungen der Blätter und machte eine Unterscheidung in epi- und intrakutikuläre Wachse und somit auch die Erstellung eines Tiefenprofils der Wachse unmöglich.

3.1.3.3 Chemisch analytische Untersuchungen von *Vitis vinifera* Blattwachsen

Analog zu den chemisch analytischen Untersuchungen von *Solanum tuberosum* und *Solanum lycopersicum* wurde auch eine Gesamtwachsanalyse von *Vitis vinifera* Blättern unterschiedlichen Alters durchgeführt. Diese Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen der selektiven Entfernung der Oberflächenwachse mit Kollodium verglichen. Bei der Gesamtwachsanalyse von jeweils drei Blättern konnten bei alten Blättern 35 Substanzen und eine Gesamtwachsmenge von $3,40 \pm 0,87 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ extrahiert werden. Das Wachs der jungen Blätter bestand aus 34 Substanzen und wies eine Menge von $2,65 \pm 0,61 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf. Das Wachs bestand aus Säuren, Alkoholen, Alkanen, Aldehyden, Ketonen, Triterpenen, Sterolen

und Estern. Bei jungen wie auch alten Blättern machte die Substanzklasse der Alkohole den größten Anteil am Wachs aus. Der langkettige Ester C₄₈ konnte nur bei alten Blättern (0,04 ± 0,02 µg/cm²), nicht aber bei jungen Blättern gefunden werden (Abbildung 33).

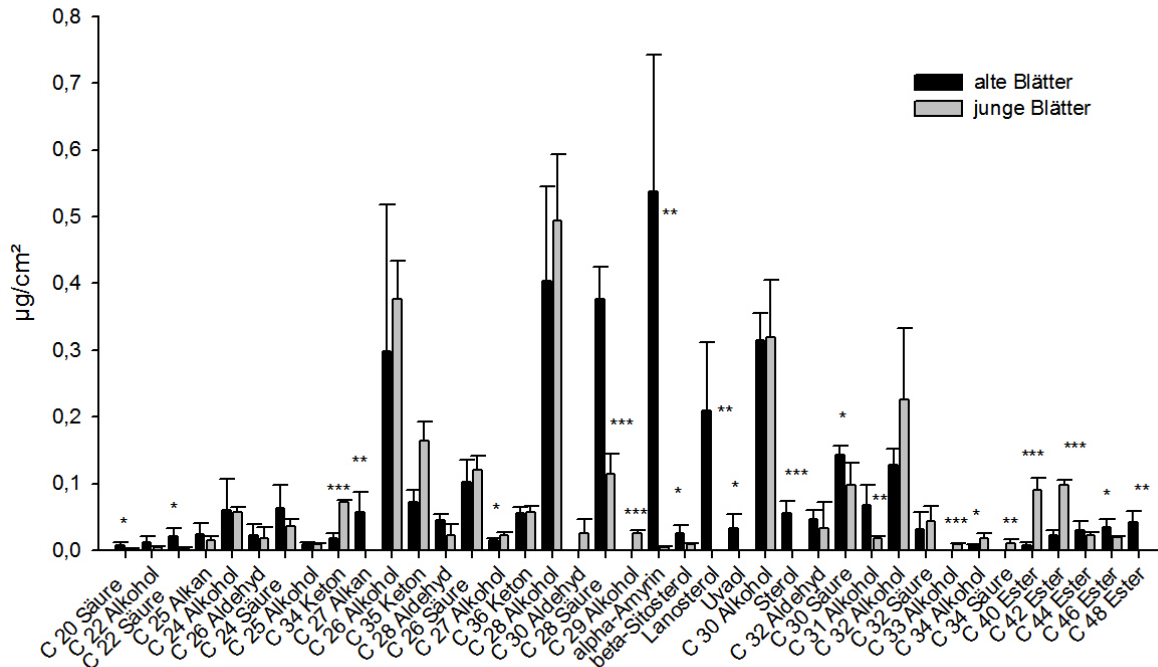


Abbildung 33: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Gesamtwachsanalyse von alten und jungen *Vitis vinifera* Blättern geordnet nach der Retentionszeit der Substanzen

Dargestellt sind die Einzelsubstanzen der Analyse. Die Grafik zeigt die Mittelwerte samt Standardabweichungen, ***p < 0,01; **p < 0,05; *p < 0,10=signifikante Änderungen zwischen alten und jungen Blättern.

Eine Betrachtung der Substanzklassenverteilung (Abbildung 34 A) zeigte, dass die Alkohole als prominenteste Substanzklasse bei alten *Vitis vinifera* Blättern vermehrt auf der Blattoberseite (3,9 ± 0,33 µg/cm²), genauso wie auch die Säuren (0,70 ± 0,07 µg/cm²), Aldehyde (0,24 ± 0,06 µg/cm²) und Triterpene (0,22 ± 0,03 µg/cm²) vorkamen. Tendenziell war der Anteil der Alkane und Ester hingegen auf der Blattunterseite höher. Der Anteil der einzelnen Substanzen war bei jungen Blättern (Abbildung 34 B) im Vergleich zu Alten geringer. Bei jungen Blättern konnten die Alkohole (2,88 ± 0,35 µg/cm²) ebenso wie die Säuren (0,31 ± 0,11 µg/cm²) und Ketone (0,38 ± 0,04 µg/cm²) überwiegend auf der Blattoberseite gefunden werden. Die Menge der Alkane, Aldehyde, Triterpene, Sterole und Ester war auf beiden Blattseiten annähernd gleich.

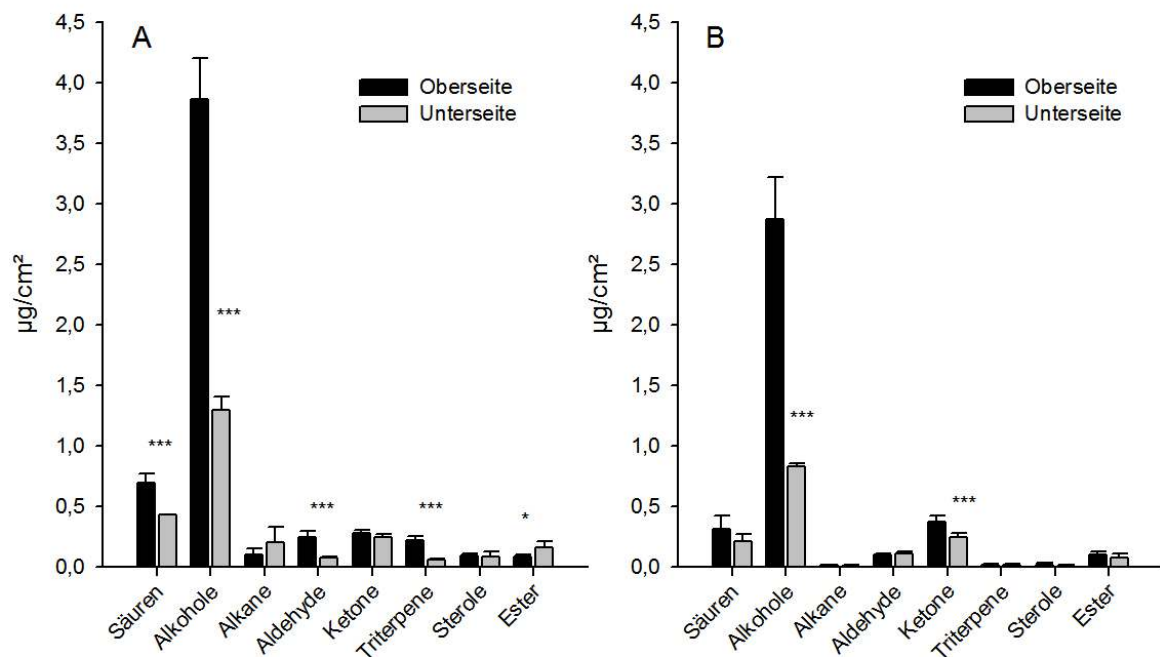


Abbildung 34: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalyse der Ober- und Unterseite alter (A) und junger (B) *Vitis vinifera* Blätter

Dargestellt sind die Substanzklassen der Oberflächenwache. Die Grafik zeigt die Mittelwerte samt Standardabweichungen, *** $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; * $p < 0,10$ =signifikante Änderungen zwischen Ober- und Unterseiten der Blätter.

Bei der Betrachtung der Kettenlängenverteilung konnten zum Teil klare Unterschiede zwischen Blattober- und Blattunterseite beobachtet werden. Die Menge der C_{24} - ($0,28 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), C_{26} - ($1,47 \pm 0,22 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), C_{28} - ($1,78 \pm 0,15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), C_{32} - ($0,43 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), C_{35} - ($0,14 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), und C_{36} - ($0,12 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) Monomere war bei alten Blättern auf der Blattoberseite höher als auf der dazugehörigen Blattunterseite (Abbildung 35 A). Substanzen der Kettenlängen C_{27} ($0,30 \pm 0,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), C_{34} ($0,10 \pm 0,009 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), C_{42} ($0,05 \pm 0,009 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und C_{44} ($0,07 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) waren hingegen bei alten *Vitis vinifera* Blättern vermehrt auf der Blattunterseite zu finden (Abbildung 35 A). Bei jungen Blättern konnten ebenfalls manche Kettenlängen vermehrt auf der Blattober- oder Blattunterseite gefunden werden. Substanzen mit den Kettenlängen C_{24} ($0,22 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), C_{26} ($0,93 \pm 0,12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), C_{28} ($0,89 \pm 0,14 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), C_{30} ($0,49 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), C_{32} ($0,52 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und C_{35} ($0,24 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) konnten auf der Oberseite in höheren Mengen gefunden werden (Abbildung 35 B). Wachskomponenten der Kettenlänge C_{34} waren mit $0,10 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ vermehrt auf der Blattunterseite lokalisiert.

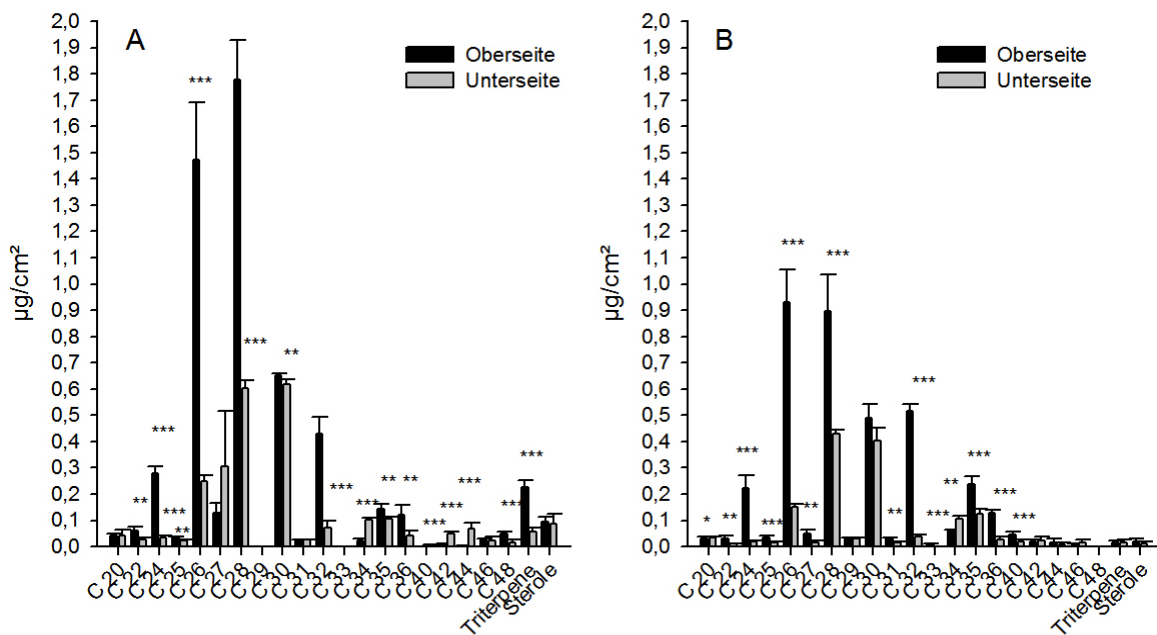


Abbildung 35: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalyse der Ober- und Unterseite alter (A) und junger (B) *Vitis vinifera* Blätter

Dargestellt ist das Kettenlängenspektrum der Oberflächenwaxe. Die Grafik zeigt die Mittelwerte samt Standardabweichungen, *** $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; * $p < 0,10$ =signifikante Änderungen zwischen Ober- und Unterseiten der Blätter.

3.1.3.3.1 Selektive Entfernung der Wachse von *Vitis vinifera* Blattoberseiten mittels Kollodium

Um ein Tiefenprofil der Oberflächenwaxe zu erstellen, wurden jeweils drei junge und drei alte *Vitis vinifera* Blätter zwei Mal in Folge mit Kollodium behandelt. Die sich nach der Trocknung ablösenden Strips wurden mittels GC/MS analysiert. Im Folgenden sind die Mengen der einzelnen Behandlungen aufsummiert und als Mittelwerte samt Standardabweichung dargestellt. Vergleichend dazu wurde eine Gesamtwachsanalyse durchgeführt.

Bereits mit der ersten Behandlung konnte bei alten *Vitis vinifera* Blättern ($1,10 \pm 0,19 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, Abbildung 36 A), verglichen zu jungen Blättern ($0,65 \pm 0,24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, Abbildung 36 B) eine größere Menge an Oberflächenwachsen abgehoben werden. Die Menge an Oberflächenwachsen nahm von der ersten zu der zweiten Behandlung zu und erreichte bei alten Blättern einen Wert von $1,60 \pm 0,33 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und bei den jungen Blättern einen Wert von $0,99 \pm 0,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Nicht nur die Menge der selektiv abgehobenen Wachse war bei alten *Vitis vinifera* Blättern höher, sondern auch die Wachsmenge der parallelen Gesamtwachsextraktion ($3,40 \pm 0,87 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

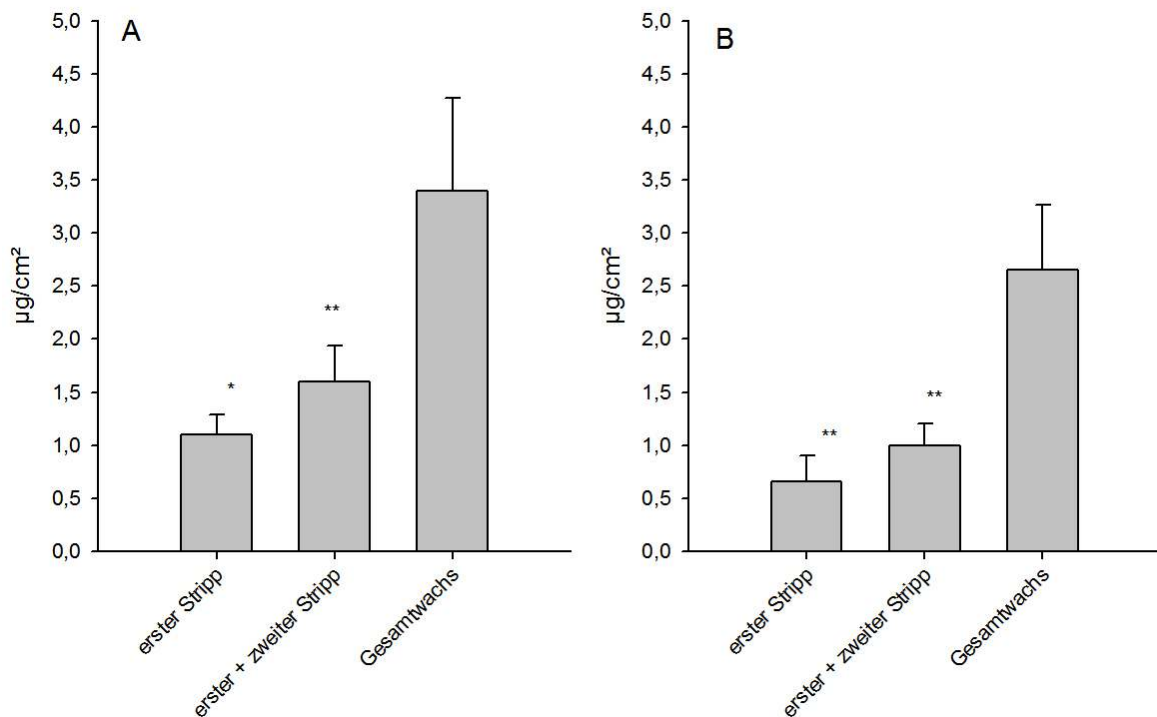


Abbildung 36: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalysen der abgehobenen Wachse von *Vitis vinifera* Blattoberseiten mit Kollodium

Dargestellt ist die aufsummierte Menge der abgehobenen Wachse von alten (A) und jungen (B) *V. vinifera* Blättern. Die Grafik zeigt die Mittelwerte aus drei parallelen Analysen samt Standardabweichungen, *** $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; * $p < 0,10$ =signifikante Änderungen zwischen den Behandlungen bzw. zum Gesamtwachs.

Von alten (Abbildung 37 A) und jungen *Vitis vinifera* Blättern (Abbildung 37 B) konnten mit der ersten Kollodiumbehandlung vor allem polare Komponenten wie Alkohole (alte Blätter: $0,85 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, junge Blätter: $0,36 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und Säuren (alte Blätter: $0,14 \pm 0,09 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, junge Blätter: $0,15 \pm 0,14 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) von der Oberfläche abgehoben werden. Die Menge der Alkane, Aldehyde, Ketone, Triterpene, Sterole und Ester war im Vergleich dazu geringer. Größere Mengen dieser Substanzen konnten erst durch die parallele Gesamtwachsextraktion isoliert werden.

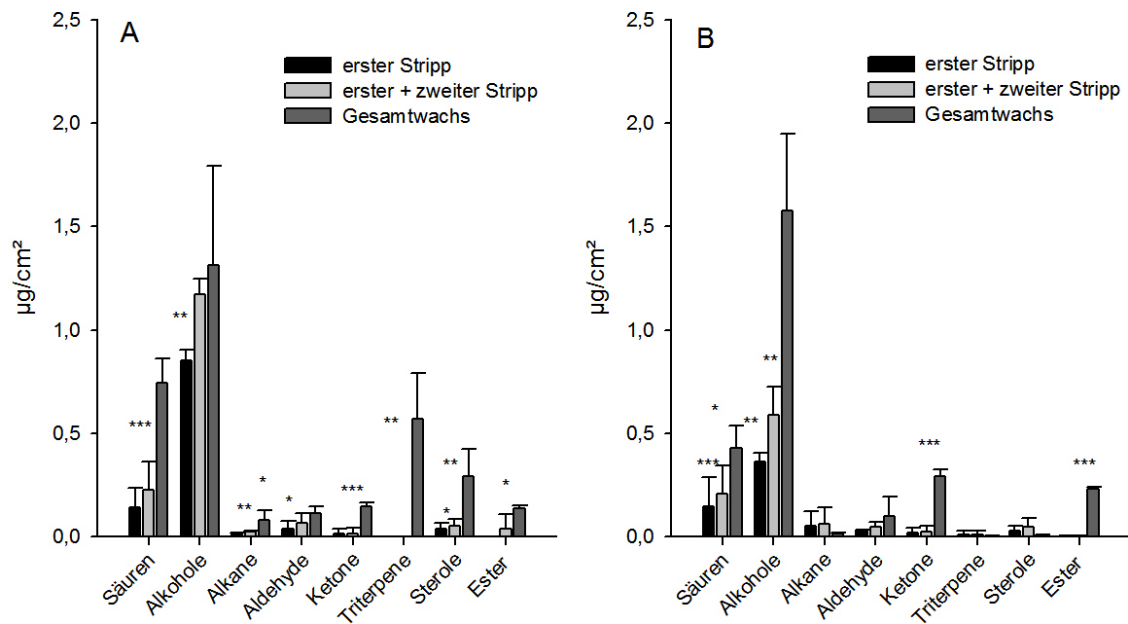


Abbildung 37: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalysen der abgehobenen Wachse von *Vitis vinifera* Blattoberseiten mit Kollodium

Dargestellt ist die aufsummierte Menge der abgehobenen Wachse von alten (A) und jungen (B) *V. vinifera* Blättern, aufgeteilt nach Substanzklassen. Die Grafik enthält die Mittelwerte aus drei parallelen Analysen samt Standardabweichungen, ***p < 0,01; **p < 0,05; *p < 0,10=signifikante Änderungen zwischen den Behandlungen bzw. zum Gesamtwachs.

Mit der selektiven Wachsentsfernung konnten vor allem Komponenten der Kettenlängen C₂₄ (junge Blätter: 0,04 ± 0,007 µg/cm², alte Blätter: 0,12 ± 0,03 µg/cm²), C₂₆ (junge Blätter: 0,13 ± 0,07 µg/cm², alte Blätter: 0,36 ± 0,01 µg/cm²), C₂₈ (junge Blätter: 0,15 ± 0,03 µg/cm², alte Blätter: 0,30 ± 0,03 µg/cm²), C₃₀ (junge Blätter: 0,08 ± 0,06 µg/cm², alte Blätter: 0,10 ± 0,04 µg/cm²) und C₃₂ (junge Blätter: 0,05 ± 0,02 µg/cm², alte Blätter: 0,06 ± 0,04 µg/cm²) von der Oberfläche entfernt werden. Längerkettige Monomere der Kettenlängen, C₄₀-C₄₆, Sterole und Triterpene traten nur in Spuren auf und konnten erst in der Gesamtwachsextraktion in höheren Mengen gefunden werden (Abbildung 38 A und B).

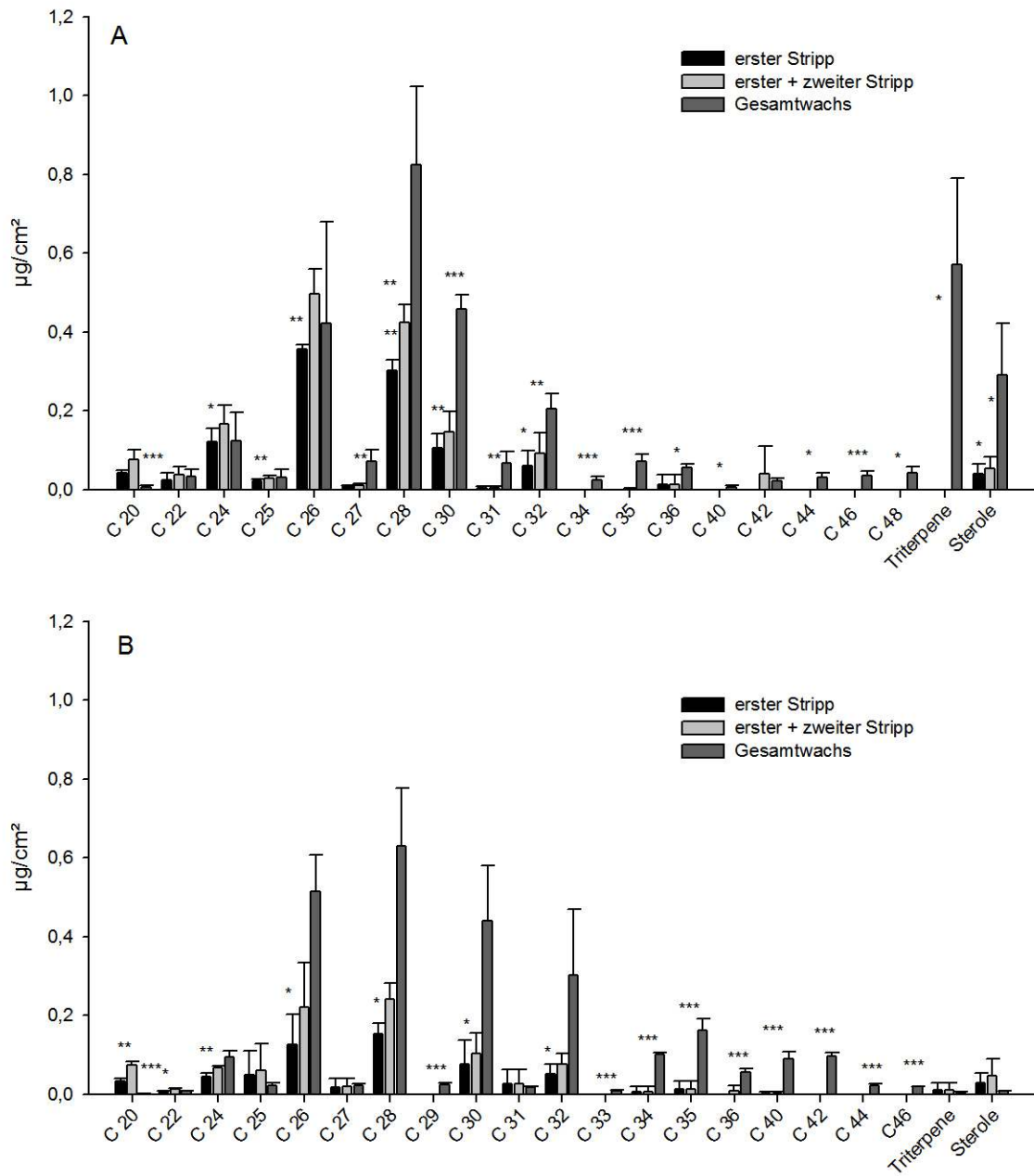


Abbildung 38: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalysen der abgehobenen Wachse von *Vitis vinifera* Blattoberseiten mit Kollodium

Dargestellt ist die aufsummierte Menge der abgehobenen Wachse von alten (A) und jungen (B) *V. vinifera* Blättern, aufgeteilt nach Kettenlängen. Die Grafik enthält die Mittelwerte aus drei parallelen Analysen samt Standardabweichungen, *** $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; * $p < 0,10$ =signifikante Änderungen zwischen den Behandlungen bzw. zum Gesamtwachs.

3.1.3.4 Chemisch analytische Untersuchungen von *Malus domestica*

Blattwachsen

Die Gesamtwachsextrakte wurden wie in 2.2.1 durchgeführt. Nach der Gesamtwachsextraktion von *Malus domestica* Blättern (n jeweils 3) konnten insgesamt 33 Einzelsubstanzen gefunden werden (Abbildung 39). Bei den jungen Blättern machten die Triterpene mit $1,70 \pm 0,12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ gefolgt von den Alkoholen ($0,83 \pm 0,14 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und Ketonen ($0,76 \pm 0,21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) den größten Anteil am Blattwachs aus. Neben diesen Verbindungen konnten ferner Ester ($0,67 \pm 0,16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Säuren ($0,29 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Sterole ($0,28 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und Alkane ($0,14 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) gefunden werden. Auch bei alten *Malus domestica* Blättern konnte dieses Substanzklassenspektrum identifiziert werden. Ihre relativen Anteile am Gesamtwachs unterschieden sich jedoch von denen junger Blätter. Den größten Anteil am Gesamtwachs machten bei alten Blättern die Alkohole ($0,76 \pm 0,07 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und Triterpene ($0,61 \pm 0,07 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) aus. Die Menge aller Substanzen war im Vergleich zu jungen Blättern geringer.

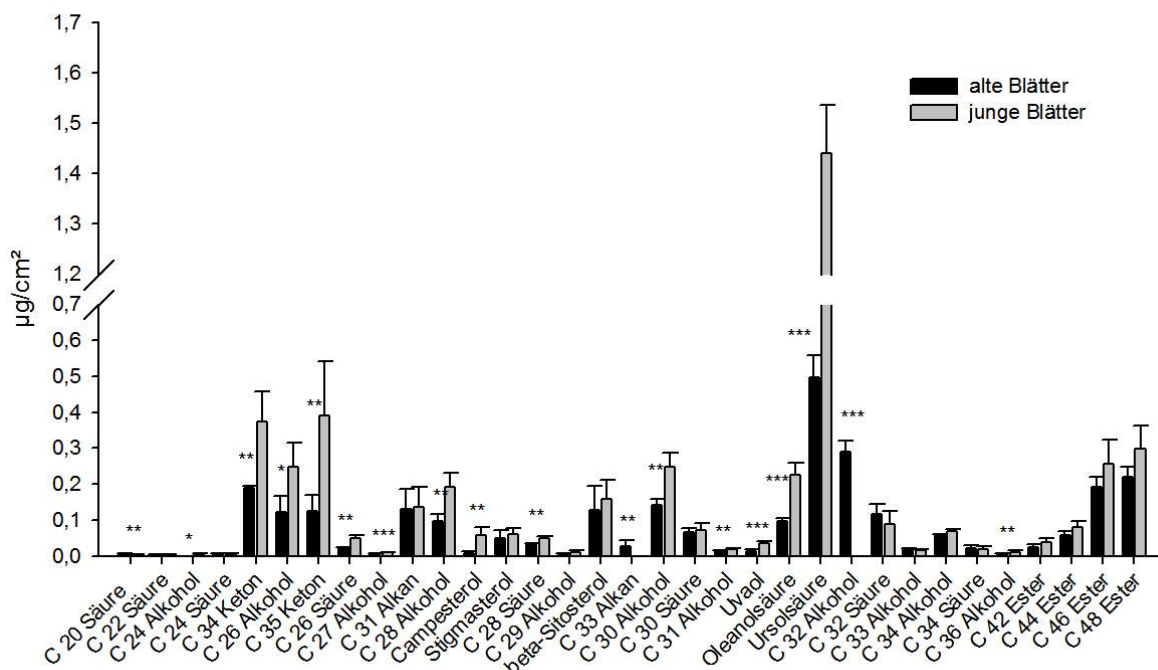


Abbildung 39: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Gesamtwachsanalyse von alten und jungen *Malus domestica* Blättern geordnet nach der Retentionszeit der Substanzen

Dargestellt sind die Einzelsubstanzen der Analyse. Die Grafik zeigt Mittelwerte samt Standardabweichungen, *** $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; * $p < 0,10$ =signifikante Änderungen zwischen alten und jungen Blättern.

Eine separate Betrachtung der Substanzklassen in alten und jungen Blättern und in Blattober- und Blattunterseite machte deutlich, dass die Substanzklassen nicht homogen verteilt waren. Bei alten *Malus domestica* Blättern (Abbildung 40 A) waren die Säuren in etwa gleichen Mengen auf der Blattober- und Unterseite zu finden. Die Menge der Alkohole ($1,22 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Alkane ($0,47 \pm 0,31 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und Ketone ($0,53 \pm 0,15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) waren tendenziell auf der Blattoberseite, die Triterpene ($0,04 \pm 0,004 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Sterole ($0,17 \pm 0,09 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und Ester ($0,66 \pm 0,88 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) eher auf der Blattunterseite erhöht. Eine analoge Verteilung der Substanzen war auch bei jungen *Malus domestica* Blättern zu beobachten (Abbildung 40 B). Die Alkohole, Alkane und Ketone waren vermehrt auf der Blattoberseite, die Triterpene, Sterole und Ester vermehrt auf der Blattunterseite zu finden.

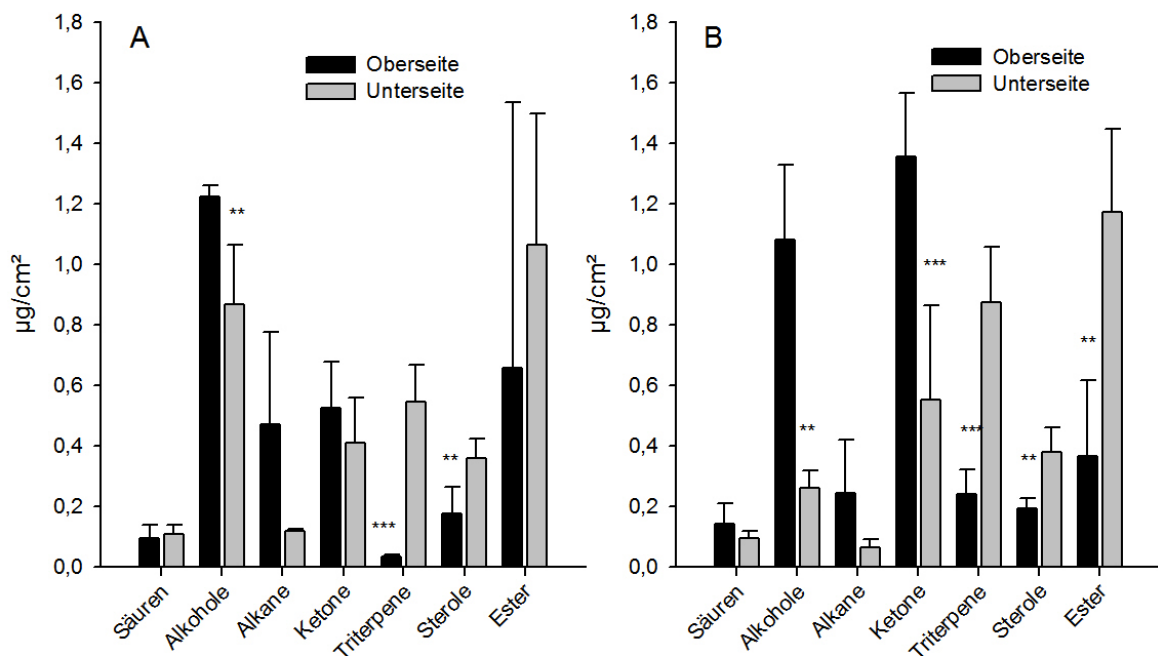


Abbildung 40: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalyse der Ober- und Unterseite alter (A) und junger (B) *Malus domestica* Blätter

Dargestellt sind die einzelnen Substanzklassen der Oberflächenwachse. Die Grafik zeigt Mittelwerte samt Standardabweichungen, *** $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; * $p < 0,10$ =signifikante Änderungen zwischen Ober- und Unterseiten der Blätter.

Bei alten und jungen *Malus domestica* Blättern reichte das Kettenlängenspektrum von kurzkettigen Monomeren (C_{20}) bis hin zu sehr langkettigen Substanzen (C_{48}). Bei alten Blättern waren Monomere der Kettenlänge C_{26} , C_{28} , C_{31} und C_{35} vermehrt auf der Blattoberseite zu finden. Längerkettige Monomere der Kettenlängen C_{42} , C_{44} , C_{46} , aber auch Triterpene und Sterole waren dagegen in höheren Mengen auf der Unterseite lokalisiert (Abbildung 41 A). Dieselbe Verteilung der Kettenlängen konnte bei jungen *Malus domestica* Blättern gefunden werden. Eher kurzkettige Monomere (C_{26} , C_{28} , C_{31} und C_{35}) waren auf der Blattoberseite und Langkettige (C_{42} , C_{44} , C_{46} und C_{48}) auf der Blattunterseite lokalisiert (Abbildung 41 B).

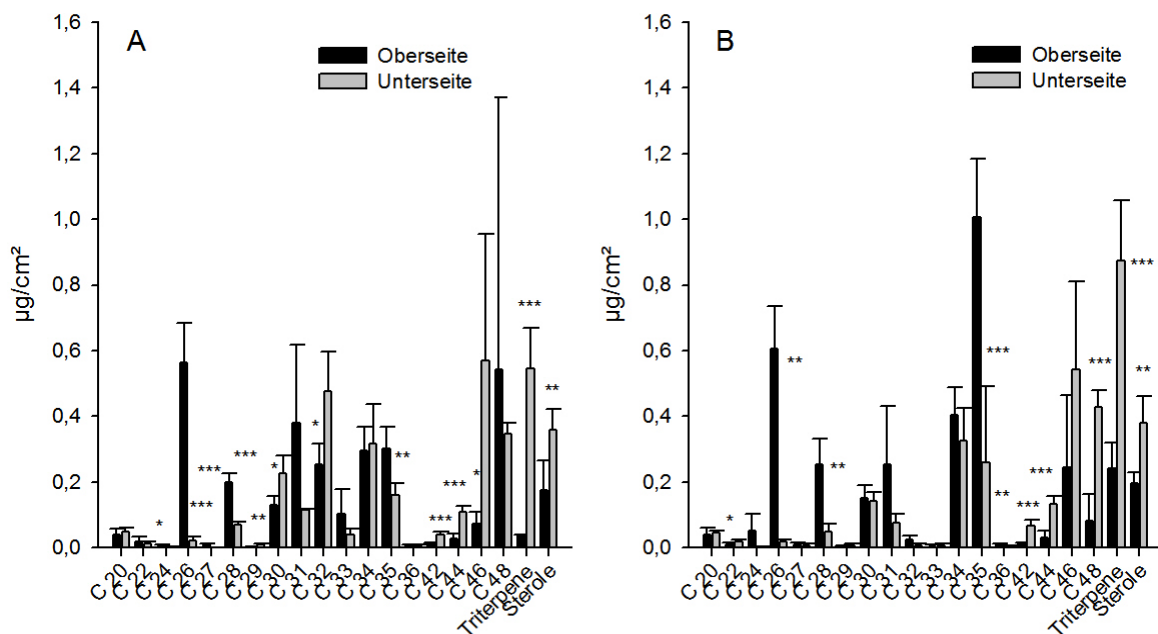


Abbildung 41: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalyse der Ober- und Unterseite alter (A) und junger (B) *Malus domestica* Blätter

Dargestellt ist das Kettenlängenspektrum der Oberflächenwache. Die Grafik zeigt die Mittelwerte samt Standardabweichungen, *** $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; * $p < 0,10$ =signifikante Änderungen zwischen Ober- und Unterseiten der Blätter.

3.1.3.4.1 Selektive Entfernung der Wachse von *Malus domestica*

Blattoberseiten mittels Kollodium

Die selektive Entfernung der Wachse erfolgte wie in 2.2.3 beschrieben. In der gaschromatographischen Analyse der Kollodiumstripps (n jeweils 3) konnten nicht alle Substanzen identifiziert werden, die in der parallelen Gesamtwachsextraktion enthalten waren. Zu den nicht gefundenen Substanzen gehörten bei alten *Malus domestica* Blättern Alkohole der Kettenlängen C₂₇, C₃₃ und C₃₄ und das Triterpen Uvaol. In den Kollodiumstripps nach Behandlung von jungen *Malus domestica* Blättern konnten weder Alkohole der Kettenlängen C₂₄, C₂₉, C₃₁, C₃₆, die C₃₄ Säure, das Sterol Campesterol, die Triterpene Uvaol und Hederagenin noch die Ester der Kettenlängen C₄₂ und C₄₄ identifiziert werden. Die Behandlung mit Kollodium, aber auch die Extraktion in organischem Lösungsmittel ergab für junge *Malus domestica* Blätter im Vergleich zu alten Blättern einen erhöhten Wachsgehalt. (Abbildung 42 B). Mit der ersten selektiven Behandlung der Oberfläche konnten bei alten Blättern $0,40 \pm 0,09 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und bei jungen Blättern $0,55 \pm 0,13 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Wachs von der Oberfläche entfernt werden. Die Menge stieg mit der zweiten Behandlung an und erreichte bei den jungen Blättern einen Wert von $0,82 \pm 0,23 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und bei alten Blättern einen Wert von $0,58 \pm 0,07 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

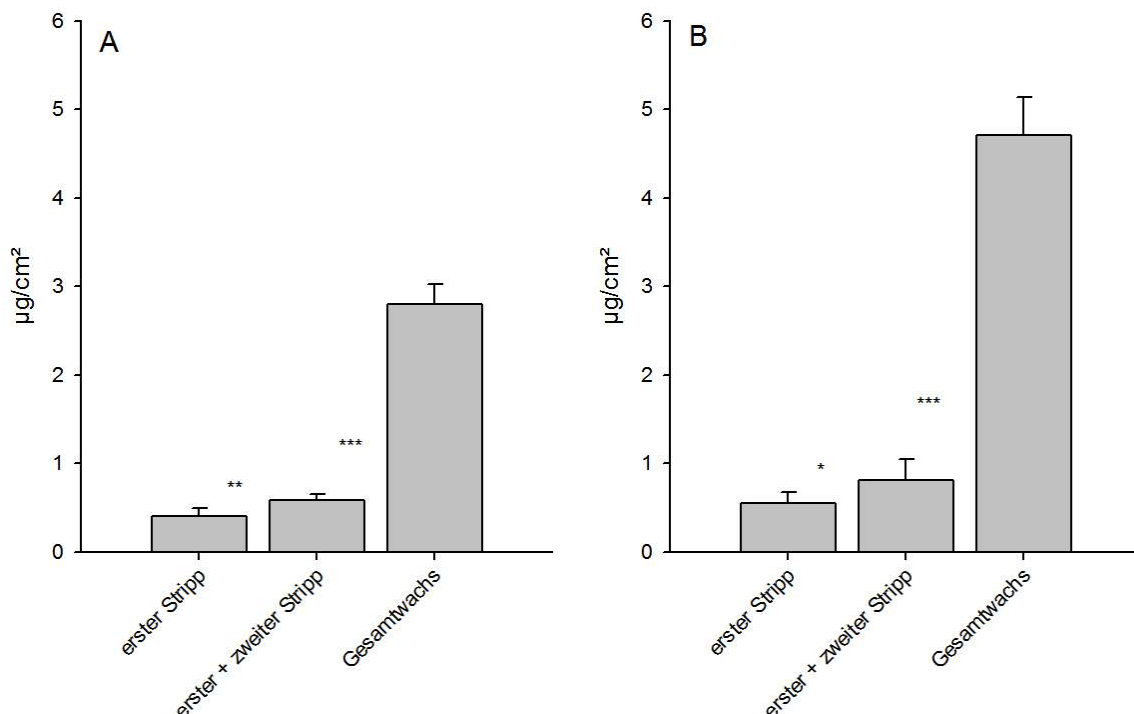


Abbildung 42: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalysen der abgehobenen Wachse von *Malus domestica* Blattoberseiten mit Kollodium

Dargestellt ist die aufsummierte Menge der abgehobenen Wachse von alten (A) und jungen (B) *M. domestica* Blättern. Die Grafik enthält die Mittelwerte aus drei parallelen Analysen samt Standardabweichungen, *** $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; * $p < 0,10$ =signifikante Änderungen zwischen den Behandlungen bzw. zum Gesamtwachs.

Durch die selektive Behandlung der Blattoberseite alter *Malus domestica* Blätter mit Kollodium wurden vermehrt polare Substanzen wie Alkohole ($0,19 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und Säuren ($0,07 \pm 0,009 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) von der Oberfläche entfernt. Eine erhöhte Menge an Estern, Ketonen, Sterolen und Triterpenen konnte erst durch eine Gesamtwachsextraktion erhalten werden (Abbildung 43 A). Bei jungen Blättern wurden vor allem Ketone ($0,21 \pm 0,11 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Alkohole ($0,13 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und auch Säuren ($0,10 \pm 0,07 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) von der Oberfläche entfernt. Langkettige Substanzen wie Ester ($0,02 \pm 0,003 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und auch polyzyklische Substanzen wie Triterpene ($0,01 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und Sterole ($0,01 \pm 0,005 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) konnten nur in Spuren abgehoben und erst durch eine Extraktion in organischem Lösungsmittel in höheren Mengen herausgelöst werden (Abbildung 43 B).

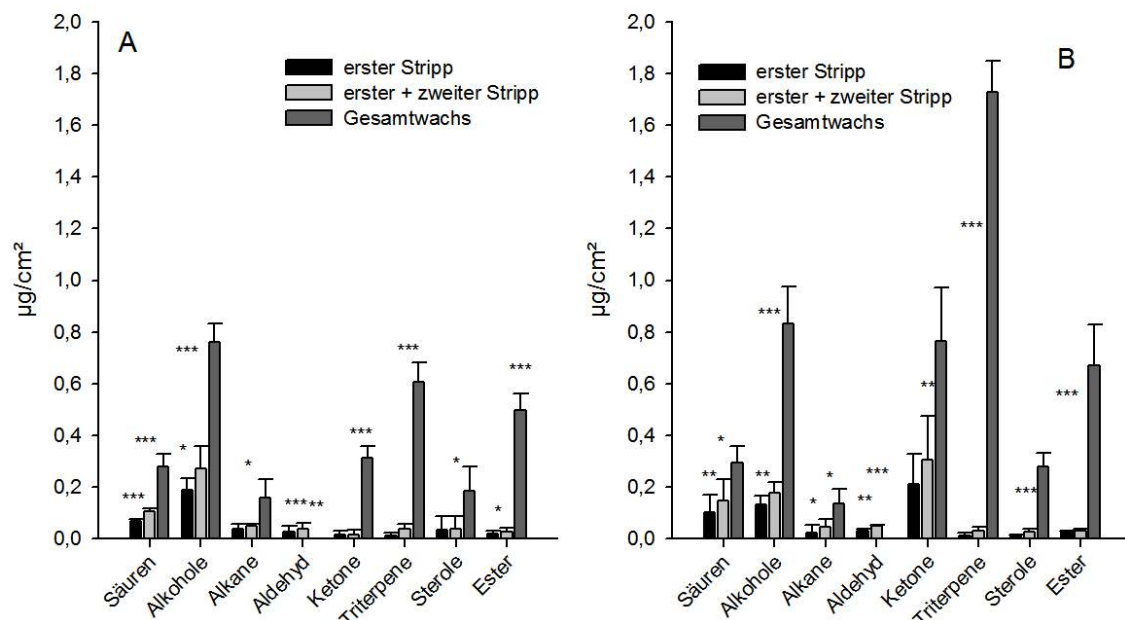
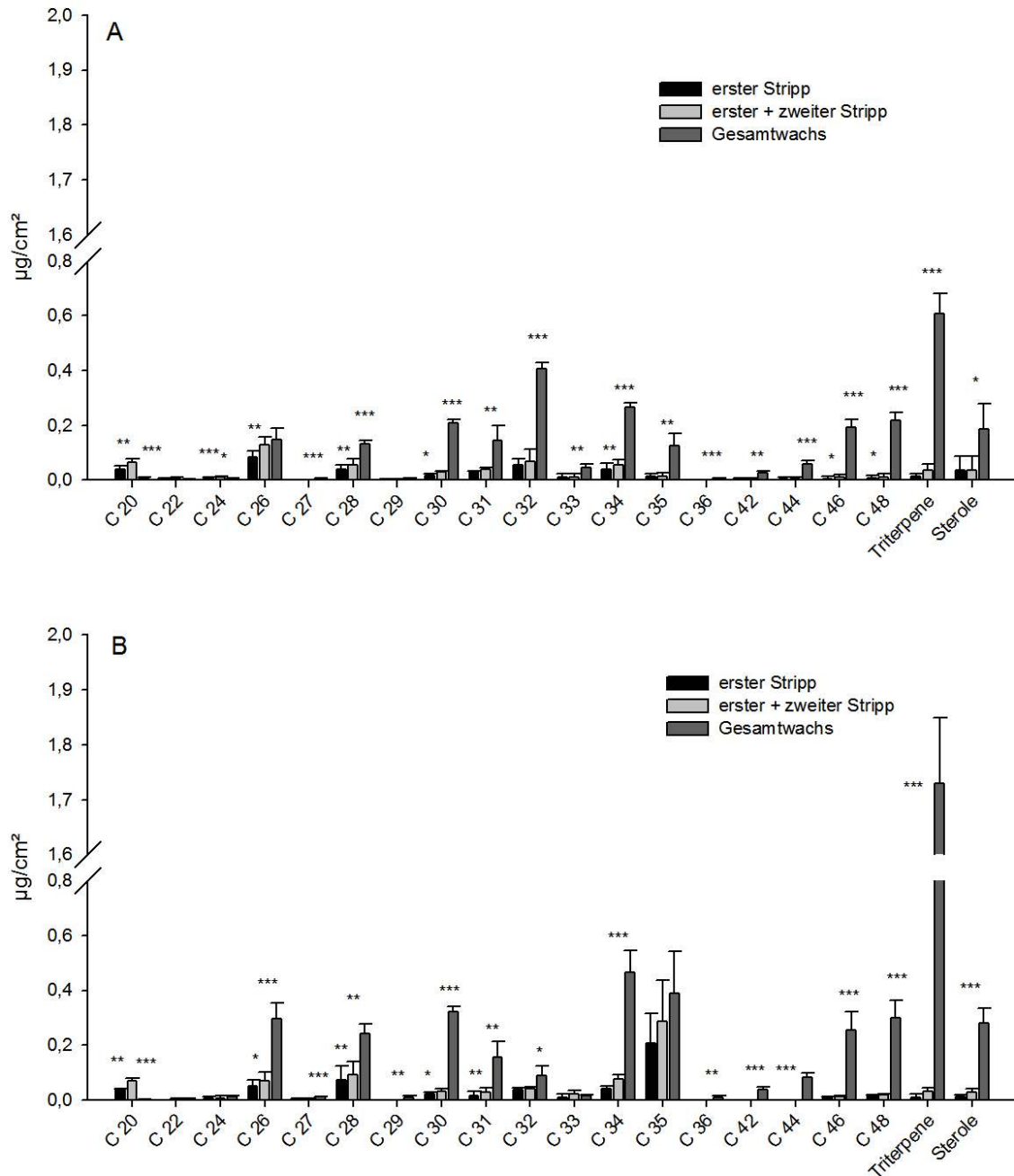


Abbildung 43: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalysen der abgehobenen Wachse von *Malus domestica* Blattoberseiten mit Kollodium

Dargestellt ist die aufsummierte Menge der abgehobenen Wachse von alten (A) und jungen (B) *M. domestica* Blättern, aufgeteilt nach Substanzklassen. Die Grafik zeigt die Mittelwerte aus drei parallelen Analysen samt Standardabweichungen, *** $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; * $p < 0,10$ =signifikante Änderungen zwischen den Behandlungen bzw. zum Gesamtwachs.

Bei alten *Malus domestica* Blättern konnten durch die selektive Behandlung mit Kollodium C_{20} - ($0,04 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), C_{26} - ($0,08 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) C_{32} - ($0,05 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und C_{34} - ($0,04 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) Monomere von der Oberfläche entfernt werden (Abbildung 44 A). Längerkettige Monomere, wie auch Sterole und Triterpene konnten in hohen Mengen erst durch eine Gesamtwachsextraktion erhalten werden.

Bei jungen *Malus domestica* Blättern konnten mit der ersten Behandlung vor allem Substanzen der Kettenlängen C₂₆ (0,05 ± 0,02 µg/cm²), C₂₈ (0,07 ± 0,05 µg/cm²) und C₃₅ (0,21 ± 0,11 µg/cm²) entfernt werden (Abbildung 44 B). Langkettige Substanzen, Sterole und Triterpene wurden dagegen erst durch eine Gesamtwachsextraktion entfernt.



3.1.4 Benetzungseigenschaften

Die Blattober- und Blattunterseiten der Arten wurden auf ihre Benetzungseigenschaften hin untersucht. Dies wurde zum einen durch die Applikation eines Wassertropfens (10 μ l, Abbildung 45) und reiner visueller Betrachtung des Spreitungsverhaltens zum anderen durch Kontaktwinkelmessungen evaluiert.

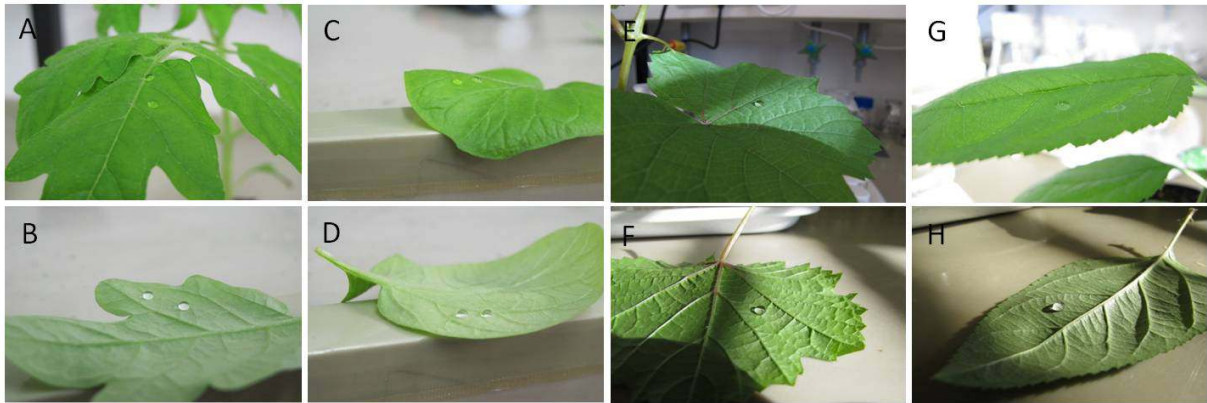


Abbildung 45: Visuelle Untersuchung der Benetzungseigenschaften der vier untersuchten Arten

A+B: *Solanum lycopersicum*: Spreitungsverhalten eines 10 μ l Wassertropfens auf der Blattober- und Blattunterseite. Die Blattunterseite (A) ist schlechter benetzbar als die Blattoberseite (B). C+D: *Solanum tuberosum*: Spreitungsverhalten eines 10 μ l Wassertropfens auf der Blattober- und Blattunterseite. Die Oberseite (C) weist eine bessere Benetzung auf als die Unterseite (D). E+F: Spreitungsverhalten eines 10 μ l Wassertropfens auf der *Vitis vinifera* Blattober- und Blattunterseite. Kein Unterschied in der Benetzung erkennbar. G+H: *Malus domestica*: Spreitungsverhalten eines 10 μ l Wassertropfens auf der Blattober- und Blattunterseite. Die Blattoberseite (G) weist eine bessere Benetzung auf als die Blattunterseite (H).

Die Applikation eines Wassertropfens auf die Blattober- und Unterseite der Arten machte deutlich, dass die Blattunterseiten von *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum* und *Malus domestica* verglichen zur Blattoberseite schlechter benetzbar waren (Abbildung 45). Der Wassertropfen auf den jeweiligen Blattunterseiten wies im Vergleich zu denen der Blattoberseite eine rundere, kugelförmigere Form auf. Bei *Vitis vinifera* (Abbildung 45 E und F) konnte als einzige Art kein visueller Unterschied in den Benetzungseigenschaften der Ober- und Unterseite erkannt werden. Um diese Ergebnisse quantitativ erfassen zu können, wurden zusätzlich Kontaktwinkelmessungen durchgeführt. Es wurde zwischen alten und jungen Blättern, sowie Ober- und Unterseite unterschieden. Bei den Messungen wurde darauf geachtet, dass die Applikation auf einer ebenen Oberfläche erfolgte. Stellen der Blattnervatur wurden ausgespart. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte aus mindestens fünf parallelen Messungen samt Standardabweichungen dargestellt.

3.1.4.1 Kontaktwinkelmessungen

Die Kontaktwinkel wurden auf der Blattober- und Unterseite von jungen und alten *Solanum tuberosum* Blättern gemessen. Tendenziell waren bei beiden Altersstufen die gemittelten Werte der Blattunterseiten höher als die der Blattoberseiten. Die Blattunterseiten waren somit schlechter benetzbar als die Blattoberseiten (Tabelle 9).

Tabelle 9: Kontaktwinkelmessungen an *Solanum tuberosum*

Dargestellt sind die Mittelwerte samt Standardabweichungen der Kontaktwinkelmessungen an der Blattober- und Unterseite von *S. tuberosum* Blättern unterschiedlichen Alters.

	<i>S. tuberosum</i> altes Blatt	<i>S. tuberosum</i> junges Blatt
	MW ± Stabw [°]	
Blattoberseite	52,9 ± 10,3	53,7 ± 9,3
Blattunterseite	67,8 ± 14,2	81,1 ± 23,3

Wie bei *Solanum tuberosum*, wiesen auch die Blattunterseiten der Tomatenblätter eine schlechtere Benetzbarkeit im Vergleich zur Blattoberseite auf. Die gemittelten Kontaktwinkel waren auf der Blattunterseite größer als auf der dazugehörigen Oberseite. Tendenziell wiesen junge Blätter im Vergleich zu alten Blättern eine schlechtere Benetzbarkeit auf. (Tabelle 10).

Tabelle 10: Kontaktwinkelmessungen an *Solanum lycopersicum*

Dargestellt sind die Mittelwerte samt Standardabweichungen der Kontaktwinkelmessungen an der Blattober- und Unterseite von *S. lycopersicum* Blättern unterschiedlichen Alters.

	<i>S. lycopersicum</i> altes Blatt	<i>S. lycopersicum</i> junges Blatt
	MW ± Stabw [°]	
Blattoberseite	100,1 ± 9,2	107,6 ± 4,9
Blattunterseite	109,2 ± 7,7	112,0 ± 13,5

Bei alten *Vitis vinifera* Blättern wiesen die Blattunterseiten einen im Mittel deutlich höheren Kontaktwinkel auf als die dazugehörigen Oberseiten. Bei jungen Blättern verhielt es sich genau andersrum. Eine Zunahme der Benetzbarkeit vom jungen zum alten Blatt konnte nur für die Blattoberseiten erkannt werden (Tabelle 11).

Tabelle 11: Kontaktwinkelmessungen an *Vitis vinifera*

Dargestellt sind die Mittelwerte samt Standardabweichungen der Kontaktwinkelmessungen an der Blattober- und Unterseite von *V. vinifera* Blättern unterschiedlichen Alters.

	<i>V. vinifera</i> altes Blatt	<i>V. vinifera</i> junges Blatt
	MW ± Stabw [°]	
Blattoberseite	69,6 ± 11,5	108,7 ± 8,3
Blattunterseite	103,5 ± 6,1	91,1 ± 13,5

Die an *Malus domestica* durchgeführten Kontaktwinkelmessungen konnten zeigen, dass die Blattunterseiten von alten und jungen Blättern im Vergleich zu den Blattoberseiten schlechter benetzbar waren (Tabelle 12). Eine altersabhängige Veränderung des Kontaktwinkels konnte nicht erkannt werden.

Tabelle 12: Kontaktwinkelmessungen an *Malus domestica*

Dargestellt sind die Mittelwerte samt Standardabweichungen der Kontaktwinkelmessungen an der Blattober- und Unterseite von *M. domestica* Blättern unterschiedlichen Alters.

	<i>M. domestica</i> altes Blatt	<i>M. domestica</i> junges Blatt
	MW ± Stabw [°]	
Blattoberseite	97,2 ± 12,2	96,8 ± 6,2
Blattunterseite	102,3 ± 12,8	104,3 ± 12,2

3.1.5 Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen

Wie in 2.9 beschrieben, wurde die Aufnahme eines Herbizids (Photosyntheseinhibitors) über die Kutikula indirekt mittels Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen untersucht. Es wurde diese nicht-invasive Methode gewählt, da sich von den *Solanum* Arten keine Kutikulamembranen isolieren ließen. Die Ergebnisse wurden sowohl innerartlich (altes und junges Blatt) als auch zwischen den Arten verglichen. Die Applikation des Herbizids auf die Blattoberfläche erfolgte nach einer zehnminütigen Messung der Anfangsfluoreszenz. Der Verlauf der Kurven wurde zuerst für jedes einzelne Blatt betrachtet und die Abnahme der Photosyntheseraten um 20 % (t 80 % (min)) bestimmt. Von mindestens drei Parallelen wurden Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet (n≥3).

3.1.5.1 Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen an *Solanum tuberosum*

Blättern

Vor der Applikation des Herbizids wurde die photochemische Arbeit über einen Zeitraum von zehn Minuten gemessen. Alte *Solanum tuberosum* Blätter wiesen im Mittel einen geringeren Anfangsyield auf als Junge (junge Blätter: $Y(II)=0,71$, alte Blätter: $Y(II)=0,77$). Die Blätter verschiedenen Alters wurden nach der zehnmütigen Messung des Anfangsyields mit 40 μ l einer 1 %-igen wässrigen Bentazonlösung behandelt. Die Quantenausbeute ($Y(II)$) sank sowohl bei alten (Abbildung 46 A) als auch bei jungen Blättern (Abbildung 46 B) nach der Applikation des Herbizids rapide ab. Die Kurven wiesen einen steilen Kurvenverlauf auf.

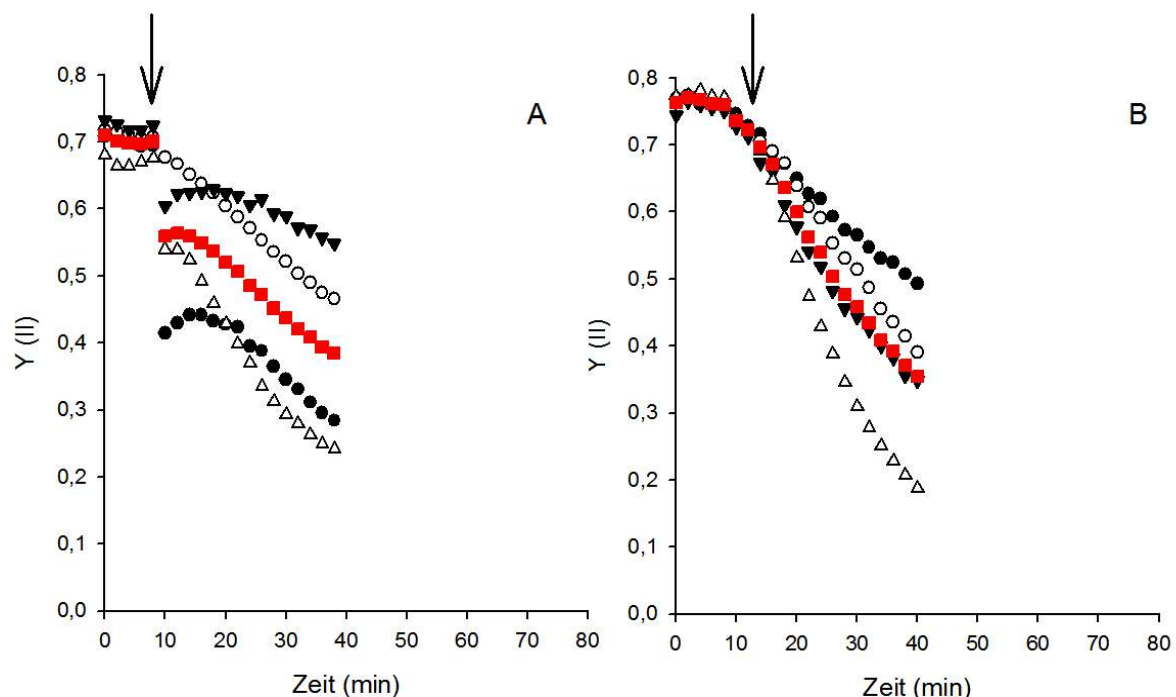


Abbildung 46: Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen an *Solanum tuberosum*

Dargestellt sind die Einzelkurven und die gemittelte Kurve (rot) von alten (A) und jungen (B) *S. tuberosum* Blättern vor und nach Behandlung mit dem Herbizid Bentazon. Pfeil: Zeitpunkt der Behandlung.

Ein Vergleich der Zeitintervalle nach denen eine 20 %-ige Reduktion der Photosyntheserate detektiert wurde machte deutlich, dass die Aufnahme des Herbizids bei alten und jungen Blättern etwa gleich schnell erfolgte (altes Blatt: $16,97 \pm 8,46$ min, junges Blatt: $20,5 \pm 3,11$ min).

3.1.5.2 Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen an *Solanum lycopersicum*

Blättern

Die Quantenausbeute (Yield Y(II)) wurde vor der Herbizidbehandlung über einen zehnmütigen Zeitraum alle zwei Minuten gemessen. Nach der Behandlung mit Bentazon wurde der Yield (Y(II)) erneut alle 2 min gemessen, bis eine mindestens 20 %-ige Abnahme in der Photosyntheserate zu erkennen war.

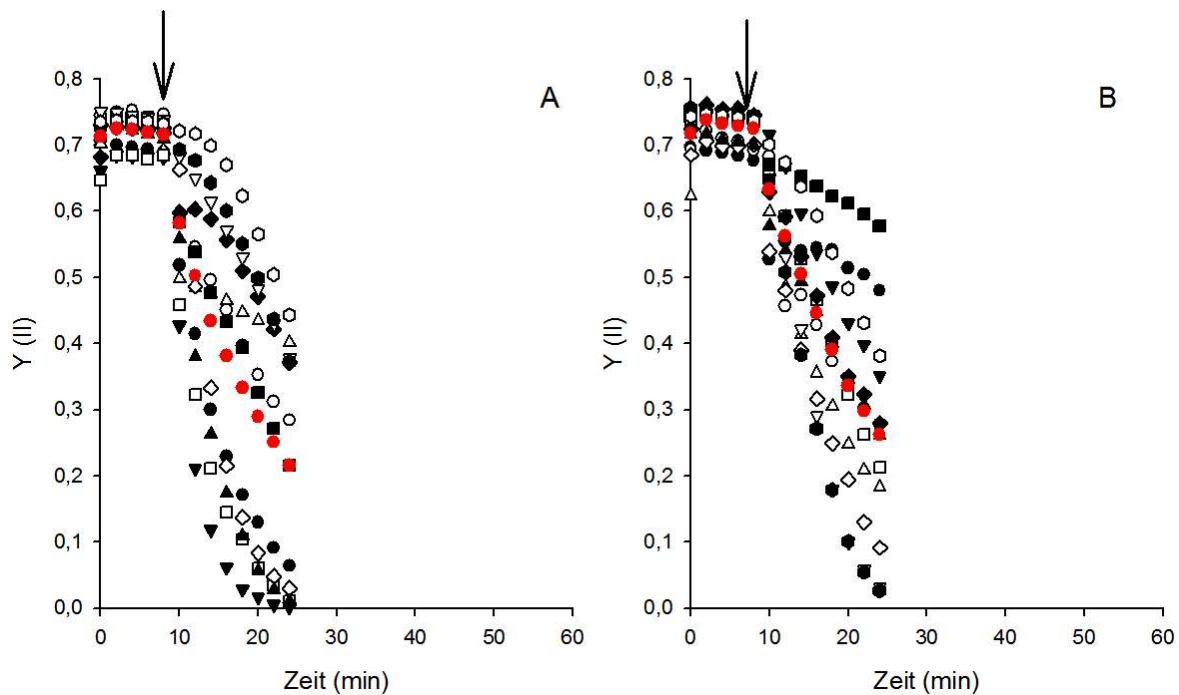


Abbildung 47: Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen an *Solanum lycopersicum*

Dargestellt sind die Einzelkurven und die gemittelte Kurve (rot) von alten (A) und jungen (B) *S. lycopersicum* Blättern vor und nach Behandlung mit dem Herbizid Bentazon. Pfeil: Zeitpunkt der Behandlung.

Junge und alte *Solanum lycopersicum* Blätter wiesen im Mittel einen Anfangsyield von ca. 0,7 auf. Die Photosyntheserate war über den zehnmütigen Zeitraum vor der Applikation des Photosyntheseinhibitors Bentazon konstant und veränderte sich nur minimal. Nach der Applikation des Herbizids auf die selbe Stelle der jeweils alten (Abbildung 47 A) und jungen (Abbildung 47 B) Blätter konnte ein rapider Abfall der photochemischen Arbeit erkannt werden. Die Photosyntheserate sank nach 20 bis 30 min gegen Null. Zwischen alten und jungen Blättern war kein signifikanter Unterschied in der Schnelligkeit der Abnahme der Photosyntheserate nach Applikation des Herbizids zu erkennen ($t_{80\%}$ alte Blätter: $12,09 \pm 3,76$ min, $t_{80\%}$ junge Blätter: $12,52 \pm 3,55$ min).

3.1.5.3 Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen an *Vitis vinifera* Blättern

Die Blätter unterschiedlichen Alters wiesen im Mittel einen Anfangsyield von ca. 0,75 auf. Nach Behandlung der Blätter mit Bentazon (Abbildung 48) sank der vorher konstante Yield und damit auch die Photosyntheserate ab. Aufgrund der hohen Variabilität der gemessenen Blätter (A), konnte kein signifikanter Unterschied in der Aufnahmerate zwischen jungen und alten Blättern erkannt werden. Tendenziell sank die Photosynthese um 20 % schneller bei jungen Blättern ($t_{80\%}$: $28,67 \pm 7,1$ min) als bei Alten ($t_{80\%}$: $63,34 \pm 37,53$ min).

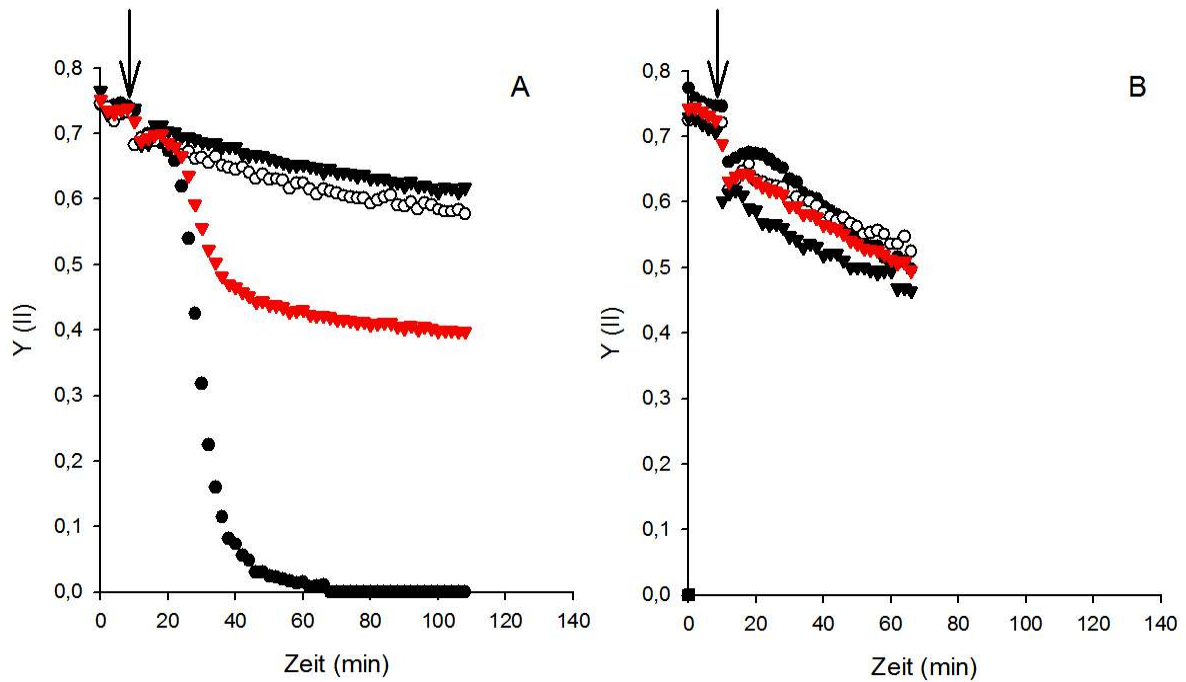


Abbildung 48: Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen an *Vitis vinifera*

Dargestellt sind die Einzelkurven und die gemittelte Kurve (rot) von alten (A) und jungen (B) *V. vinifera* Blättern vor und nach Behandlung mit dem Herbizid Bentazon. Pfeil: Zeitpunkt der Behandlung.

3.1.5.4 Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen an *Malus domestica* Blättern

Junge *Malus domestica* Blätter wiesen im Mittel einen geringeren Anfangswert auf als alte Blätter (junge Blätter: 0,71, alte Blätter: 0,75). Nach Behandlung derselben Stelle mit 40 µl der Herbizidlösung sank die photochemische Arbeit (Abbildung 49). Bei jungen Blättern konnte nach der Applikation eine drastische Reduktion in der photochemischen Arbeit erkannt werden, der bei alten Blättern ausblieb. Das Absinken der Photosynthese um 20 % ausgehend vom Anfangswert dauerte bei alten Blättern im Schnitt $37,57 \pm 14,93$ min und bei jungen Blättern $21,86 \pm 12,53$ min.

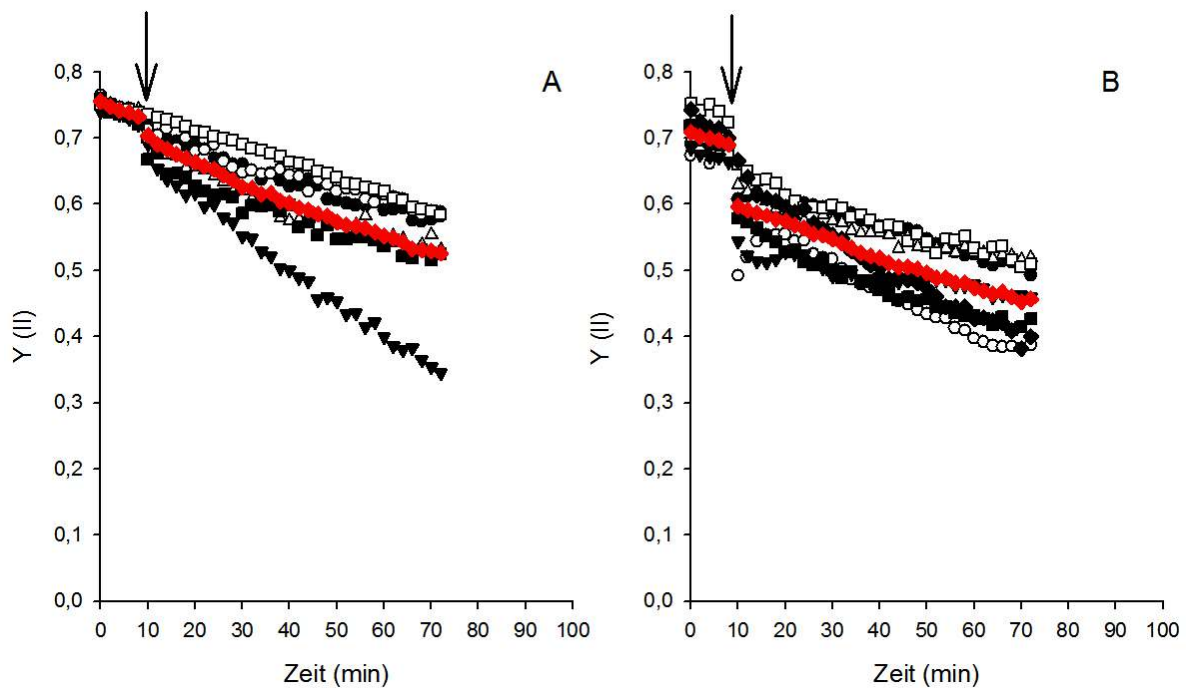


Abbildung 49: Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen an *Malus domestica*

Dargestellt sind die Einzelkurven und die gemittelte Kurve (rot) von alten (A) und jungen (B) *M. domestica* Blättern vor und nach Behandlung mit dem Herbizid Bentazon. Pfeil: Zeitpunkt der Behandlung.

3.2 Die Kutikula als Transpirationsbarriere

Durch Rasterelektronenmikroskopie, chemisch analytische Untersuchungen und Transpirationsmessungen sollte der Beitrag der epikutikulären Wachse zur Bildung der gesamten kutikulären Transportbarriere bestimmt werden. In diesen Untersuchungen wurden drei Ansätze (Kollodium, Celluloseacetat und Gummi arabicum) zur selektiven Entfernung der Oberflächenwachse (epikutikuläre Wachse) verwendet und miteinander verglichen. Diesen Ergebnissen wurden Methoden der Gesamtwachsentfernung gegenübergestellt, die keine Diskriminierung zwischen den unterschiedlichen Wachsfraktionen erlauben (Totalextraktion in organischem Lösungsmittel). Dieser Vergleich ist wichtig, um eine Antwort auf die Frage zu erhalten, welche Wachsfraktion (intra- oder epikutikulär) welchen Beitrag zur Etablierung der Transpirationsbarriere leistet. Neben der chemischen Analyse der selektiv entfernten Wachse wurden auch Transpirationsmessungen durchgeführt. Dabei wurde zwischen den Effekten der selektiven Entfernung der Oberflächenwachse, der Applikation von Lösungsmitteln und der Totalextraktion der Wachse auf die Transpiration unterschieden. Unabhängige rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen sollten die selektive Wachsentfernung bestätigen. In den experimentellen Ansätzen wurden auch isolierte Kutikulamembranen mit intakten Blattscheiben verglichen. Die alleinige Verwendung von Blattscheiben war bei einigen Arten nötig, da sich keine Kutikulamembranen isolieren ließen. Bereits durchgeführte Voruntersuchungen haben zeigen können, dass die Transportbarrieren isolierter Kutikulamembranen mit denen intakter Blattscheiben gut korrelieren (Schreiber *et al.*, 2001, Kirsch *et al.*, 1997).

3.2.1 Analytische Untersuchungen

Durch eine fünfmalige Behandlung der Oberfläche von *Monstera deliciosa* Blattscheiben mit Kollodium wurden die Oberflächenwachse selektiv entfernt und die Ergebnisse einer parallelen Gesamtwachsanalyse gegenübergestellt. Neben der Verwendung von Kollodium wurden des weiteren Gummi arabicum und Celluloseacetat verwendet, um selektiv die Oberflächenwachse von *Prunus laurocerasus* Blattscheiben und Kutikulamembranen zu entfernen. Bei den Ansätzen sollte untersucht werden, wie oft die Oberflächen behandelt werden müssen, um die epikutikulären Wachse vollständig zu entfernen. Des Weiteren wurde untersucht, ob eine Aufsummierung der selektiv entfernten Wachse samt Restwachsmenge der Gesamtwachsmenge entspricht. Diese Untersuchungen sind neben der Rasterelektronenmikroskopie und den Transpirationsmessungen essentiell um eine Antwort auf die Frage zu erhalten inwieweit die epikutikulären Wachse zur kutikulären Transpirationsbarriere beitragen. Die Wachsmengen nach selektiver Entfernung wurden für jede Parallele einzeln aufsummiert und als Mittelwert samt Standardabweichung grafisch dargestellt. Die prozentualen Anteile wurden nicht auf die parallel bestimmte

Gesamtwachsmenge intakter Kutikulamembranen bezogen, sondern auf die Summe des Restwachses samt den fünf Behandlungen.

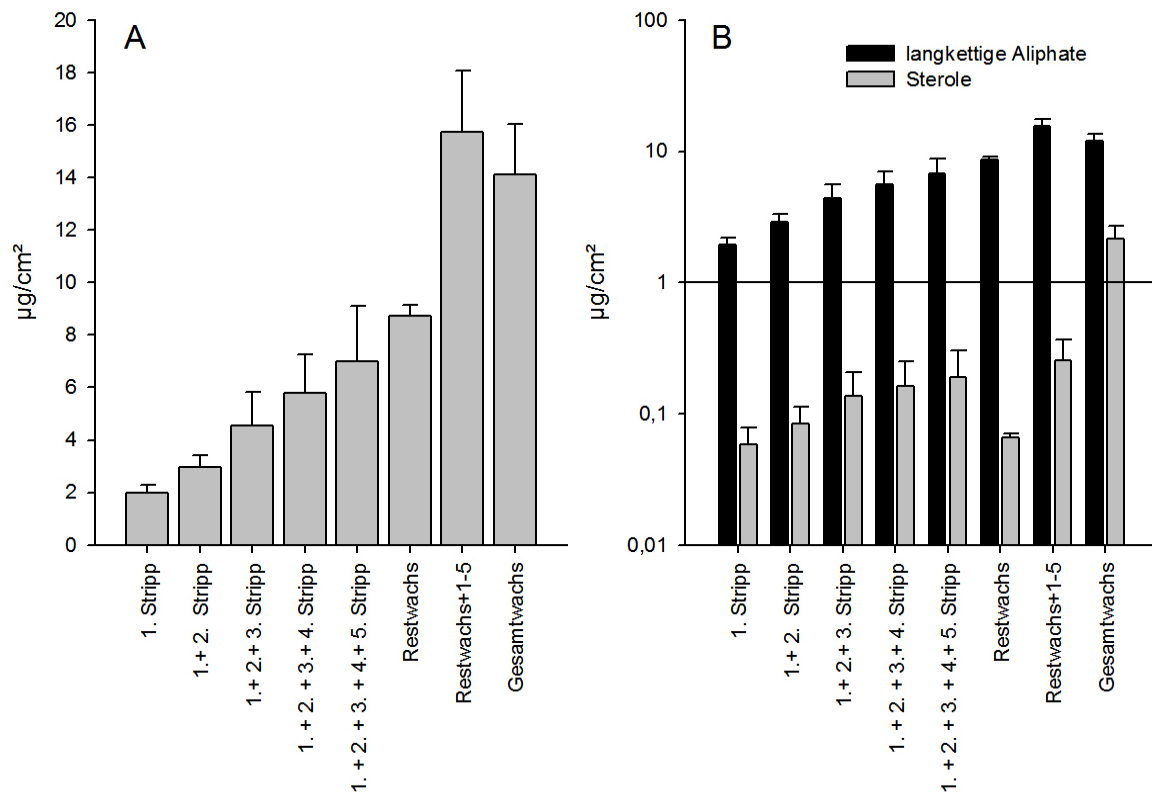
3.2.1.1 Abheben der epikutikulären Wachse von *Monstera deliciosa*

Blattscheiben mit Kollodium

Bei der Gesamtwachsextraktion dreier Kutikulamembranen von *M. deliciosa* konnte ein Gesamtwachsgehalt von $14,12 \pm 1,90 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, bestehend aus insgesamt 20 Einzelsubstanzen identifiziert werden. Das Wachs bestand aus langkettigen Aliphaten der Klassen der Säuren, Alkohole, Alkane und Aldehyde. Neben diesen Verbindungen konnte ferner Stigmasterol identifiziert werden. Den größten Anteil am Wachs machten Alkohole ($8,43 \pm 1,40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), gefolgt von dem Sterol Stigmasterol ($2,16 \pm 0,55 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) aus. Alkane machten mit $1,79 \pm 0,73 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ in etwa 13 %, Aldehyde mit $1,1 \pm 0,19 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 8 % und Säuren mit $0,66 \pm 0,07 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 5 % des Gesamtwachses aus. Für die selektive Entfernung der Wachse wurden intakte Blattscheiben ($n=3$) verwendet. Ganz frisch isolierte Kutikulamembranen ließen sich nicht stripfen, da sich das Kollodium nicht gut von der Oberfläche löste.

Eine Betrachtung der Wachsmenge, die nach jedem Auftragen von Kollodium entfernt wurde zeigt, dass mit der ersten Behandlung die größte Menge an Oberflächenwachsen entfernt werden konnte (Abbildung 50 A). Dies waren $1,99 \pm 0,28 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, was 13 % des Gesamtwachses (Summe aus Restwachs + 1-5) entspricht. Die Menge der Wachse stieg von Behandlung zu Behandlung an und erreichte mit der Fünften, unter Einberechnung der ersten Vier, einen Wert von $7,01 \pm 2,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Dies entsprach einem relativen Anteil von 44 % des Gesamtwachses (Summe aus Restwachs + 1-5). Die Restwachsmenge nach der Extraktion der isolierten Kutikulamembranen in organischem Lösungsmittel betrug $8,71 \pm 0,42 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (56 % der Restwachsmenge plus Behandlung 1-5). Aufgrund der geringen Wachsmengen wurde bei der Unterscheidung in langkettige Aliphate und Sterole übersichtshalber eine logarithmische Darstellung gewählt. Es wird deutlich, dass mit der ersten Behandlung vor allem langkettige Aliphate ($1,94 \pm 0,26 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) von der Oberfläche entfernt werden konnten (Abbildung 50 B). Die Menge des Sterols ist im Vergleich dazu verschwindend gering ($0,06 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Die Menge der beiden Substanzklassen stieg von Behandlung zu Behandlung an. Bei dem Sterol war besonders mit der dritten Behandlung ein klarer Anstieg im Gehalt zu verzeichnen. Mit der fünften Behandlung konnten insgesamt $6,82 \pm 1,99 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ an langkettigen Aliphaten und $0,19 \pm 0,11 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ des Sterols selektiv entfernt werden. Durch die Extraktion der Restkutikula konnten ferner $8,65 \pm 0,42 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ langkettige Aliphate und $0,07 \pm 0,004 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ des Sterols gefunden werden (Abbildung 50 B). Mit der ersten Behandlung konnten zu etwa gleichen Anteilen Alkohole ($0,66 \pm 0,40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Alkane ($0,61 \pm 0,15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und Säuren ($0,54 \pm 0,27 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)

von der Oberfläche entfernt werden (Abbildung 50 C). Der Gehalt der einzelnen Substanzen stieg bis zur fünften Behandlung an. Der Anteil der Säuren, Alkane und auch Aldehyde war in der Summe der fünf Behandlungen plus Restwachsmenge (Restwachs+1-5) höher als bei der parallelen Gesamtwachsanalyse. Der Anteil des Sterols und tendenziell auch der Alkohole war wiederum bei der Gesamtwachsanalyse höher. Bei der Oberflächenbehandlung von *Monstera deliciosa* Blattscheiben wurden von Beginn an sowohl kurzkettige (C₁₆, C₁₈), als auch langkettige (C₂₉-C₃₂) Monomere entfernt (Abbildung 50 D).



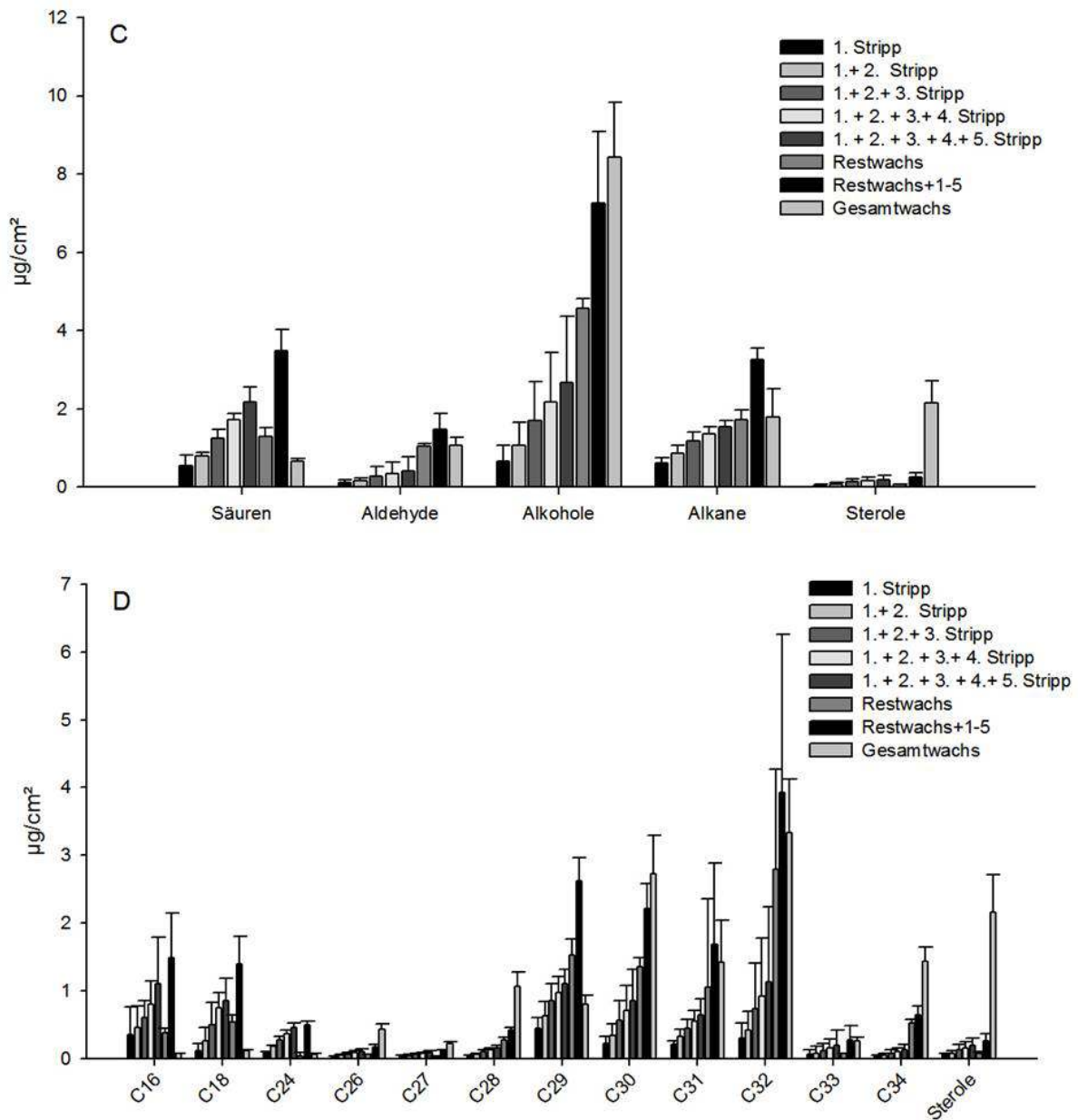


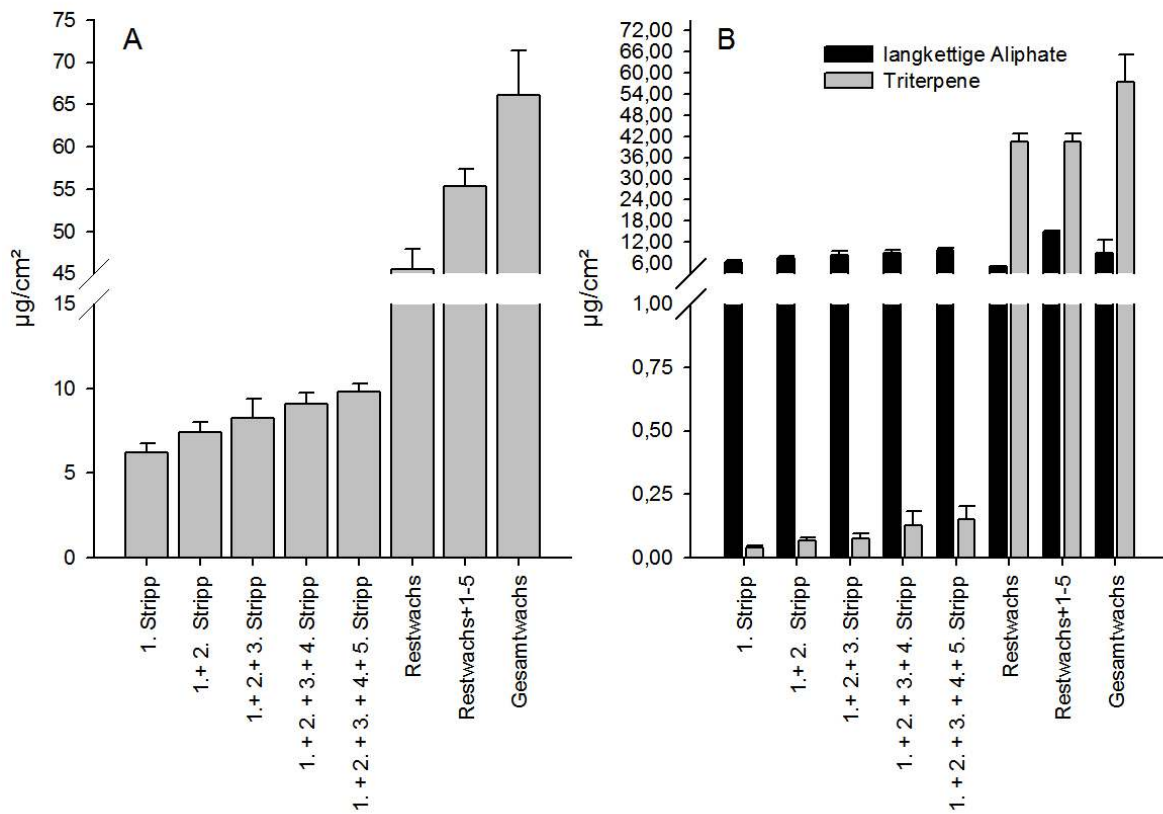
Abbildung 50: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalysen der abgehobenen Wachse von *Monstera deliciosa* Blattscheiben mit Kollodium

Dargestellt ist die aufsummierte Menge der abgehobenen Wachse (A), unterteilt in langkettige Aliphate und Triterpene (B), Substanzklassen (C) und Kettenlängen (D). Jede Analyse besteht aus drei Parallelen. Das arithmetische Mittel samt Standardabweichung ist dargestellt.

3.2.1.2 Abheben der epikutikulären Wachse von *Prunus laurocerasus* Blattscheiben mit Gummi arabicum

Drei Bereiche eines intakten *Prunus laurocerasus* Blattes wurden wie in 2.2.4 beschrieben fünf Mal in Folge mit Gummi arabicum behandelt. Die Rechtswachsmenge wurde bestimmt, indem die behandelte Blattfläche zunächst ausgeschnitten und in Enzymlösung verdaut wurde. Die so isolierten Kutikulamembranen wurden einer Totalextraktion in Chloroform unterzogen und deren Wachsgehalt gaschromatographisch ermittelt. Parallel dazu wurden zusätzliche Kutikulamembranen (n=5) isoliert und für eine Gesamtwachsanalyse verwendet. Bei der Gesamtwachsextraktion konnte ein Wachsgehalt von $66,10 \pm 5,32 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, bestehend aus 27 Einzelsubstanzen, identifiziert werden. Bei den Substanzen handelte es sich um Triterpene (Uvaol, Ursol- und Oleanolsäure) und langkettige Aliphate (Säuren, Alkane, Alkohole, Aldehyde und Ester). Die Triterpene machten mit 86,4 % den größten Anteil am Gesamtwachs aus ($57,30 \pm 7,99 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Die Menge an Wachsen die durch fünfmaliges Behandeln von der Oberfläche entfernt werden konnte, ist aufaddiert dargestellt (Abbildung 51 A) und macht deutlich, dass mit der ersten Oberflächenbehandlung die größte Menge an Wachsen entfernt wurde ($6,21 \pm 0,57 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Der Gehalt stieg von Behandlung zu Behandlung an und erreichte mit der fünften Behandlung einen Wert von $9,83 \pm 0,48 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Ein signifikant höherer Wachsgehalt konnte erst durch die Extraktion der Kutikula nach den Behandlungen erzielt werden (Restwachs: $45,56 \pm 2,35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Die Summe aus Restwachs und den fünf Strippis ergab eine Wachsmenge von $55,40 \pm 2,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, was dem Wert der parallelen Gesamtwachsanalyse sehr nahe kam. Bereits mit der ersten Behandlung konnten mehr langkettige Aliphate ($6,17 \pm 0,56 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) als Triterpene ($0,04 \pm 0,009 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) von der Oberfläche entfernt werden (Abbildung 51 B). Der Gehalt der beiden Substanzklassen stieg kontinuierlich an und näherte sich bei den langkettigen Aliphaten einem Plateau. In der Summe konnten mit fünf Behandlungen $9,68 \pm 0,52 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ langkettige Aliphate und $0,15 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Triterpene entfernt werden. Der größte Teil der Triterpene konnte erst durch die Restwachsextraktion ($40,43 \pm 2,27 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), bzw. der Gesamtwachsanalyse intakter Kutikulamembranen ($57,31 \pm 7,99 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) isoliert werden. Die Betrachtung der Substanzklassenverteilung (Abbildung 51 C) macht deutlich, dass mit der ersten Behandlung vor allem Alkane ($2,44 \pm 1,50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Säuren ($1,92 \pm 1,93 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Alkohole ($1,19 \pm 0,45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und zu kleinen Anteilen auch Aldehyde ($0,53 \pm 0,59 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) von der Oberfläche entfernt wurden.

Der Anteil dieser Substanzen ist bei der Summe der fünf Behandlungen und der Restwachsanalyse höher als bei der Totalextraktion. Triterpene, aber auch langkettige Moleküle wie Ester konnten nur in sehr geringen Mengen durch die selektive Entfernung erhalten werden. Sowohl kurzkettige Monomere wie die C₁₆ (0,39 ± 0,16 µg/cm²) und C₁₈ (0,37 ± 0,17 µg/cm²) Säure, aber auch längere Kettenlängen wie C₂₈, C₂₉ und C₃₀ wurden von Beginn an von der Oberfläche entfernt. Erst die Totalextraktion der Reskutikeln ermöglichte die Freisetzung der langkettigen Ester und Triterpene (Abbildung 51 D).



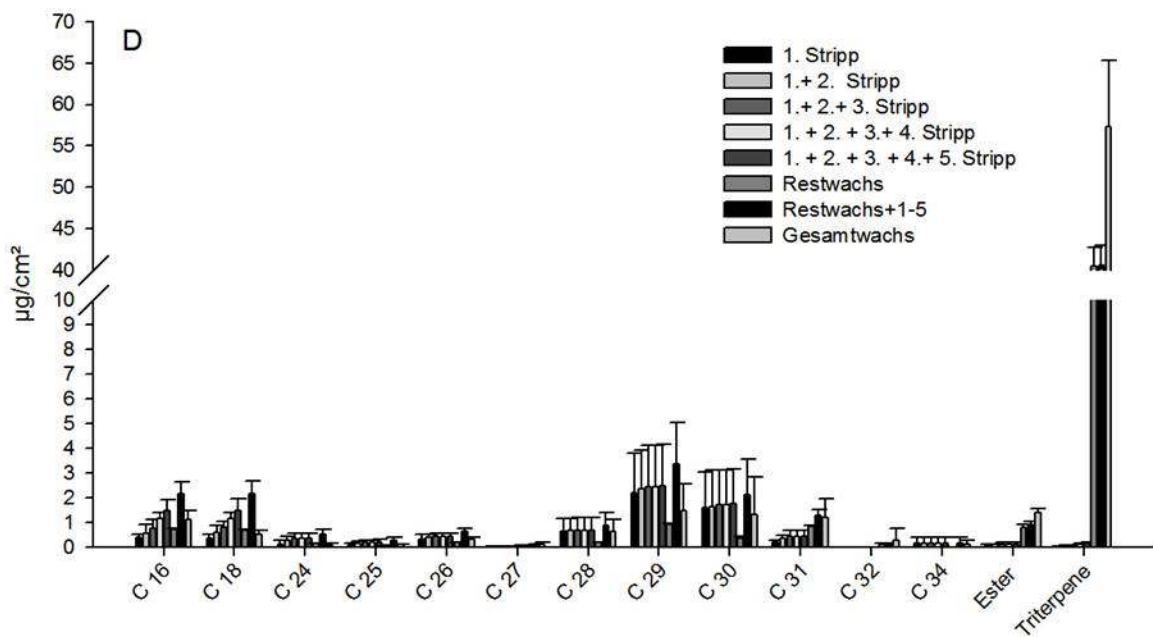
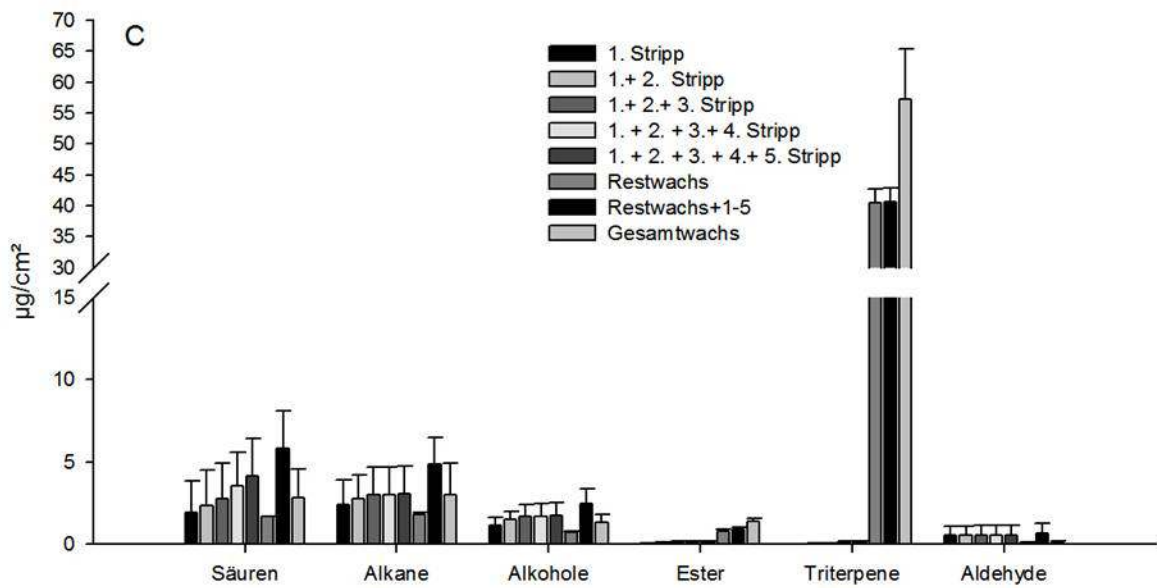


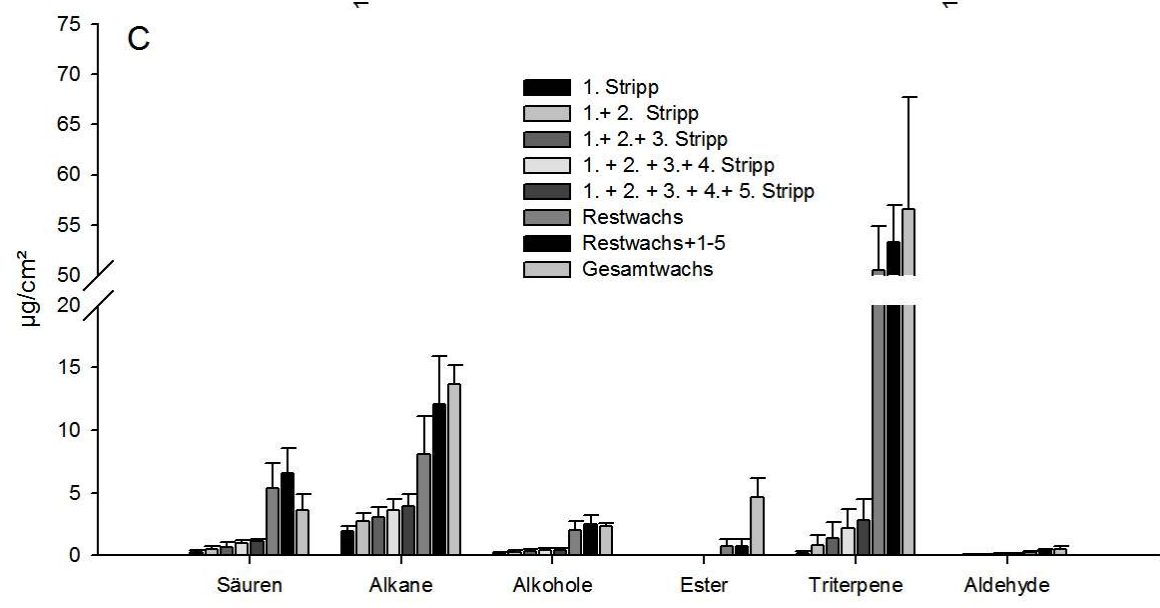
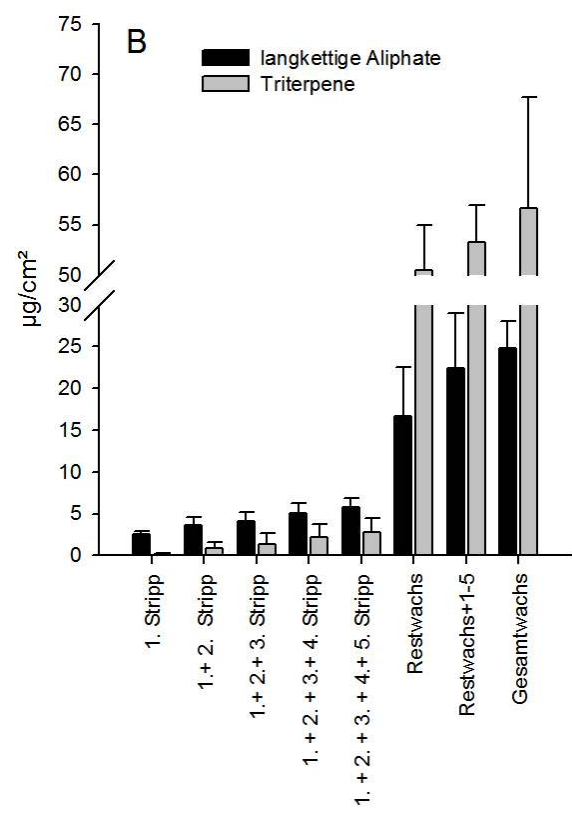
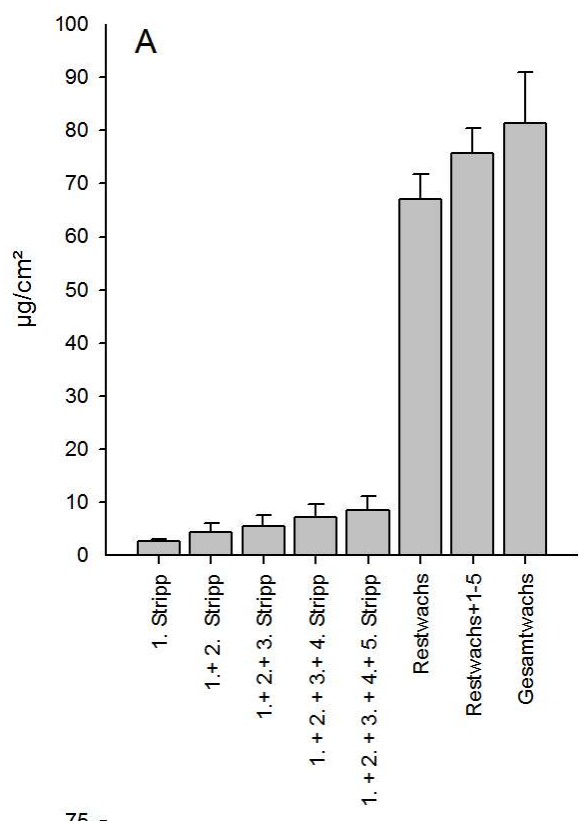
Abbildung 51: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalysen der abgehobenen Wache von *Prunus laurocerasus* Blattscheiben mit Gummi arabicum

Dargestellt ist die aufsummierte Wachs Menge aus den verschiedenen Behandlungen (A), unterteilt in langkettige Aliphate und Triterpene (B), Substanzklassen (C) und Kettenlängen (D). Jede Analyse besteht aus drei Parallelen. Dargestellt ist das arithmetische Mittel samt Standardabweichung.

3.2.1.3 Abheben der epikutikulären Wachse von *Prunus laurocerasus*

Kutikeln mit Celluloseacetat

Die Oberflächenwachse wurden durch fünfmaliges Auftragen von Celluloseacetat auf die physiologische Außenseite von *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen (n=5) entfernt (Kapitel: 2.2.5). Es wurden fünf Parallelen behandelt und Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet. Die in den Grafiken dargestellten Wachsmengen wurden aufsummiert (Abbildung 52). Bei einer parallelen Gesamtwachbestimmung intakter Kutikulamembranen konnte ein Wachsegehalt von $81,42 \pm 9,62 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, bestehend aus 30 Einzelsubstanzen identifiziert werden. Mit $56,50 \pm 11,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ machten die Triterpene den größten Teil des Wachses aus. Ferner konnten langkettige Aliphate der Klasse der Säuren, Alkane, Alkohole, Ester und Aldehyde identifiziert werden. Mit der ersten Celluloseacetatbehandlung konnte eine Wachsmenge von $2,70 \pm 0,43 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ von der Oberfläche entfernt werden. Der Gehalt nahm stetig zu und erreichte einen Wachsegehalt von $8,53 \pm 2,60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ mit der fünften Behandlung (Abbildung 52 A). Durch die Extraktion der Kutikeln nach Behandlung konnte der Hauptanteil an Wachsen ($67,12 \pm 4,58 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) isoliert werden. Die Summe aus Restwachs und den fünf Behandlungen ergab eine Wachsmenge von $75,65 \pm 4,73 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, was dem Wert der parallelen Gesamtwachsanalyse sehr nahe kommt (Abbildung 52 A). Eine Unterscheidung in langkettige Aliphate und Triterpene (Abbildung 52 B) macht deutlich, dass mit der ersten Behandlung vor allem langkettige Aliphate ($2,51 \pm 0,44 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und weniger Triterpene ($0,20 \pm 0,13 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) entfernt werden konnten. Besonders von der ersten zur zweiten Behandlung ist ein Anstieg in der Menge der Triterpene zu verzeichnen. Die Menge beider Substanzklassen nahm bis zur fünften Behandlung zu und erreichte einen Wert von $5,73 \pm 1,16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ für die langkettigen Aliphate und $2,80 \pm 1,70 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ für die Triterpene. Eine größere Menge beider Substanzklassen konnte durch die Extraktion der Restkutikeln erreicht werden (langkettige Aliphate: $16,66 \pm 5,89 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, Triterpene: $50,45 \pm 0,45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Innerhalb der langkettigen Aliphate konnten mit der ersten Behandlung vor allem Alkane ($1,98 \pm 0,39 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und Säuren ($0,29 \pm 0,15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) selektiv entfernt werden. Ester, Aldehyde und Triterpene waren nach den Behandlungen nur in Spuren zu finden und traten in höheren Mengen erst durch die Restwachsbestimmung auf (Abbildung 52 C). Substanzen der Kettenlänge C_{29} und C_{32} wurden in höheren Mengen mit der ersten Celluloseacetatbehandlung entfernt, Substanzen der Kettenlängen C_{25} , C_{26} , C_{27} , C_{32} , C_{34} dagegen kaum oder gar nicht (Abbildung 52 D). Eine Diskriminierung in der Kettenlängenverteilung liegt nicht vor.



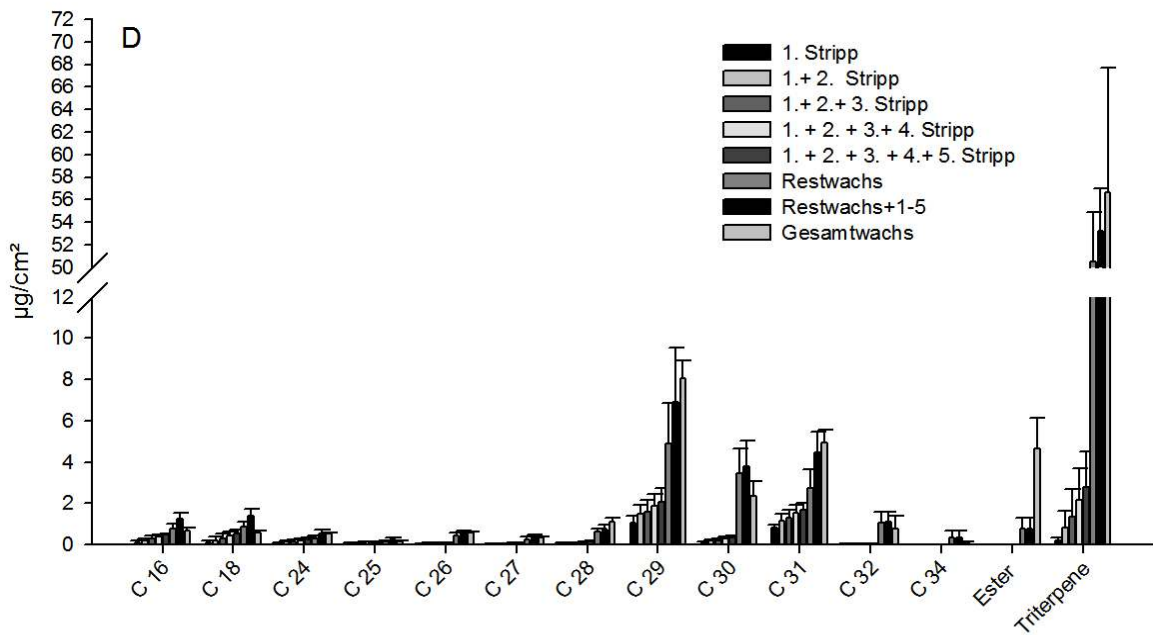


Abbildung 52: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalyse der abgehobenen Wachse von *Prunus laurocerasus* Kutikeln mit Celluloseacetat

Dargestellt ist die aufsummierte Menge der abgehobenen Wachse (A), unterteilt in langkettige Aliphate und Triterpene (B), Substanzklassen (C) und Kettenlängen (D). Jede Analyse besteht aus fünf Parallelen, aus denen Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet wurden.

3.2.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

3.2.2.1 Die selektive Entfernung der Oberflächenwachse mit drei verschiedenen Ansätzen

Die nach 2.7 vorbereiteten und mit Kollodium behandelten Proben wurden rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Alle Membranen wurden zweifach in Folge mit Kollodium behandelt. Ergebnisse aus Voruntersuchungen haben gezeigt, dass eine zweifache Behandlung der Oberfläche von *Prunus laurocerasus*, *Ficus elastica* und *Hedera helix* mit Kollodium ausreicht, um die Oberflächenwachse quantitativ zu entfernen. Nach Formel 3 ergab sich für die untersuchten Proben eine Goldschicht von 72 nm. Die rasterelektronenmikroskopischen Bilder dienten der visuellen Unterstützung der analytischen Daten und sind für die weitere Herangehensweise in den Transpirationmessungen von Bedeutung. Abbildung 53 zeigt die zweifach zur Hälfte mit Kollodium behandelten Oberflächen elf verschiedener Arten. Zwischen unbehandelter und behandelter Fläche bildete sich oft eine scharfe Grenze (Pfeil), die je nach Art und Wachsbelegung besonders stark (C, D, E), oder schwach ausgeprägt war (F, K). Bei *Philodendron spec.* (G) Blattscheiben reichte eine zweifache Behandlung der Oberfläche mit Kollodium nicht aus um die Oberflächenwachse vollständig zu entfernen. Die Grenze zwischen behandelter und unbehandelter Fläche verlief nicht scharf, Restwachse befanden sich weiterhin auf der mit Kollodium behandelten Oberfläche. Neben der Möglichkeit, zwischen behandelter und unbehandelter Oberfläche unterscheiden zu können, zeigten die Aufnahmen eine Vielfalt an unterschiedlichen Wachsformationen. Bei *Clusia spec.* (C) und *Schefflera arboricola* (I) Blattscheiben konnten schuppenartige Wachsplatten erkannt werden. Bei *Hedera helix* (E) und *Prunus laurocerasus* (H) Kutikulamembranen ähnelten die Oberflächenwachse eher einem Wachsfilm, Wachskristalle konnten bei diesen Arten nicht gefunden werden.

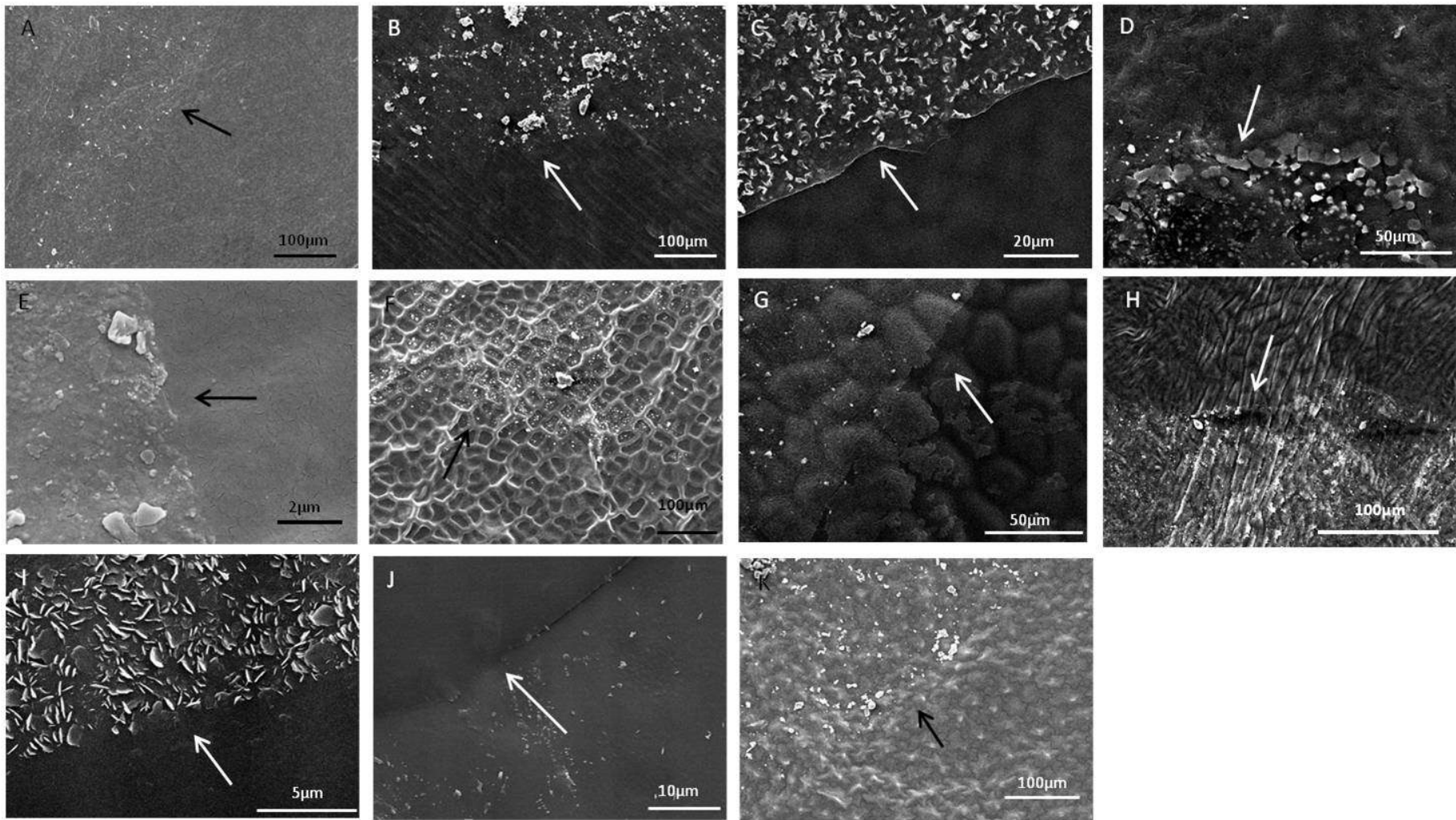


Abbildung 53: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Grenzen zwischen unbehandelten und zweifach mit Kollodium behandelten Oberflächen verschiedener Arten

von: A. *Camellia sinensis* (BS), B. *Clivia miniata* (BS), C. *Clusia spec.* (BS), D. *Ficus elastica* (CM), E. *Hedera helix* (CM), F. *Monstera deliciosa* (BS), G. *Philodendron spec.*(BS), H. *Prunus laurocerasus* (CM), I. *Schefflera arboricola* (BS), J. *Solanum lycopersicum* (FCM), K. *Vinca major* (BS) mit Kollodium. Pfeile zeigen die Grenze zwischen unbehandelter und behandelter Fläche. BS= Blattscheibe, CM= cuticular membrane, FCM=fruit cuticular membrane.

Die in den analytischen und transportphysiologischen Untersuchungen verwendeten Kutikulamembranen von *Prunus laurocerasus* mussten einige Monate nach der Isolation lagern, bevor sie für die selektive Entfernung der Wachse genutzt werden konnten. Auf frisch isolierten Kutikulamembranen blieb das Kollodium haften und bei dem Versuch den Nitrozellulosefilm von der Oberfläche abzuheben, rissen die Membranen, was ihre weitere Verwendung in Transpirationsmessungen ausschloss.

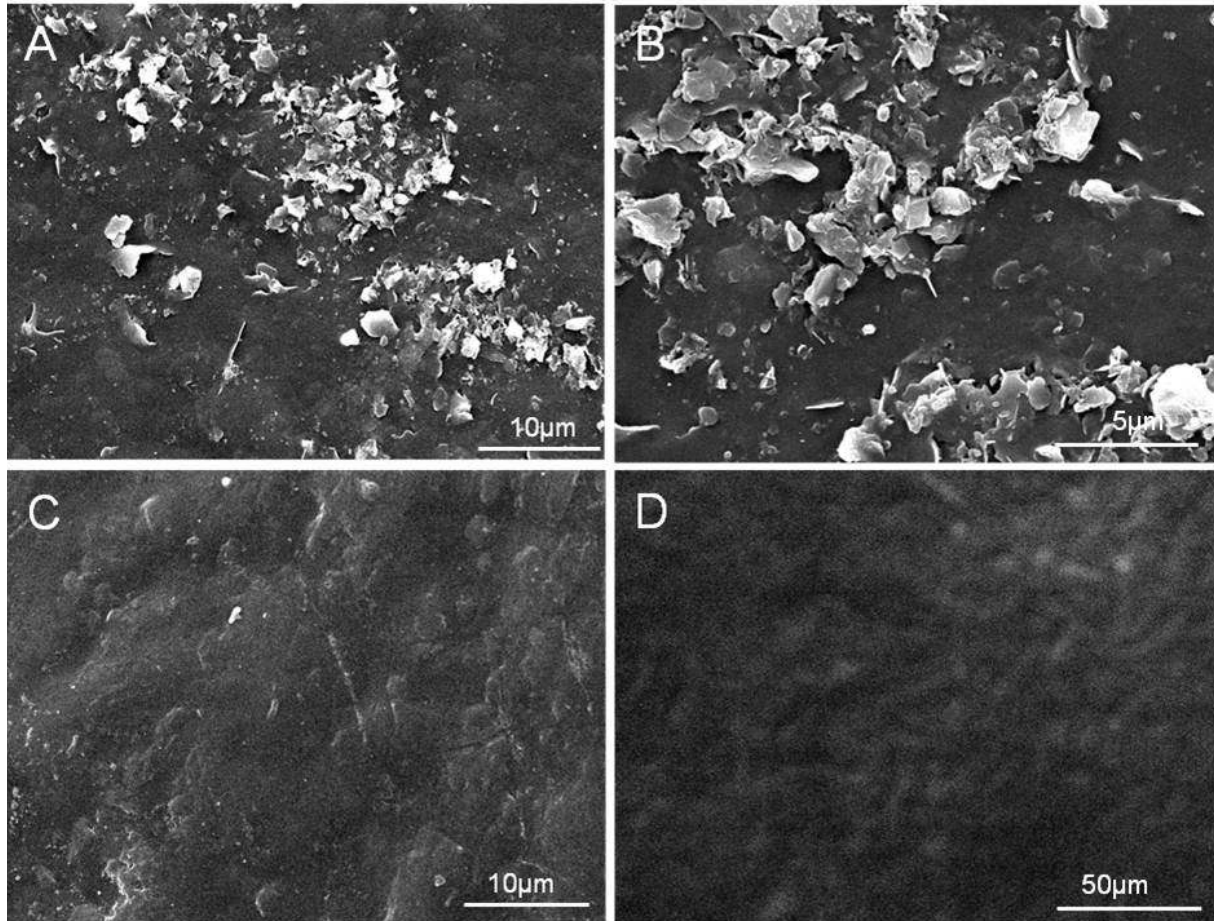


Abbildung 54: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen unterschiedlicher Lagerungszeit

A+B: lang gelagerte (aus 2009) *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen, selektive Entfernung möglich, C+D: frisch isolierte (aus 2011) *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen, selektive Entfernung nicht möglich.

Die Oberflächen in Abbildung 54 A+B (Isolation 2009) zeigten deutliche Wachsflocken. Bei visueller Betrachtung dieser Membranen im Licht fiel auf, dass ihre physiologische Außenseite stark glänzte. Diese Kutikulamembranen eigneten sich im Gegensatz zu den frisch isolierten *Prunus* Kutikulamembranen (Isolation 2011) für die selektive Wachsentfernung. Die frisch isolierten Membranen erschienen matt und Wachse konnten auf der Oberfläche nicht ausgemacht werden (C+D). Auf diesen Kutikulamembranen blieb der Kollodiumfilm nach Trocknung haften, was ihre Verwendung in der Analytik und für Transpirationsversuche ausschloss.

Als Vergleich zu der Behandlung mit Kollodium wurden *Prunus laurocerasus* Blattscheiben zwei Mal in Folge mit Gummi arabicum behandelt und die Oberfläche rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die Behandlung musste an Blattscheiben erfolgen, da isolierte Kutikulamembranen von *Prunus laurocerasus* bei dem Versuch der Entfernung des Polysaccharidfilms rissen.

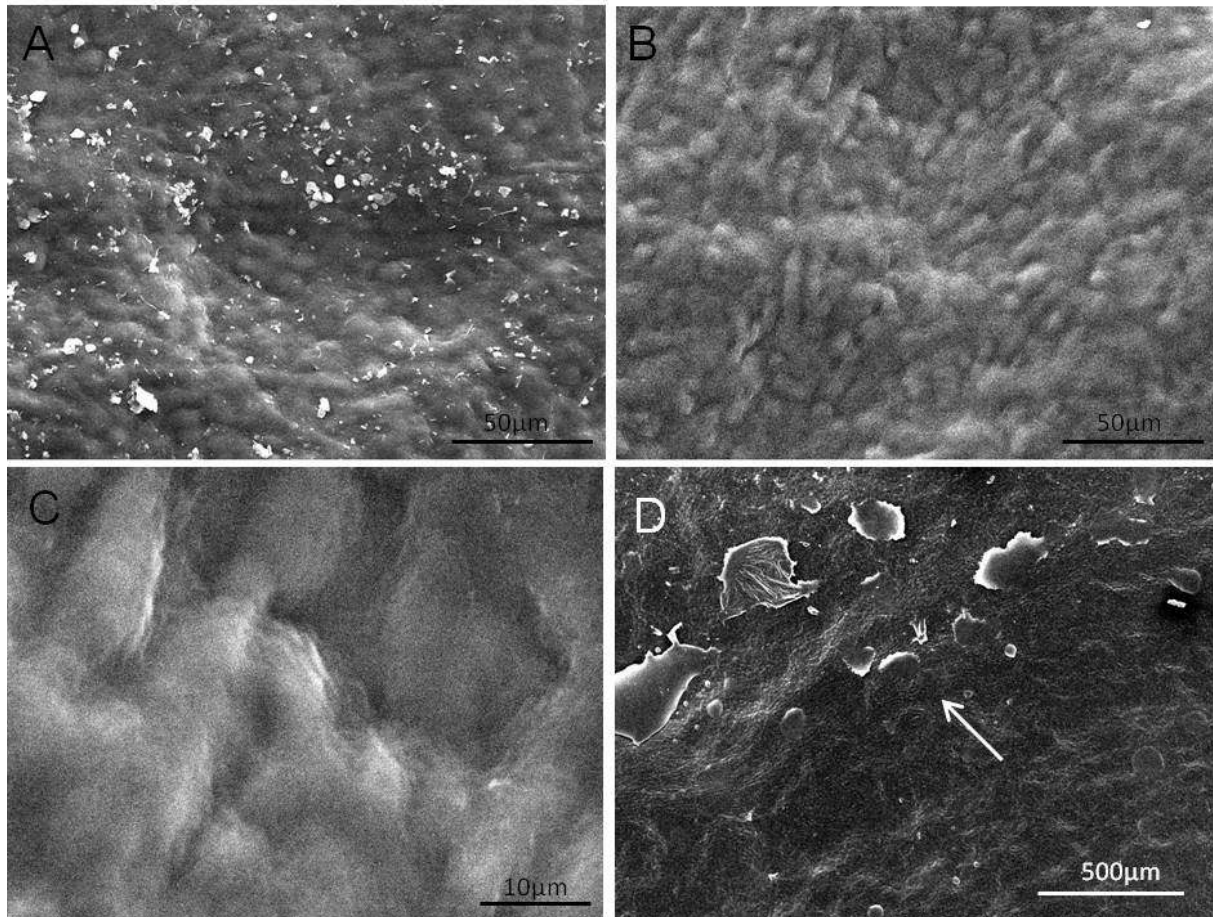


Abbildung 55: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von unbehandelten und mit Gummi arabicum behandelten *Prunus laurocerasus* Blattoberseiten

A: physiologische Außenseite, unbehandelt, B+C: physiologische Außenseite zweifach mit Gummi arabicum behandelt, D: physiologische Außenseite, zur Hälfte zweifach mit Gummi arabicum behandelt, Pfeil symbolisiert die Grenze zur behandelten Fläche.

Abbildung 55 A zeigt die schuppenartige Form der Oberflächenwache einer unbehandelten *Prunus laurocerasus* Blattscheibe. Die Oberfläche erschien nach der zweifachen Behandlung mit Gummi arabicum glatt, schuppenartige Wachsformationen konnten auf der Oberfläche nicht mehr erkannt werden (Abbildung 55 B und C). Die Grenze zwischen un- und behandeltem Bereich konnte bei einer zur Hälfte behandelten *Prunus* Blattscheibe erkannt werden (D, Pfeil).

Neben der selektiven Entfernung mit Kollodium und Gummi arabicum wurde auch die zweifache Behandlung mit Celluloseacetat rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die Herstellung einer zur Hälfte behandelten Probe war nicht möglich, da das in Aceton gelöste Celluloseacetat auf der Oberfläche direkt spreitete und eine Unterteilung in unbehandelter und behandelter Oberfläche ausschloss.

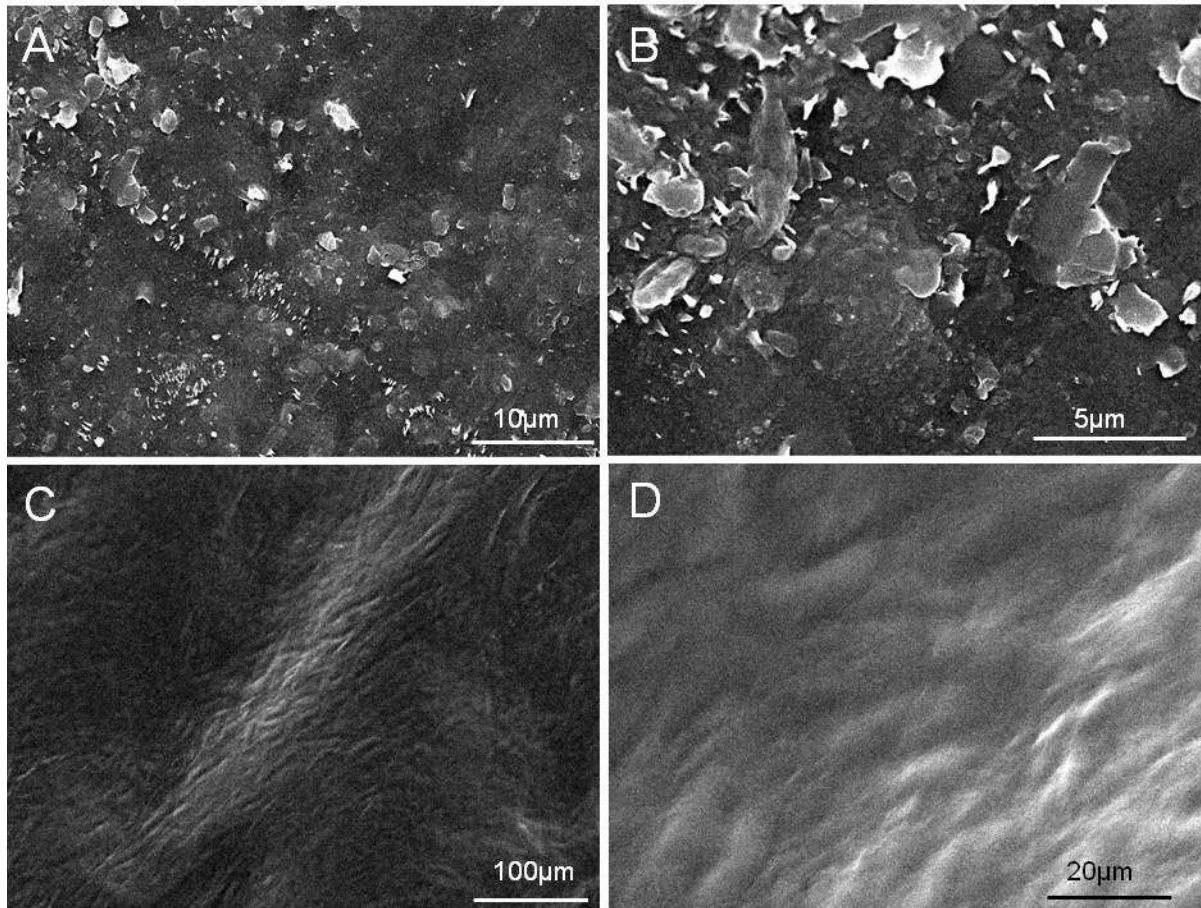


Abbildung 56: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von unbehandelten und mit Celluloseacetat behandelten *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen

A+B: physiologische Außenseite, unbehandelt, C+D: physiologische Außenseite nach zweimaliger Behandlung mit Celluloseacetat.

Abbildung 56 A und B zeigt die für *Prunus laurocerasus* typischen Oberflächenwachse. Sie weisen eine schuppenartige Form auf und bilden einen Wachsfilm. Nach der zweifachen Celluloseacetatbehandlung schienen die *Prunus* Kutikulamembranen glatt, die Oberflächenwachse fehlten (C+D).

3.2.3 Transpirationsmessungen

Durch radioaktive Transpirationsmessungen sollte die Rolle der epikutikulären Wachse bei der Bildung der Barriere und der Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf die Transpiration untersucht werden. Alle durchgeführten Transpirationsmessungen erfolgten über 100 % Luftfeuchte und bei 25 °C. Die Effekte der einzelnen Behandlungen auf die Transpiration der verschiedenen Arten konnte ermittelt werden, indem die Permeabilität vor Behandlung mit der Permeabilität nach Behandlung verglichen wurde. Jede behandelte Kutikulamembran oder Blattscheibe wurde einzeln betrachtet. Die in den Versuchen verwendeten Blattscheiben stammten meist von Arten, von denen sich keine Kutikulamembranen isolieren ließen. Sie wurden vor dem Einbau und der Verwendung in Transpirationsstudien mit radioaktivem Wasser vakuumfiltriert (Schreiber, 2001). Membranen, die aufgrund eines nicht linearen Kurvenverlaufs, oder eines verringerten Bestimmtheitsmasses auf eine Beschädigung hindeuteten, wurden aus der Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung ausgeschlossen. Die aufgeführten Mittelwerte wurden aus mindestens fünf Einzelwerten gebildet. Um eine Antwort auf die Frage nach der Funktion der epikutikulären Wachse in der Ausbildung der kutikulären Transpirationsbarriere zu erhalten, wurden die Oberflächenwachse selektiv mit drei verschiedenen Ansätzen entfernt. Kollodium (Nitrozellulose) gelöst in Diethylether-Ethanol und Celluloseacetat gelöst in Aceton wurden verwendet. Als Vergleich dazu wurde Gummi arabicum getestet, das in *Aqua demin* und nicht in organischem Lösungsmittel gelöst wird. Vorausgehende rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen hatten gezeigt, dass eine zweifache Behandlung mit Kollodium ausreicht, um die Oberflächenwachse quantitativ zu entfernen. Die Oberflächen erscheinen nach der Behandlung glatt. Als Kontrolle in den Transportexperimenten wird der Effekt der organischen Lösungsmittel Diethylether-Ethanol (Kollodium) und Aceton (Celluloseacetat) auf die Transpiration gemessen. Für Gummi arabicum stellt die Applikation von *Aqua demin* die Kontrolle dar.

3.2.3.1 Messung der Transpiration vor und nach selektivem Entfernen der Oberflächenwachse von isolierten Kutikulamembranen und intakten Blattscheiben mit Hilfe von Kollodium

Die gemittelten Effekte der zweifachen Kollodium- und Diethylether-Ethanol Behandlung (Dauer der Trocknungsphase: ca. 30 s) zehn verschiedener Arten (Blattscheiben und isolierte Kutikulamembranen) streuen alle um 1.0 (Tabelle 13). Der größte Effekt konnte bei der Behandlung von *Solanum lycopersicum* Fruchtkutikulamembranen gemessen werden. Die Transpiration stieg um den Faktor $1,40 \pm 0,36$ nach der Behandlung an. Bei einigen Arten wie *Clusia spec.*, *Philodendron spec.*, *Camellia sinensis* und *Ficus elastica* konnten Effekte kleiner als 1.0 gemessen werden. Das organische Lösungsmittel Diethylether-

Ethanol hatte mit $1,35 \pm 0,13$ bei *Schefflera* und $1,30 \pm 0,59$ bei *Solanum lycopersicum* den höchsten Effekt auf die Transpiration. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Behandlung mit Kollodium und dem organischen Lösungsmittel als Kontrolle bei einigen Arten zu einer leicht erhöhten Transpiration, bei anderen zu gering erniedrigten Transpirationen führte. Die bei den Blattscheiben gemessenen Veränderungen waren nicht signifikant verschieden von 1 (Ttest gegen theoretischen Wert 1 (Köhler *et al.*, 2012); Kollodiumbehandlung $t_{\text{Vers}} (0,57) \leq t_{\text{Tab}} (2,31)$, Lösungsmittelbehandlung $t_{\text{Vers}} (0,29) \leq t_{\text{Tab}} (2,31)$), was eine Mittelwertbildung der Effekte unabhängig der verschiedenen Arten möglich machte.

Tabelle 13: Gemittelte Effekte der Kollodium und Diethylether-Ethanol Behandlung auf die Transpirationsraten intakter Blattscheiben und isolierter Kutikulamembranen

^a: Vorarbeiten (Zeisler, 2010), zur Vollständigkeit als Vergleich zu den Blattscheiben mit aufgeführt.

Art	Effekt (Behandlung mit Kollodium) MW \pm STABW	Effekt (Behandlung mit LM) MW \pm STABW
Blattscheiben		
<i>Camellia sinensis</i>	0,78 \pm 0,29	1,05 \pm 0,13
<i>Clusia spec.</i>	0,66 \pm 0,14	1,08 \pm 0,34
<i>Ficus elastica</i>	0,87 \pm 0,08	1,08 \pm 0,23
<i>Hedera helix</i>	1,22 \pm 0,27	1,21 \pm 0,28
<i>Monstera deliciosa</i>	1,14 \pm 0,16	0,86 \pm 0,06
<i>Philodendron spec.</i>	0,83 \pm 0,18	0,69 \pm 0,30
<i>Prunus laurocerasus</i>	1,21 \pm 0,22	0,98 \pm 0,15
<i>Schefflera arboricola</i>	1,01 \pm 0,37	1,35 \pm 0,13
<i>Vinca major</i>	0,94 \pm 0,10	0,87 \pm 0,19
gemittelter Effekt	0,98 \pm 0,28	1,02 \pm 0,28
Kutikulamembranen		
<i>Ficus elastica</i> ^a	1,23 \pm 0,36	1,18 \pm 0,38
<i>Hedera helix</i> ^a	1,11 \pm 0,17	1,04 \pm 0,16
<i>Prunus laurocerasus</i> ^a	1,22 \pm 0,30	0,94 \pm 0,17
<i>Solanum lycopersicum</i> Frucht	1,40 \pm 0,36	1,30 \pm 0,59

3.2.3.2 Messung der Transpiration vor und nach selektivem Entfernen der Oberflächenwachse von intakten Blattscheiben mit Gummi arabicum

Die Messung der kutikulären Transpiration vor und nach selektiver Entfernung der Oberflächenwachse konnte mit Gummi arabicum nur an intakten Blattscheiben erfolgen, da isolierte Kutikulamembranen durch das Abziehen des getrockneten Films rissen. Die Anfangstranspiration wurde über einem Zeitraum von 2 Stunden über 100 % Luftfeuchte gemessen. Das mit *Aqua demin* versetzte Gummi arabicum wurde mit einem Pinsel auf die zu behandelnde Oberfläche aufgebracht. Nach einer Zeitspanne von ca. 45 min pro Durchgang konnte das getrocknete Gummi arabicum Stückweise von der Oberfläche entfernt und die Membranen erneut behandelt werden. Die mit *Aqua demin* behandelten Kutikulamembranen mussten über Nacht unter dem Abzug trocknen. Tabelle 14 zeigt die Effekte der Gummi arabicum und *Aqua demin* Behandlung auf die Transpiration von *Prunus* Blattscheiben und Kutikulamembranen. Die mechanische Entfernung der epikutikulären Wachse von der Oberfläche führte zu keinem Anstieg in der Transpiration. Der Wert ist statistisch nicht verschieden von 1 (Ttest gegen theoretischen Wert 1; Gummi arabicum Behandlung $t_{\text{Vers}}(1,12) \leq t_{\text{Tab}}(2,31)$).

Tabelle 14: Gemittelte Effekte der Gummi arabicum und Wasserbehandlung auf die Transpirationsrate intakter *Prunus laurocerasus* Blattscheiben und isolierter Kutikulamembranen

Art	Effekt (Behandlung mit Gummi arabicum) MW ± STABW	Effekt (Behandlung mit <i>Aqua demin</i>) MW ± STABW
Blattscheiben		
<i>Prunus laurocerasus</i>	0,82 ± 0,47	
Kutikulamembranen		
<i>Prunus laurocerasus</i>		0,82 ± 0,13

3.2.3.3 Messung der Transpiration vor und nach selektivem Entfernen der Oberflächenwachse von isolierten Kutikulamembranen mit Celluloseacetat

Nach der zweistündigen Messung der Anfangstranspiration über 100 % Luftfeuchte wurden fünf *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen zwei Mal in Folge mit 100 µl Celluloseacetat behandelt. Die Trocknungsphase zwischen den beiden Durchgängen dauerte ca. zwei Minuten. Als Negativkontrolle wurden fünf weitere Kutikulamembranen zwei Mal mit je 15 µl Aceton behandelt. Tabelle 15 zeigt die gemittelten Effekte samt Standardabweichungen der jeweiligen Behandlung. Es konnte ein signifikanter Anstieg der Transpiration nach der Behandlung mit Celluloseacetat verzeichnet werden (Effekt: $9,08 \pm 4,57$, Ttest gegen theoretischen Wert 1; Behandlung mit Celluloseacetat $t_{\text{Vers}} (3,95) > t_{\text{Tab}} (2,77)$). Auch die Applikation des Lösungsmittels Aceton führte zu einem signifikanten Anstieg der Transpiration (Effekt: $6,11 \pm 2,97$, Ttest gegen theoretischen Wert 1; Behandlung mit Aceton $t_{\text{Vers}} (3,84) > t_{\text{Tab}} (2,77)$).

Tabelle 15: Gemittelte Effekte der Celluloseacetat- und Acetonbehandlung auf die Transpirationsraten isolierter *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen

Art	Effekt	Effekt
	(Behandlung mit Celluloseacetat) MW ± STABW	(Behandlung mit Aceton) MW ± STABW
<i>Prunus laurocerasus</i>	9,08 ± 4,57	6,11 ± 2,97

3.2.4 Der Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf die kutikuläre Barriere

Der Effekt verschiedener Lösungsmittel wurde auf die Transpiration von *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen untersucht. Die Kutikulamembranen wurden nach einer mindestens einstündigen Messung der Anfangstranspiration mit den in Tabelle 4 beschriebenen Lösungsmitteln behandelt. Dabei erfolgte die Behandlung bei allen Lösungsmitteln außer bei *Aqua demin* zweifach in Folge. Zwischen der ersten und zweiten Behandlung und der anschließenden Messung der Transpiration für mindestens eine Stunde wurde darauf geachtet, dass das Lösungsmittel vollständig verdampft war. Vor der Behandlung mit den Lösungsmitteln, konnte für isolierte *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen ein Leitwert von $2,02 \times 10^{-9} \pm 1,70 \times 10^{-9}$ m/s (n=58) gemessen werden.

Ein Leitwert von $6,37 \times 10^{-12} \pm 5,80 \times 10^{-12}$ m/s wurde für die Kontrollen (Parafilmscheiben) gemessen. Die größten Effekte auf die kutikuläre Transpiration konnten durch die Applikation von Chloroform (Effekt: $4,81 \pm 2,79$) und Aceton (Effekt: $3,72 \pm 1,88$) erzielt werden. Die Applikation von Ethanol (Effekt: $1,32 \pm 0,48$), Diethylether-Ethanol (Effekt: $1,0 \pm 0,07$), Hexan (Effekt: $0,93 \pm 0,13$) und Wasser (Effekt: $0,82 \pm 0,13$) hatte im Vergleich dazu einen geringeren oder keinen Effekt auf die Transpiration (Abbildung 57)

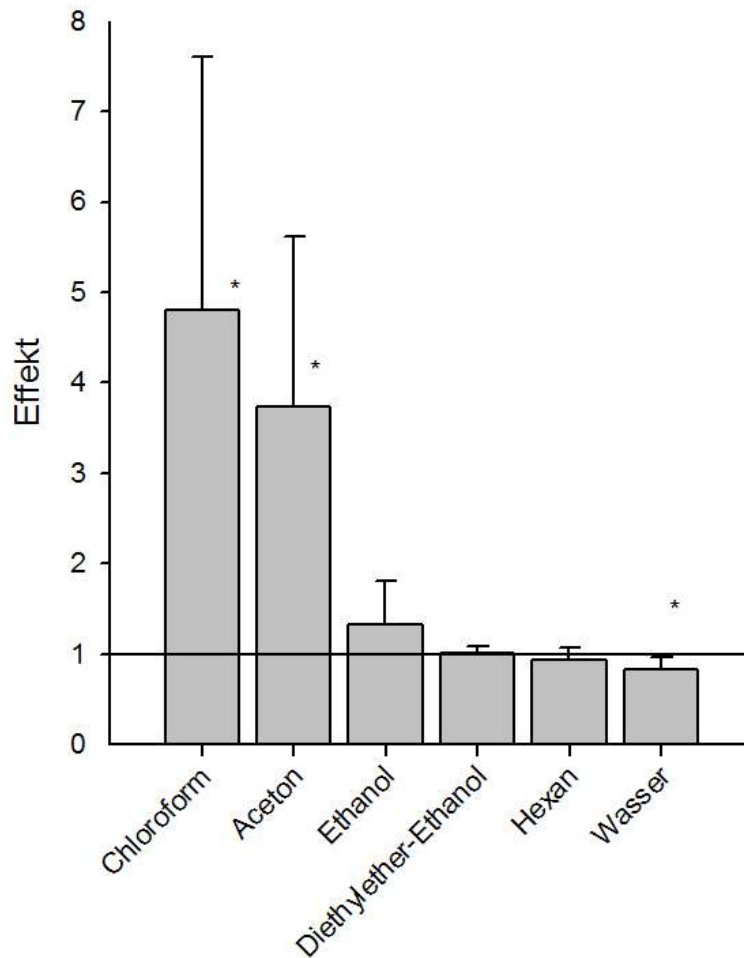


Abbildung 57: Effekte der Behandlung mit verschiedenen Lösungsmitteln auf die kutikuläre Transpiration von *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen der mit verschiedenen Lösungsmitteln behandelten *P. laurocerasus* Kutikulamembranen. Von 1 signifikant verschiedene Effekte sind mit * gekennzeichnet (Ttest gegen theoretischen Wert 1).

3.3 Die Kutikula als epiphyller Lebensraum

Der potentielle Einfluss tensidproduzierender Bakterien auf die kutikuläre Transpiration von isolierten *Prunus laurocerasus* und *Populus canescens* Kutikulamembranen wurde mit verschiedenen Versuchsansätzen untersucht. Die Wachse der beiden Pflanzenarten wurden chemisch analytisch mittels GC/MS und GC/FID untersucht. Die Besiedlung der Blattoberflächen mit *Pseudomonas syringae* wurde durch Rasterelektronenmikroskopie untersucht und die verwendeten Bakteriensuspensionen, Überstände und Extrakte vor der Verwendung in Transpirationsstudien visuell und durch Kontaktwinkelmessungen auf Tensidproduktion überprüft. Für die visuelle Überprüfung wurde das Spreitungsverhalten von Tropfen der unterschiedlichen Ansätze auf Parafilm gegenüber Wasser verglichen und die Gefäße mit dem jeweiligen Ansatz kräftig geschüttelt und auf Schaumbildung überprüft. Der Effekt der Bakteriensuspensionen, Überstände und Extrakte auf die Transpiration wurde radioaktiv gemessen.

3.3.1 Analytische Untersuchungen

Der Gesamtwachsgehalt von isolierten *Prunus laurocerasus* (n=5) und *Populus canescens* (n=6) Kutikulamembranen wurde chemisch analytisch bestimmt. Die erneute analytische Untersuchung der *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen war von Nöten, da sie sich in dem Zeitpunkt der Isolation von denen in 3.2.1.3 beschrieben unterschieden. Grafisch dargestellt sind die Mittelwerte samt zugehöriger Standardabweichung.

3.3.1.1 Gesamtwachsanalyse von *Prunus laurocerasus*

Kutikulamembranen

Die Totalextraktion der isolierten *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen ergab im Mittel einen Wachsgehalt von $84,42 \pm 9,63 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Es konnten insgesamt 30 Einzelsubstanzen (Abbildung 58 A) der Substanzklassen der Säuren ($3,66 \pm 1,20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Alkane ($13,66 \pm 1,50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Alkohole ($2,37 \pm 0,20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Aldehyde ($0,49 \pm 0,29 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Ester ($4,63 \pm 1,51 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und Triterpene ($59,59 \pm 11,08 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) identifiziert werden (B). Die Triterpene bestehend aus dem Triterpenalkohol Uvaol und den beiden Triterpensäuren Oleanol- und Ursolsäure machten mit 69 % den größten Anteil des Gesamtwachses aus. Innerhalb der Klasse der Triterpene machte die Ursolsäure mit $49,01 \pm 9,56 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ den größten Anteil aus. Die Betrachtung der Kettenlängenverteilung (C) macht deutlich, dass Substanzen der Kettenlänge C_{29} mit einer Menge von $8,06 \pm 0,83 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ am prominentesten, gefolgt von Substanzen der Kettenlänge C_{31} ($4,91 \pm 0,64 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) vertreten waren.

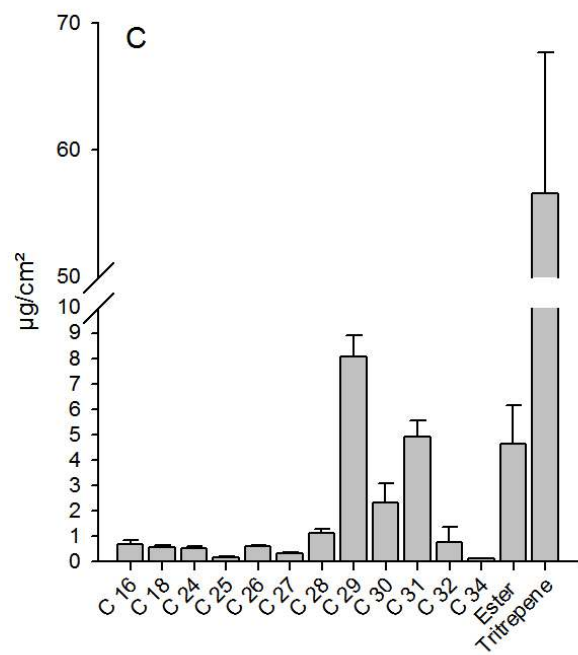
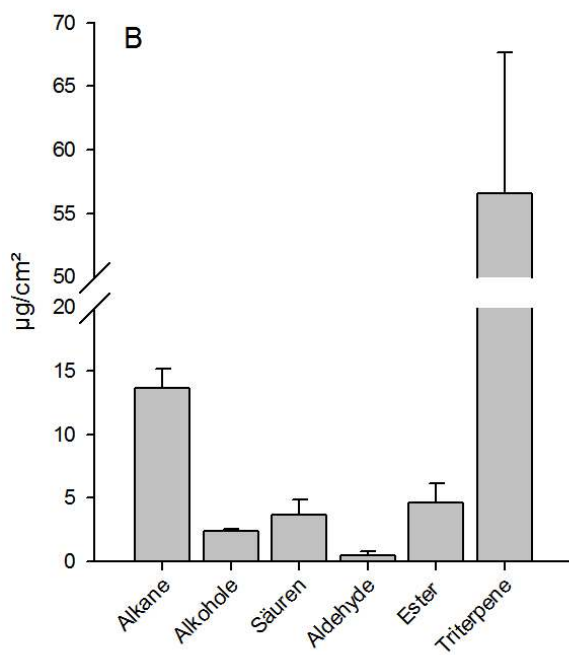
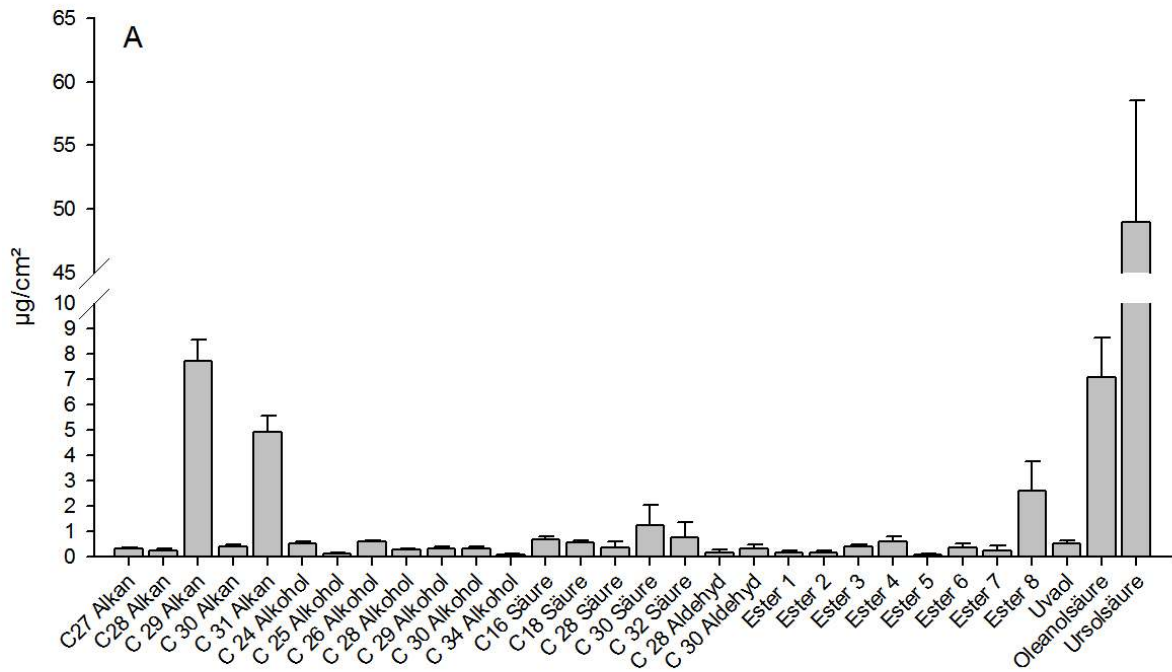


Abbildung 58: Gemittelter Wachsgehalt in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ isolierter *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen
aufgeteilt nach A: einzelnen Substanzen, B: Substanzklassen und C: Kettenlängen.

3.3.1.2 Gesamtwachsanalyse von *Populus canescens*

Kutikulamembranen

Nach der Extraktion von sechs isolierten *Populus canescens* Kutikulamembranen konnte eine Gesamtwachsmenge von $38,27 \pm 6,63 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ gaschromatographisch bestimmt werden. Das Wachs bestand nur aus langkettigen Aliphaten (Abbildung 59 A), Triterpene konnten nicht nachgewiesen werden. Den größten Anteil am Wachs machten die Ester ($23,08 \pm 2,77 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), gefolgt von den Alkanen mit $6,93 \pm 2,07 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ aus (B). Neben diesen Substanzen konnten ferner Säuren ($2,62 \pm 0,28 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Alkohole ($2,55 \pm 1,25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und Aldehyde ($2,34 \pm 1,14 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) identifiziert werden. Substanzen der Kettenlänge C_{38} machten mit $16,28 \pm 1,85 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (42,97 %) den größten Anteil am Wachs aus, gefolgt von Substanzen der Kettenlänge C_{27} mit $5,31 \pm 1,60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (C).

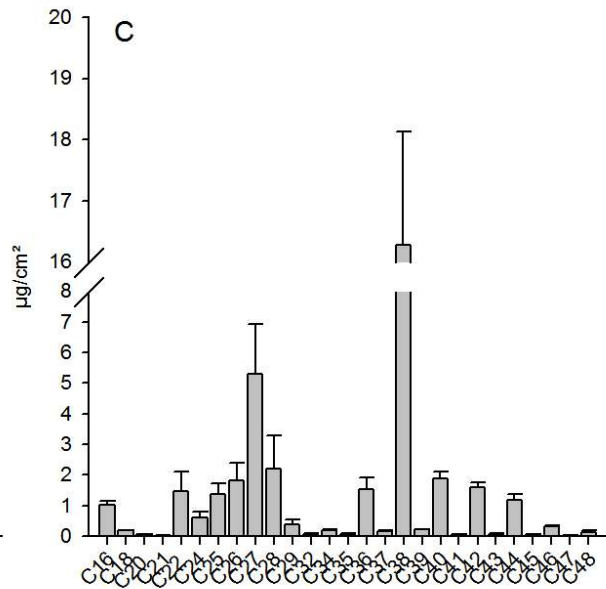
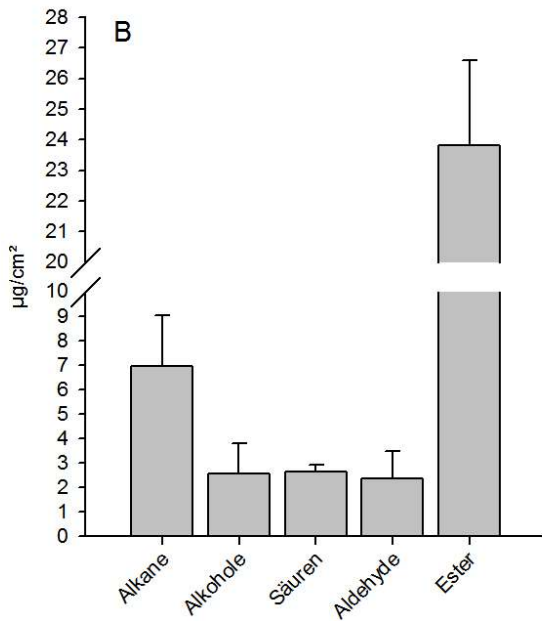
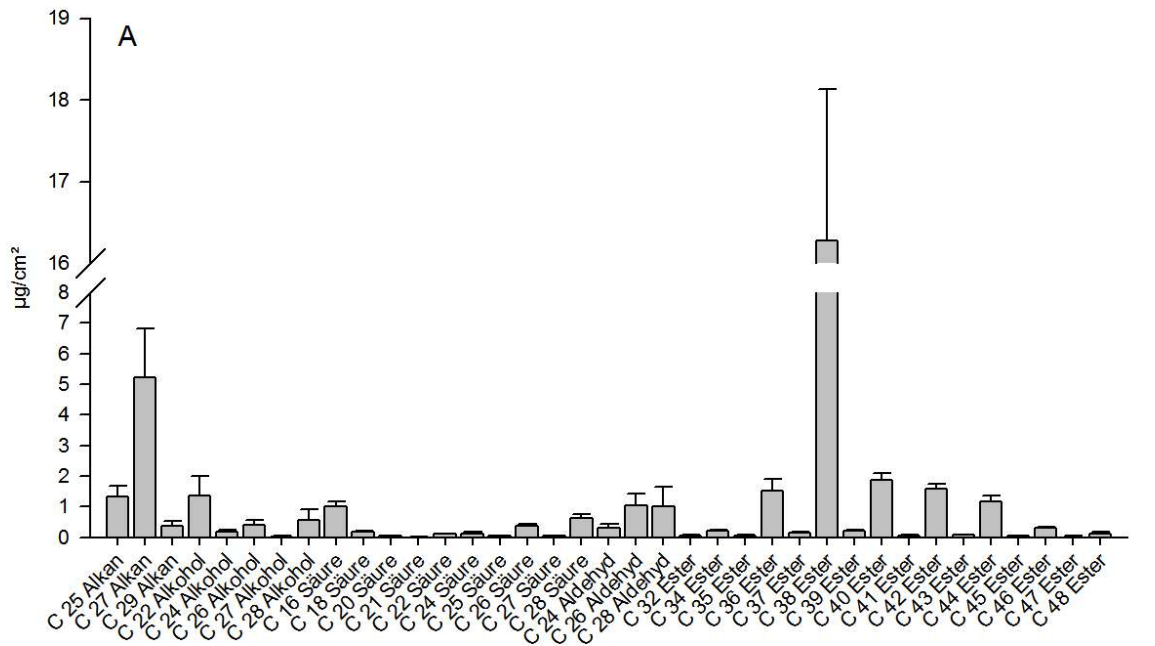


Abbildung 59: Gemittelter Wachsgehalt in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ isolierter *Populus canescens* Kutikulamembranen
 aufgeteilt nach A: einzelnen Substanzen, B: Substanzklassen und C: Kettenlängen.

3.3.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der *Pseudomonas syringae* Bakterien

Pseudomonas syringae Bakterien wurden für zwei Tage bei 25 °C auf KB-Platten angezogen (Kapitel: 2.5.1). Es wurde eine WT Bakteriensuspension mit der optischen Dichte von 1 hergestellt und 100 µl dieser Suspension auf einen mit einer *Prunus laurocerasus* Kutikulamembran versehenen Probenstisch appliziert. Vor dem Sputtern wurde darauf geachtet, dass die Bakteriensuspension vollständig unter dem Abzug getrocknet war. Es wurde für zwei Minuten besputtert (Sputterschicht: 72 nm). Die rasterelektronenmikroskopischen Bilder zeigen, dass sich die stäbchenförmigen Bakterien zu Aggregaten zusammenlagern (Abbildung 60 A). Es scheint, dass sie durch eine extrazelluläre Matrix zusammengehalten wurden. Sie wiesen im Mittel eine Größe von 1-2 µm auf (B).

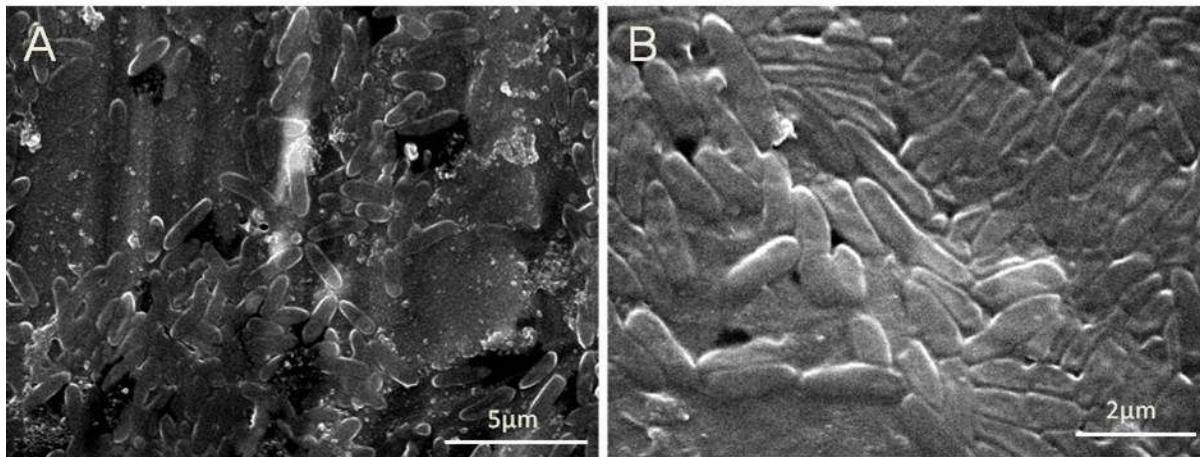


Abbildung 60: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *Pseudomonas syringae* WT Bakterien auf einer isolierten *Prunus laurocerasus* Kutikulamembran

A+B: Bakterien lagern sich auf der Oberfläche zu Aggregaten zusammen.

3.3.3 Überprüfung der Bakteriensuspensionen, Überstände und Extrakte auf Tensidproduktion, Spreitungsverhalten auf Parafilm und Kontaktwinkelmessungen

Eine deutliche Schaumbildung konnte nach dem Schütteln aller Bakteriensuspensionen und Überstände, ausgenommen bei denen der Dbl ko- Bakterien erkannt werden. Tropfen dieser Ansätze zeigten im Vergleich zu *Aqua demin* oder der Suspension der Dbl ko- Mutante ein größeres Spreitungsvermögen (Abbildung 61). Die grob auf gereinigten Extrakte (Rh1a-, Haa, Rh1a-/Syf-, Syf) wurden mit *Aqua demin* versetzt und gevortext. Es konnte bei allen Extrakten, außer bei Rh1a-/Syf- eine Schaumbildung erkannt werden. Tropfen dieser Extrakte zeigten im Vergleich zu der Negativkontrolle *Aqua demin*, sowohl auf Parafilm als auch auf der isolierten Kutikulamembran ein größeres Spreitungsverhalten. Kontaktwinkelmessungen bei drei unbehandelten *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen ergaben im Mittel einen Winkel von $82,95^\circ \pm 11,89^\circ$. Es konnten keine Kontaktwinkel mit Wassertropfen als Flüssigkeit an *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen durchgeführt werden, die über Nacht mit Bakteriensuspension oder Phosphatpuffer behandelt wurden. Die Wassertropfen spreiteten sofort auf der zuvor mit WT- oder MT- Bakterien behandelten Oberflächen. Die Oberflächen wurden durch die Vorbehandlung mit den Bakteriensuspensionen vollständig benetzbar. Das gleiche konnte bei der Vorbehandlung mit Phosphatpuffer als Negativkontrolle beobachtet werden. Für unbehandelte *Populus canescens* Kutikulamembranen konnte ein Kontaktwinkel von $121^\circ \pm 4,45^\circ$ gemessen werden. Auch hier war die Messung der Kontaktwinkel nach Bakterienapplikation und Eintrocknung über Nacht nicht möglich.



Abbildung 61: Überprüfung der Tensidproduktion von *Pseudomonas syringae*
Exemplarisch ist das Spreitungsverhalten eines Tropfens der WT Bakteriensuspension im Vergleich zum Tropfen der Suspension der Dbl Ko- Mutante gezeigt.

3.3.4 Transpirationsmessungen

Die radioaktiv durchgeführten Transpirationsmessungen erfolgten mit isolierten Kutikulamembranen und über 100 % Luftfeuchte. Es wurde der Einfluss von Bakteriensuspensionen, Überständen und grob auf gereinigten Extrakten untersucht.

3.3.4.1 Einfluss tensidproduzierender Bakterien auf die Transpiration von *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen

Die Anfangstranspiration wurde über einen einstündigen Zeitraum gemessen. Die Kutikulamembranen ($n \geq 5$) wurden anschließend mit 100 μl der WT (produzieren Syringafaktin und Rhamnolipid), Syf- (Syringafaktin *knockout*) und Dbl ko- (kein Biotensid, Doppelknockout) Bakteriensuspensionen in Phosphatpuffer (OD 1) behandelt. Die Trocknung der Suspensionen erfolgte über Nacht unter dem Abzug. Am nächsten Tag wurde die Transpiration erneut für mindestens eine Stunde gemessen. Der Effekt der einzelnen Bakterienstämme auf die Transpiration wurde berechnet, indem die Endsteigung (E_2) durch die Anfangssteigung (E_1) dividiert wurde. Abbildung 62 A zeigt die gemittelten Kinetiken samt Standardabweichung. Die hohen Standardabweichungen spiegeln die biologische Variabilität der Kutikulamembranen wider. Die einzelnen Membranen verhielten sich jedoch vor und nach der Behandlung zueinander gleich. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Transpiration nach der Behandlung mit WT, Syf- und Dbl ko- Bakterien anstieg. Dies wird bei Betrachtung der errechneten Effekte (B) deutlicher. Die Applikation von 100 μl der Syf-Bakteriensuspension hatte mit $3,45 \pm 2,43$ den größten Effekt auf die Transpiration, gefolgt von der Applikation der Dbl ko- Bakterien (Effekt: $2,77 \pm 1,53$). Den geringsten Effekt auf die Wasserpermeabilität hatte die Applikation der WT Bakteriensuspension (Effekt: $1,80 \pm 0,56$).

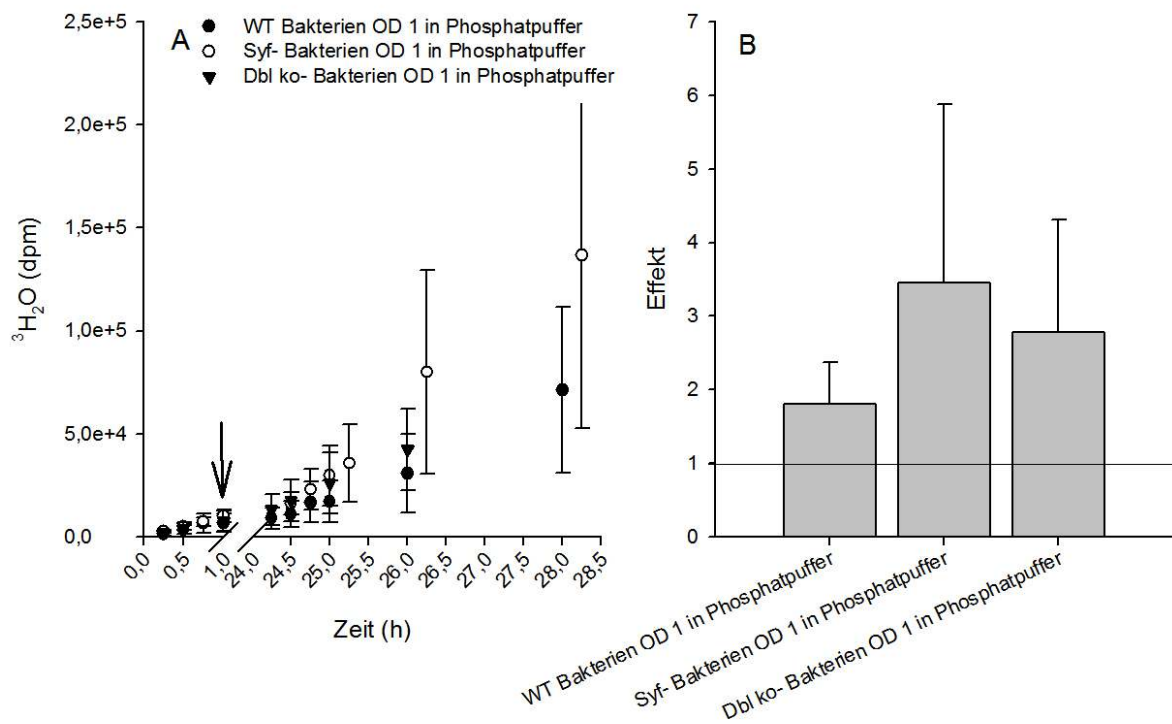


Abbildung 62: Gemittelte Kinetiken und Effekte auf die Transpiration der mit Bakterien behandelten *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen über 100 % Luftfeuchte

A: *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen behandelt mit Bakteriensuspensionen, B: zu A zugehörige Effekte der Behandlung. Der letzte Messpunkt vor der Achsenunterbrechung ist der Zeitpunkt der Behandlung (Pfeil).

3.3.4.2 Einfluss von Bakterienüberständen auf die Transpiration von *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen

Dieser Ansatz wurde als Vergleich zu den Versuchen mit Bakteriensuspensionen gewählt, um eventuelle Effekte auf die Transpiration durch freigegebene Enzyme der Bakterienzellen, z.B. durch Absterben während der Trocknungszeit unter dem Abzug, auszuschließen. Von den WT und Syf- Bakterien wurden Bakterienüberstände in Phosphatpuffer mit einer optischen Dichte von 1 hergestellt. Nach Zentrifugation sollten sich in den Überständen keine Bakterienzellen mehr befinden, sondern nur noch die Biotenside. Nach Messung der Anfangstranspiration über einen Zeitraum von einer Stunde wurden die Kutikulamembranen mit 100 μ l der Bakterienüberstände behandelt. Nach Eintrocknung über Nacht unter dem Abzug wurde die Transpiration erneut über einen Zeitraum von einer Stunde gemessen. Die Applikation des WT-Überstandes führte zu einer leichten Zunahme der Transpiration (Effekt: $1,56 \pm 0,77$), Abbildung 63. Dieser ist aber aufgrund der hohen biologischen Variabilität der Kutikulamembranen und der damit verbundenen hohen Standardabweichung statistisch nicht verschieden von 1. Kein Effekt auf die Transpiration hatte die Applikation des Syf-Bakterienüberstandes (Effekt: $0,91 \pm 0,18$).

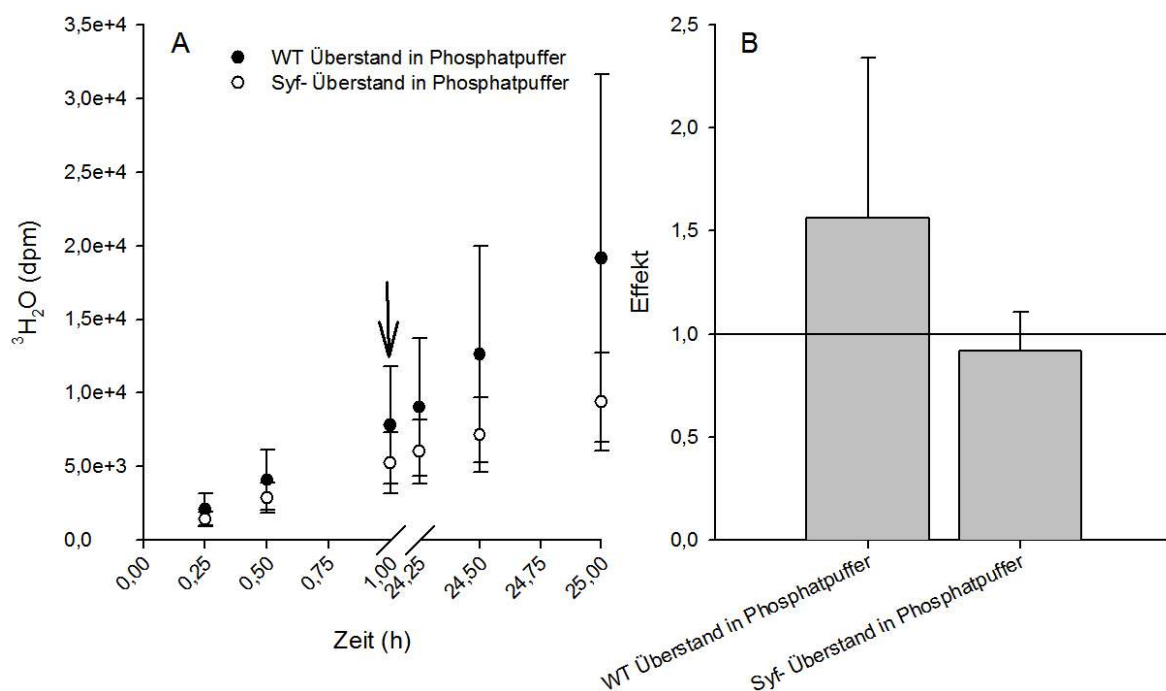


Abbildung 63: Gemittelte Kinetiken und Effekte auf die Transpiration der mit Überständen behandelten *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen über 100 % Luftfeuchte

A: *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen behandelt mit Bakterienüberständen der, B: zu A zugehörige Effekte der Behandlung. Der letzte Messpunkt vor der Achsenunterbrechung ist der Zeitpunkt der Behandlung (Pfeil).

3.3.4.3 Einfluss von grob auf gereinigten Biotensid-Extrakten auf die Transpiration von *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen

Der Effekt dreier auf gereinigter Biotensid-Extrakte auf die Transpiration von isolierten *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen wurde durch Transpirationmessungen untersucht. Den größten Effekt ($1,50 \pm 0,79$) auf die Transpiration hatte die Applikation von 30 μl des Rh1a- Extrakts. Dieses Extrakt stammte von Bakterien, die das Syringafaktin bilden konnten, in der Rhamnolipidsynthese jedoch einen *knockout* aufwiesen (Abbildung 64 A). Die Applikation des HAA Extrakts (Vorstufe des Rhamnolipids) hatte keinen Effekt ($1,08 \pm 0,17$) auf die Transpiration, ebenso wie die Applikation des Extraktes, welches von Bakterien stammte, die einen *knockout* in der Synthese beider Biotenside (Rh1a-/Syf-) aufwiesen (Effekt: $0,97 \pm 0,14$).

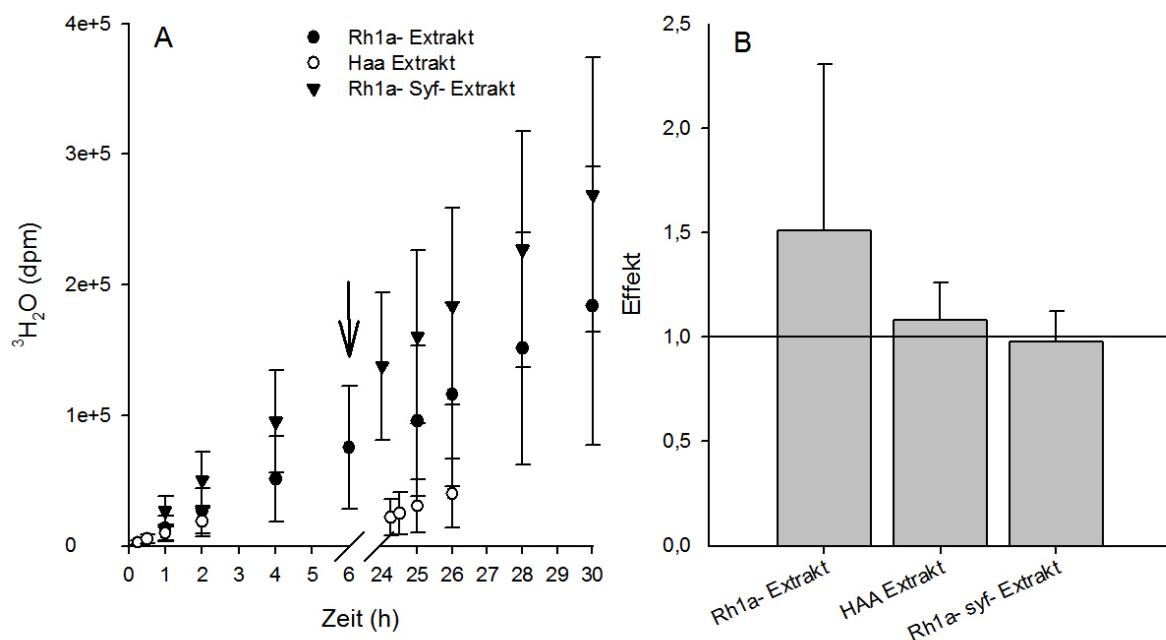


Abbildung 64: Gemittelte Kinetiken und Effekte auf die Transpiration der mit auf gereinigten Extrakten behandelten *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen über 100 % Luftfeuchte

A: *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen behandelt mit auf gereinigten Extrakten, B: zu A zugehörige Effekte der Behandlung. Der letzte Messpunkt vor der Achsenunterbrechung ist der Zeitpunkt der Behandlung (Pfeil).

3.3.4.4 Einfluss tensidproduzierender Bakterien auf die Transpiration von *Populus canescens* Kutikulamembranen

Je fünf isolierte *Populus canescens* Kutikulamembranen wurden nach einer zweistündigen Messung der Anfangstranspiration mit 100 µl der WT-, bzw. Syf-Bakteriensuspension behandelt. Die Applikation der Syf- Bakteriensuspension diente dabei als Negativkontrolle zur WT Applikation. Die Bakteriensuspensionen wurden im Gegensatz zu den Versuchen an isolierten *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen nicht in Phosphatpuffer angesetzt, sondern in *Aqua demin.* Dies sollte verhindern, dass die gemessenen Effekte von dem Phosphatpuffer stammten. Nach der Behandlung mit der WT-Bakteriensuspension stieg die Transpiration an (Effekt: $2,38 \pm 1,8$). Die Applikation der Syf- Bakterienapplikation hat keinen Effekt ($0,94 \pm 0,14$) auf die Transpiration von *Populus canescens* Kutikulamembranen (Abbildung 65 A+B).

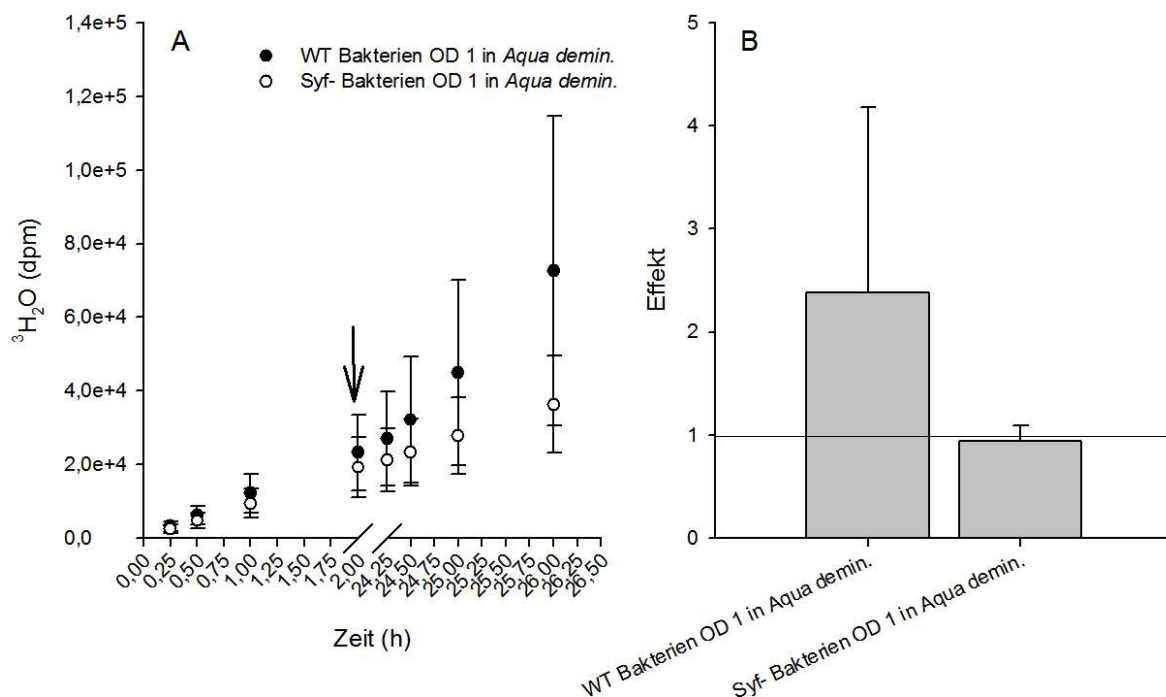


Abbildung 65: Gemittelte Kinetiken und Effekte auf die Transpiration der mit Bakterien behandelten *Populus canescens* Kutikulamembranen über 100 % Luftfeuchte

A: *Populus canescens* Kutikulamembranen behandelt mit WT und Syf-Bakteriensuspensionen der OD 1, B: zu A zugehörige Effekte. Der letzte Messpunkt vor der Achsenunterbrechung ist der Zeitpunkt der Behandlung (Pfeil).

3.3.4.5 Einfluss von Bakterienüberständen auf die Transpiration von *Populus canescens* Kutikulamembranen

Um den Effekt der Bakterienüberstände nach Zentrifugation der Bakteriensuspensionen auf *Populus canescens* Kutikulamembranen messen zu können, wurden unterschiedliche experimentelle Ansätze gewählt. Es wurde nur zwischen dem Ansatz in Phosphatpuffer und *Aqua demin* unterschieden. In dem ersten experimentellen Ansatz wurden *Populus canescens* Kutikeln mit WT und Syf- Bakterienüberständen in Phosphatpuffer behandelt. Der Syf- Überstand diente dabei als Negativkontrolle zur WT Applikation. Als zusätzliche Kontrolle diente die Applikation von reinem Phosphatpuffer auf die isolierten Kutikulamembranen. Ein Anstieg in der Transpiration konnte nach allen Behandlungen verzeichnet werden (Abbildung 66). Den größten Effekt auf die Transpiration hatte die Applikation von reinem Phosphatpuffer (Effekt: $5,22 \pm 1,37$). Die Applikation der in Phosphatpuffer gelösten WT und Syf- Überstände wiesen annähernd denselben Effekt auf (Effekt WT Überstand: $4,76 \pm 1,78$; Effekt Syf- Überstand: $4,38 \pm 1,99$). Da die Transpiration nach der Applikation des Phosphatpuffers anstieg, wurde in einem zweiten Ansatz der Effekt von Bakterienüberständen in *Aqua demin* untersucht (Abbildung 67).

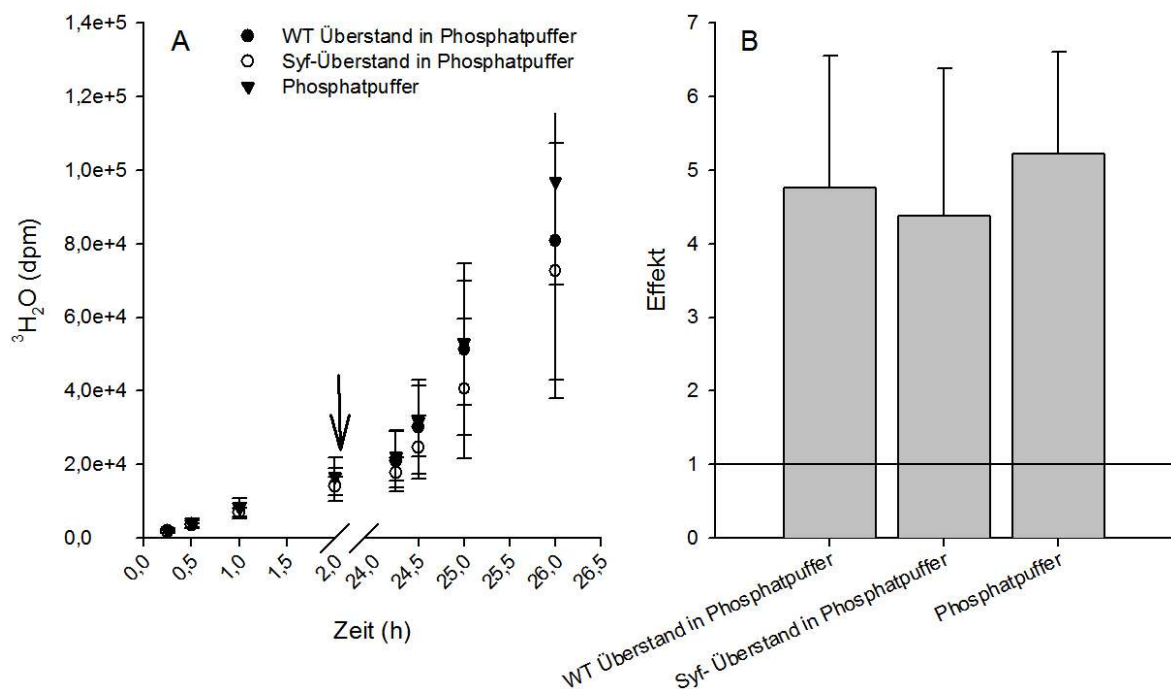


Abbildung 66: Gemittelte Kinetiken und Effekte auf die Transpiration der mit Überständen behandelten *Populus canescens* Kutikulamembranen über 100 % Luftfeuchte

A: *Populus canescens* Kutikulamembranen behandelt mit Bakterienüberständen in Phosphatpuffer, B: zu A zugehörige Effekte. Der letzte Messpunkt vor der Achsenunterbrechung ist der Zeitpunkt der Behandlung (Pfeil).

Populus canescens Kutikulamembranen wurden nach der zweistündigen Messung der Anfangstranspiration mit 100 µl des WT, Syf- und Dbl Ko- Überstands in *Aqua demin* behandelt. Die Applikation des Dbl Ko- Überstandes diente sowohl für die WT, als auch für die Syf- Applikation neben *Aqua demin* als Negativkontrolle. Es ist zu erkennen, dass die Behandlung (letzter Messpunkt vor der Achsenunterbrechung) der Kutikulamembranen zu keinem Anstieg in der Transpiration führte (Abbildung 67 A). Die Kinetiken verlaufen linear weiter bzw. flachen ab. Die Applikation von *Aqua demin* hatte mit $0,94 \pm 0,13$ den geringsten Effekt auf die Transpiration, gefolgt von der Applikation des Dbl Ko- Überstandes (Effekt: $1,14 \pm 0,11$). Die Applikation des WT Überstandes hatte einen Effekt von $1,16 \pm 0,11$ auf die Transpiration.

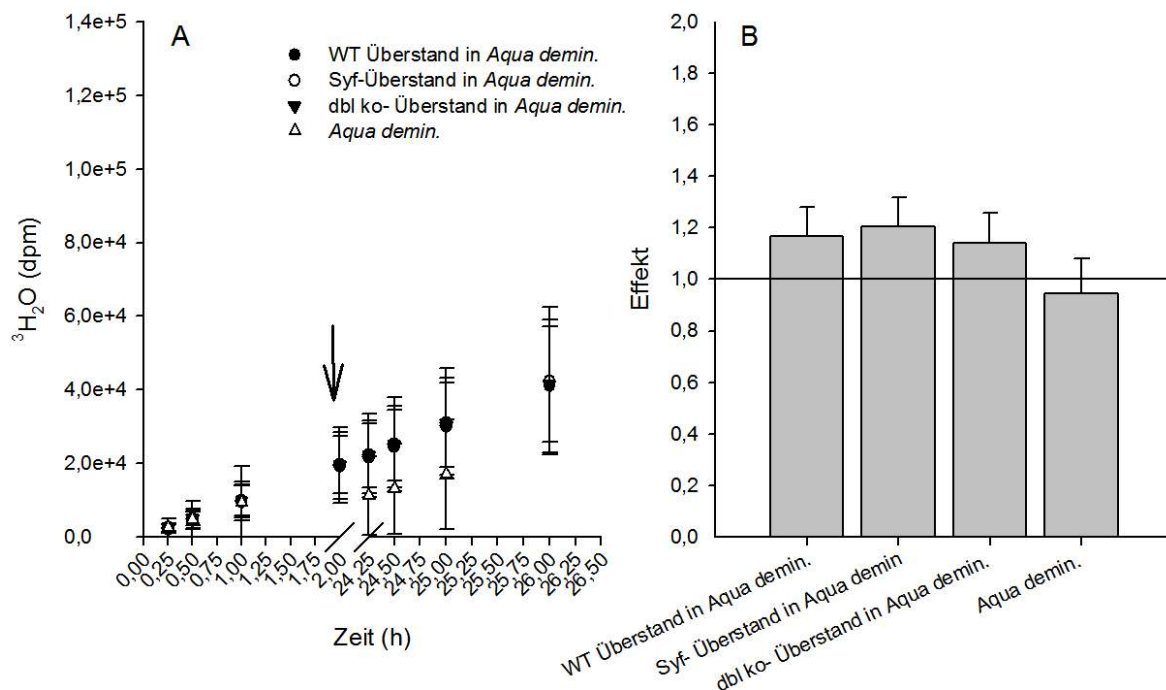


Abbildung 67: Gemittelte Kinetiken und Effekte auf die Transpiration der mit Überständen behandelten *Populus canescens* Kutikulamembranen über 100 % Luftfeuchte

A: *Populus canescens* Kutikulamembranen behandelt mit Bakterienüberständen in *Aqua demin*, B: zu A zugehörige Effekte. Der letzte Messpunkt vor der Achsenunterbrechung ist der Zeitpunkt der Behandlung (Pfeil).

4 Diskussion

4.1 Oberflächencharakterisierung ausgewählter Nutzpflanzen

Pflanzenarten unterscheiden sich in ihrer Wachszusammensetzung. Schon innerhalb einer Pflanzenart kann die Wachszusammensetzung zwischen verschiedenen Organen (Stängel, Frucht, Blüte und Blatt), aber auch innerhalb eines Organs (Blattober- und Blattunterseite) variieren (Gülz, 1994; Buschhaus und Jetter, 2012). Des Weiteren kann sich der Wachsgehalt quantitativ und qualitativ bei Blättern unterschiedlichen Alters unterscheiden (Rhee *et al.*, 1998; Jetter und Schäffer, 2001). Oberflächenwachse können verschiedene Strukturen ausbilden. Ihre Struktur als ebener Wachsfilm oder als Kristalle, wurde in der Vergangenheit intensiv durch mikroskopische Studien (SEM) untersucht (Jeffree, 1986). Durch Korrelationen aus der Kombination von analytischen und mikroskopischen Untersuchungen konnten Vorhersagen über die Zusammensetzung von Wachsen aufgrund ihrer dreidimensionalen Kristallstruktur gemacht werden. Maken primäre Alkohole z.B. einen hohen Anteil am Wachs aus, so weisen die Wachse häufig eine Plattenstruktur auf (Jeffree, 1986). Die Struktur und chemische Zusammensetzung der Wachse hat einen großen Einfluss auf die Benetzungsfähigkeit der Blätter. Durch Kontaktwinkelmessungen können Arten mit unterschiedlicher Wachszusammensetzung auf ihre Benetzungsfähigkeit hin untersucht werden. Der Kontaktwinkel hängt zum einen von der Topographie (Ensikat *et al.*, 2012) und zum anderen von der obersten Atomlage der Oberfläche ab (Koch und Barthlott, 2009). Da sich die Wachszusammensetzung der Blätter jahreszeitlich und während der Ontogenese verändert, ist auch eine damit einhergehende Veränderung des Kontaktwinkels zu erwarten (Schreiber, 1996; Knoll und Schreiber, 1998). Der polare Wassertropfen spreitet auf einer polaren Oberfläche (kleiner Kontaktwinkel), auf einer apolaren Oberfläche hingegen zeigt der Wassertropfen eine runde, kugelige Form (großer Kontaktwinkel). Trichome auf den Blattoberflächen haben ebenfalls Auswirkungen auf den Kontaktwinkel. Tropfen sitzen kugelförmig auf den Spitzen der Haare auf (Hall *et al.*, 1997). Die chemische Untersuchung der Oberflächenwachse, die morphologische Beschreibung der Oberflächenstrukturen und die Messung der Benetzungsfähigkeit von Blättern verschiedenster Arten sind insbesondere für die Landwirtschaft von großem Interesse. Diese Ansätze sind für das Verständnis der Prozesse der Wirkstoffapplikation (Herbizide, Fungizide und Insektizide) und Aufnahme über die Kutikula in die Kulturpflanze wichtig. Herbizide weisen unterschiedliche Wirkungen und Strukturen auf. Ein großer Teil der in der Landwirtschaft eingesetzten Herbizide wirken als Photosynthesehemmer (Draber *et al.*, 1991). Sie hemmen den Elektronentransport und die Sauerstoffentwicklung, was zum Absterben der Unkräuter führt.

Um die Oberflächenbeschaffenheit von vier Kulturpflanzen zu beschreiben und sie in ihrer Aufnahmefähigkeit eines Herbizids vergleichen zu können, wurde eine morphologische, anatomische und physiologische Untersuchung der intakten Blätter durchgeführt. Die dafür benötigten Versuchsansätze umfassten chemisch-analytische, rasterelektronenmikroskopische, sowie Kontaktwinkelmessungen und transportphysiologische Untersuchungen.

4.1.1 Verwendetes Blattmaterial und morphologische Beschreibung der Pflanzen

Durch die Verwendung der vier unterschiedlichen Arten ist das Spektrum von feinen (*Solanum lycopersicum* und *Malus domestica*) zu robusten Blättern (*Solanum tuberosum* und *Vitis vinifera*) abgedeckt. Die Blattfläche der jungen Blätter war ausgenommen bei *Solanum tuberosum* größer als die der alten Blätter. Bei *Solanum tuberosum* und *Solanum lycopersicum* war die Trichomdichte sehr hoch und mit bloßem Auge erkennbar. Bei *Vitis vinifera* und *Malus domestica* war sie im Vergleich zu den erstgenannten Arten schwächer. Trichome werden durch die Epidermis gebildet und können uni- oder multizellulär sein (Kang *et al.*, 2010). Sie spielen eine große Rolle bei dem Schutz vor Insekten, aber auch bei dem Schutz vor abiotischen Faktoren wie hohen Temperaturen (Martin und Glover, 2007). Die Behaarung von Blattoberflächen spielt weiter eine wichtige Rolle bei Benetzungsprozessen (Interaktion Flüssigkeit/Oberfläche) und der Aufnahme von Wirkstoffen ins Blatt. Ein Luftfilm, der sich zwischen den Haaren bildet, führt zu einer erschwerten Aufnahme eines Wirkstoffes. Der Wirkstofftropfen würde auf den Haaren sitzen und abrollen (Koch und Barthlott, 2009) oder der Wirkstoff könnte sogar wie im Fall von Tomate in die Haare inkorporiert werden. Bei Tomatenblättern sind zwei Arten von Trichomen bekannt. Neben den toten Haaren, die eher der Abwehr von Insekten, der Temperaturregulierung und dem Schutz vor UV-Strahlung dienen, ist bei Tomate eine weitere Art von Trichomen bekannt, die als Drüsenhaare beschrieben werden (Wagner, 1991). Diese Trichome enthalten in dem endständigen Segment lipophile Triterpene, meist Mono- und Sesquiterpene, die wahrscheinlich der chemischen Abwehr von Insekten dienen (Schillmiller *et al.*, 2009). Eine erhöhte Ionenpermeabilität konnte auch an den Kutikulabereichen, die die Trichome an der Basis umgeben, gezeigt werden (Schönherr, 2006). An diesen Stellen scheint die Kutikula eine veränderte Zusammensetzung zu zeigen, die sich auch auf die Aufnahme von Wirkstoffen auswirken kann. Um Aufnahmeprozesse von Agrochemikalien in verschiedenen alten Blättern innerhalb einer Art, oder auch zwischen verschiedenen Arten verstehen und deuten zu können, ist es wichtig, morphologische, anatomische und physiologische Unterschiede zu erkennen und diese in die Deutung der Ergebnisse mit einzubeziehen.

4.1.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Die vier Pflanzenarten und ihre unterschiedlich alten Blätter wurden auf ihre Oberflächenstrukturen hin mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen haben bei *Solanum tuberosum* und *Solanum lycopersicum* gezeigt, dass sowohl auf der Blattober- als auch auf der Blattunterseite Stomata lokalisiert sind (Abbildung 15, Abbildung 17). Die die Schließzellen bedeckende Kutikula ist ebenfalls, wie der Rest der Kutikula, mit einer Wachsschicht überzogen, welche vor Wasserverlust schützen soll (Lemieux, 1996). Im Raster sind die Stomata geschlossen und an manchen Stellen treten Trocknungsartefakte auf, die auf die Probenvorbereitung im Unterdruck zurückzuführen sind. Eine schonendere Alternativmethode ist die Cryo-SEM Methode, die auch die Betrachtung von dreidimensionalen Strukturen wie z.B. Trichomen ermöglicht (Kang *et al.*, 2010), hier aber nicht zur Verfügung stand. Die schon mit bloßem Auge erkennbaren Haare bestehen aus drei Segmenten (Abbildung 16, Abbildung 19), die durch eine Verankerung mit der Blattoberfläche verbunden sind. Die Form der Oberflächenwachse der beiden Arten ähnelt Platten, die teilweise auch zu einem Wachslayer miteinander verschmelzen. Diese Platten brechen an manchen Stellen als raue Kanten auf. Die Struktur der Oberflächenwachse ist von der chemischen Zusammensetzung abhängig (Gülz, 1994; Lemieux, 1996) und kann sich während der Ontogenese (Bringe *et al.*, 2006) als auch unter Einfluss wechselnder Umweltbedingungen verändern (Baker, 1974).

Bei Blättern der Arten *Vitis vinifera* (Abbildung 20, Abbildung 21) und *Malus domestica* Blättern (Abbildung 22, Abbildung 23) sind die Stomata nur auf der Unterseite zu finden. Auch bei diesen Arten sind die Wachse in einer Plattenform angeordnet, die zum Teil zu scharfen Kanten aufbricht oder durch einzelne Kristalle unterbrochen wird. Bei den kristallartigen Strukturen kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie anorganischer Natur sind und eventuell aus dem Bewässerungswasser stammen. Unterscheidet man zwischen den unterschiedlichen Altersstadien der Blätter, so sind bei jungen *Vitis vinifera* Blättern Kutikularfalten zu erkennen, deren Bedeutung für Wachstum des Blattes zu erklären ist (Bringe *et al.*, 2006), da sie während der Expansion zu einer Oberflächenvergrößerung der Kutikula beitragen. Untersuchungen dazu erklären das Vorkommen der Kutikularfalten als ein Reservoir für Kutikulabestandteile, die kontinuierlich an die Oberfläche des Blattes diffundieren und somit für das Flächenwachstum zur Verfügung stehen. Ist das Blatt ausgewachsen, werden diese Falten weniger, oder verschwinden ganz (Rosenquist und Morrison, 1988).

Das Abnehmen der Kutikularfaltung von jungen zu alten Blättern konnte durch die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung an Wein gezeigt werden (Abbildung 21, Abbildung 20).

Die Struktur der Oberflächenwachse und ihre chemische Zusammensetzung spielt ferner eine große Rolle bei der Reflektion von UV-Strahlung (Reicosky und Hanover, 1978), aber auch bei den Benetzungseigenschaften der Blätter, die für die Aufnahme von Agrochemikalien über die Kutikula ins lebende Blatt ausschlaggebend sind (Adamson, 1960).

4.1.3 Chemisch analytische Untersuchungen der Blattoberflächenwachse

Wachse sind in organischen Lösungsmitteln löslich und bestehen aus linear langkettigen Aliphaten und zyklischen Substanzen wie Triterpenen. Chloroform eignet sich als besonders gutes Lösungsmittel, da es sowohl die polareren, als auch die apolareren Wachsbestandteile gleichermaßen herauslöst (Riederer und Schneider, 1989). Die Totalextraktion von pflanzlichem Blattmaterial (isolierte Kutikula/intaktes Blatt) in Chloroform unterscheidet nicht nach einer Lokalisation der Wachse in bzw. auf dem Kutinpolymer und der damit einhergehenden Einteilung in epi- und intrakutikuläre Wachse (Jetter *et al.*, 2000). Um ein chemisches Tiefenprofil der Wachse erstellen zu können und diese Ergebnisse mit Kontaktwinkelmessungen zu korrelieren, ist das selektive Entfernen und Analysieren der Oberflächenwachse von Nöten. Dies wurde durch sukzessives Abheben der Wachse von *Solanum tuberosum*, *Vitis vinifera* und *Malus domestica* mit Kollodium erreicht. Spektroskopische Untersuchungen haben zeigen können, dass die Verteilung einzelner Substanzklassen in und auf der Kutinmatrix nicht homogen ist (Buschhaus *et al.*, 2007; Weissflog *et al.*, 2010). Auch die Wachszusammensetzung der Blattober- und Blattunterseiten desselben Blattes kann quantitative, als auch qualitative Unterschiede aufweisen (Buschhaus und Jetter, 2012). Dies ist durch unterschiedliche Funktionen des Blattes (Kutikula mit und ohne Stomata) zu erklären und spiegelt erneut die Heterogenität des Lebensraums Blatt wider. Neben den unterschiedlichen Wachszusammensetzungen von Blattober- und Blattunterseiten sind ebenfalls Unterschiede in der Wachszusammensetzung während der Ontogenese eines Blattes (Schneider, 1990) oder auch während einer jahreszeitlichen Entwicklung zu beobachten (Markstädter, 1994).

Bei den Arten *Solanum lycopersicum* und *Solanum tuberosum* ist wenig über die Wachszusammensetzung der Blätter bekannt. Vielmehr findet man für diese wichtigen Nutzpflanzen umfangreiche Daten zu der Wachszusammensetzung der Tomatenfrucht (Vogg *et al.*, 2004) und der Kartoffelknolle (Schreiber *et al.*, 2005a). Das durch die Extraktion ganzer Kartoffel- und Tomatenblätter in Chloroform erhaltene Wachs weist kein breites

Substanzklassenspektrum auf (Abbildung 24, Abbildung 30). Es besteht bei beiden Arten zum größten Teil aus langkettigen (n-Alkanen) und verzweigten Alkanen (iso- und anteiso-Alkane). Das Kartoffelwachs wies neben Alkanen auch polare Substanzen wie Alkohole und Säuren auf, die in dem Tomatenwachs vollkommen fehlten. Sekundäre Alkohole und Ketone sind in geringen Mengen in der Literatur zusätzlich als Bestandteil des Kartoffelwachses beschrieben (Szafranek und Synak, 2006), konnten in den hier durchgeführten Analysen aber nicht gefunden werden. Dies kann durch Unterschiede im experimentellen Ansatz erklärt werden. Bei dem in der Literatur beschriebenen Ansatz wurde 100 g Blattmaterial von Feldpflanzen verwendet. In den hier durchgeführten gaschromatographischen Analysen wurde vergleichsweise wenig Material (6 mg) von Gewächshauspflanzen untersucht. Auch bei der Probenvorbereitung und Verarbeitung sind klare Unterschiede zu erkennen. Neben der gaschromatographischen Untersuchung wurden ferner Ansätze mit HPLC und Vergleiche mit extra synthetisierten Standards durchgeführt. Bei dem Vergleich von Daten und der Interpretation von Ergebnissen ist immer auch eine Einbeziehung der eingesetzten Pflanzenmenge und der Vergleich der angewandten Methoden mit zu berücksichtigen.

Bei beiden *Solanum* Arten konnten neben den klar identifizierbaren Substanzen weitere Substanzen gefunden werden, die in dieser Arbeit als nicht-identifizierte Substanzen X beschrieben wurden (Abbildung 24, Abbildung 30). Die Menge dieser Substanzen war in den Proben, erhalten durch das Eintauchen der Gesamtblätter in organischem Lösungsmittel, höher als durch die Verwendung der Rollrandgläschen für die einseitige Extraktion. Arbeiten mit *Solanum lycopersicum* haben gezeigt, dass sich in den als *glandular trichomes* beschriebenen Haaren verschiedene Metabolite wie Mono- und Sesquiterpene, aber auch Zuckerester befinden, die der chemischen Abwehr von Insekten dienen (Goffreda *et al.*, 1990; Kang *et al.*, 2010). Diese Substanzen sind durchaus auch in organischen Lösungsmitteln löslich und werden partiell mitextrahiert. Durch das Eintauchen in organischem Lösungsmittel oder das Aufbringen des Rollrandgläschens auf die Blattoberfläche und einer eventuellen Verletzung des Drüsenkopfes könnten diese Substanzen freigesetzt worden sein. Dass die Menge dieser Substanzen in der Gesamtwachsmenge (Eintauchen eines kompletten Blattes in Chloroform) größer ist als in den selektiven Proben der Ober- und Unterseite, könnte sich dadurch erklären lassen, dass die Anzahl der extrahierten Trichome bei der Gesamtwachsprobe höher ist als bei den Proben der Blattober- und Unterseiten. Bei der selektiven Extraktion der Wachse mit der Rollrandglasmethode musste darauf geachtet werden, dass Regionen wie die Blattnervatur ausgespart wurden. Regionen der Blattadern wiesen eine besonders hohe Trichomdichte auf. Ein Aufbringen des Rollrandgläschens auf diese Stellen wurde vermieden, da die erhabenen Blattadern dazu geführt hätten, dass das organische Lösungsmittel aus dem Glas läuft. Die Wachsextraktion über eine definierte Fläche wäre somit ausgeschlossen.

Tendenziell weisen alte Kartoffelblätter einen höheren Wachsgehalt auf als Jüngere. Vergleicht man die Substanzklassenverteilung der Blattober- und Unterseite bei jungen und alten Kartoffelblättern, so ist eine klare Diskriminierung in der Substanzverteilung aber nicht in der Kettenlängenverteilung zu erkennen. Langkettige Alkane und polare Substanzen wie die Säuren und Alkohole sind vermehrt auf der Blattoberseite zu finden, verzweigte Alkane dagegen vermehrt auf der Blattunterseite. Die Wachsmenge und Zusammensetzung innerhalb einer Spezies kann genauso variieren wie zwischen verschiedenen Arten (Riederer und Markstadter, 1996). Eine ungleiche Verteilung der Substanzen auf Blattober- und Blattunterseite kann zum einen durch unterschiedlich wirkende biotische und abiotische Faktoren, zum anderen durch unterschiedliche Enzymaktivitäten erklärt werden (Gülz, 1994). Um ein Tiefenprofil der Wachse erstellen zu können, musste eine alternative Methode zur Lösungsmittelextraktion gefunden werden. Diese Methode musste eine schichtweise, mechanische Entfernung der Oberflächenwachse erlauben, ohne dabei das Gewebe zu verletzen. Der Ansatz konnte nicht an Tomatenblättern erfolgen, da die filigrane Struktur der Blätter und die hohe Zahl der Trichome zum Reißen der Epidermis der Blätter führte. Die Oberseite von alten und jungen Kartoffelblättern wurden zwei Mal in Folge mit Kollodium behandelt und die Stripps analytisch untersucht. Die größte Menge an Oberflächenwachsen konnte durch die erste Behandlung mit Kollodium von der Oberfläche entfernt werden (Abbildung 27). Dies stimmt sowohl mit eigenen vorangegangenen Untersuchungen (Zeisler, 2010), als auch mit Literaturdaten überein (Jetter *et al.*, 2000). Der zusätzliche Wachsgehalt, der mit der zweiten Behandlung abgehoben werden konnte ist im Vergleich zur ersten geringer und deutet darauf hin, dass eine mechanische Barriere, das Kutingerüst, erreicht wurde.

Der Vorgang der selektiven Wachsentfernung beruht auf einem rein mechanischen Prinzip. Rasterelektronenmikroskopische Ansätze haben gezeigt, dass die Oberfläche nach der Behandlung glatt erscheint. Auch die Betrachtung eines abgelösten Stripps macht deutlich, dass sich Kollodium auf der Oberfläche in alle Erhebungen und Einsenkungen des Blattes einfindet, so dass eine Art *fingerprint* des Blattes entsteht. Mit der ersten Behandlung von alten und jungen Kartoffelblättern konnten sowohl polare Substanzen wie Säuren und Alkohole, aber auch apolare Substanzen wie langkettige Alkane von der Oberfläche entfernt werden. Bei jungen Kartoffelblättern konnten nach der ersten Behandlung der Oberfläche zusätzlich zu den bereits genannten Substanzen auch Sterole in signifikanten Mengen abgehoben werden. Sterole sind Membranbestandteile (Nes, 1974). Das Auffinden von Sterolen in den Stripps von jungen Blättern könnte auf eine mechanische Verletzung des feinen Blattmaterials oder der Beschädigung lebender Trichome hinweisen. Der Anteil der verzweigten anteiso- und iso-Alkane ist im Vergleich zu den anderen Substanzen viel geringer (Abbildung 28). Dies kann dadurch erklärt werden, dass die verzweigten Alkane

vermehrt auf der Blattunterseite lokalisiert sind. Eine Diskriminierung der Kettenlängen ist nicht zu erkennen. Sowohl kurzkettige, als auch langkettige Substanzen wurden durch das Strippen entfernt. Dieses Ergebnis stimmt mit den Chloroformextrakten der Blattoberseite mit Hilfe der Rollrandgläser überein.

Im Vergleich zu den beiden *Solanum* Arten weist das Wachs von *Vitis vinifera* und *Malus domestica* ein breiteres Substanzklassenspektrum auf (Abbildung 33, Abbildung 39). Bei *Vitis vinifera* wurde vor allem die Wachszusammensetzung der Beeren untersucht. Die Charakterisierung der Beerenoberfläche und die Ummantelung der Beeren mit Stoffen, die die Lagerungsfähigkeit erhöhen sind dabei von Bedeutung (Radler, 1965; Rosenquist und Morrison, 1988; Casado und Heredia, 1999). Literaturangaben zur Charakterisierung der Oberfläche von Weinblättern sind dagegen sehr rar und beziehen sich meist auf rasterelektronenmikroskopische (Bensalem-Fnayou *et al.*, 2009) und weniger auf analytische Untersuchungen.

Neben langkettigen Aliphaten wie Säuren, Alkoholen, Alkanen, Aldehyden, Ketonen und Estern konnten bei *Vitis vinifera* auch zyklische Bestandteile wie Sterole und Triterpene durch die Rollrandglasmethode gefunden werden (Abbildung 34). Auch die Betrachtung der Kettenlängenverteilung macht deutlich, dass das *Vitis vinifera* Blattwachs, im Vergleich zu dem der *Solanum* Arten komplexer aufgebaut ist. Tendenziell weisen alte *Vitis vinifera* Blätter eine höhere Wachsmenge auf als Junge. Bei Betrachtung der Substanzklassenverteilung auf der Ober- oder Unterseite alter und junger Weinblätter fällt auf, dass polare Substanzen wie Säuren, Alkohole und Aldehyde vermehrt auf der Oberseite und apolare Alkane vermehrt auf der Blattunterseite lokalisiert sind. Eine unterschiedliche Verteilung von polaren und apolaren Substanzen sollte sich auf die Benetzungseigenschaften des Blattes auswirken. Ein vermehrtes Vorkommen von apolaren Substanzen auf der stomatären Blattseite (Blattunterseite) könnte die bei *Vitis vinifera* beobachtete schlechtere Benetzung der Oberfläche erklären. Eine Infiltration der Stomata würde so verhindert (Schönherr und Bukovac, 1972). Die Erstellung eines Tiefenprofils konnte bei *Vitis vinifera* durch ein zweimaliges Behandeln der Blattoberseite mit Kollodium erreicht werden (Abbildung 36). Mit der ersten Behandlung der Oberfläche konnte erneut die größte Menge an Oberflächenwachsen entfernt werden. Diese Menge, aber auch die Gesamtwachsmenge ist bei alten Blättern höher als bei Jungen. Der Anteil an entfernten Wachsen zur Gesamtwachsmenge ist demnach bei alten und jungen Blättern in etwa gleich. Die Menge an Triterpenen, die durch die Kollodiumbehandlung von der Oberfläche von alten Weinblättern entfernt werden konnte, ist im Vergleich zu der Menge nach Chloroformextraktion signifikant niedriger (Abbildung 37). Dies bestätigt die Beobachtung bei anderen Arten, dass Triterpene in tieferen Schichten lokalisiert sind und bevorzugt zu den intrakutikulären Wachsen gehören (Jetter *et al.*, 2000). Dass der Anteil an Triterpenen bei den jungen Blättern signifikant

geringer ist als bei alten Blättern, ist durch die Veränderung der Wachszusammensetzung während der Ontogenese zu erklären.

Die Betrachtung der Kettenlängenverteilung macht deutlich, dass mit der ersten Behandlung vor allem kurzkettige Moleküle und nur wenige Langkettige von der Blattoberfläche von *Vitis vinifera* entfernt werden konnten (Abbildung 38). Dies könnte durch die Molekülgröße zu erklären sein. Ester mit einer Kettenlänge ≥ 40 , aber auch zyklische Triterpene könnten aufgrund ihrer Molekülgröße sterisch daran gehindert werden, schnell an die Oberfläche zu diffundieren. Kurzkettigere Moleküle mit größeren Diffusionskoeffizienten könnten hingegen schneller an die Oberfläche diffundieren (Schreiber und Schönherr, 2009), was ihren erhöhten Anteil in den Kollodiumstripps erklären würde.

Malus domestica weist mit 32 Einzelsubstanzen neben *Vitis vinifera* ein großes Substanzklassenspektrum auf (Abbildung 39). Im Gegensatz zum Wein ist die Gesamtwachsmenge alter Apfelblätter geringer als das der jungen Blätter. Dies stimmt mit Literaturangaben überein, wo Apfelblätter verschiedenen Alters chemisch analytisch untersucht wurden. Eine Abnahme des Gesamtwachsgehaltes während der Ontogenese des Blattes kann durch die Oberflächenvergrößerung der Kutikula erklärt werden (Bringe *et al.*, 2006). Alte und junge Apfelblätter zeigten eine unterschiedliche Wachszusammensetzung. Bei jungen Blättern machten die Triterpene den größten Anteil am Wachs aus. Sollten Triterpene eine antimikrobielle Wirkung aufweisen (Singh *et al.*, 2002) oder gar dem Schutz vor Herbivoren dienen, so ist dies besonders bei den dünnen, noch nicht vollständig entwickelten Blättern von Nöten. Triterpene konnten bei *Malus domestica* vornehmlich auf der Blattunterseite gefunden werden. Da sich bei *Malus domestica* die Stomata auf der Blattunterseite befinden, ist ein besonderer Schutz durch die Akkumulation von antimikrobiellen Wirkstoffen sinnvoll, die das Ansiedeln und Eindringen von Bakterien durch die Stomata ins Blatt verhindern könnten. Eine klare Differenzierung von Substanzklassen unterschiedlicher Länge auf Blattober- oder Blattunterseite konnte nicht nachgewiesen werden. Wie auch bei der Gesamtwachsanalyse junger und alter Blätter konnte bei der selektiven Entfernung der Oberflächenwachse eine erhöhte Menge an Wachsen pro Fläche bei jungen Blättern abgehoben werden (Abbildung 42). Es wurden sowohl polare Substanzen wie Säuren und Alkohole als auch unpolare Komponenten wie Ketone von der Oberfläche entfernt. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von *Vitis vinifera* konnten nach der mechanischen Behandlung der Oberfläche mit Kollodium kaum Triterpene entfernt werden. Dies bestätigt erneut ihr Vorkommen in tieferen Schichten der Kutikula. Der hohe Anteil an langkettigen Aliphaten, der nicht durch die selektive Behandlung entfernt werden konnte, spricht dafür, dass die langkettigen Aliphaten sowohl Bestandteil der epikutikulären als auch intrakutikulären Wachse darstellen (Jetter *et al.*, 2000). Auch bei *Malus domestica* könnten langkettige Ester und Triterpene aufgrund ihrer Molekülgröße in tieferen Schichten

des Kutins gefangen und ihre Diffusion an die Oberfläche dadurch verhindert sein. Daher konnten sie nur in geringen Mengen durch die mechanische Behandlung der Oberfläche entfernt werden (Abbildung 44).

4.1.4 Benetzungseigenschaften

Verschiedene Pflanzenorgane innerhalb einer Art als auch dieselben Organe verschiedener Arten zeigen unterschiedliche Benetzungseigenschaften (Holloway, 1970). Pflanzenoberflächen werden je nach Größe des gemessenen Kontaktwinkels in benetzbare und unbenetzbare Pflanzen eingeteilt. Ein Kontaktwinkel von 0° entspricht einer totalen Benetzung der Oberfläche. Ein Kontaktwinkel von mehr als 180° deutet auf eine vollkommen unbenetzbare Oberfläche hin. Diese Einteilung ist auf Messungen mit künstlichen Polymeren zurückzuführen und nur mit Vorsicht auf pflanzliche Oberflächen übertragbar (Barthlott und Neinhuis, 1997). Die Benetzungseigenschaften unterschiedlich alter Blätter verschiedener Arten wurden visuell durch das Aufbringen eines Wassertropfens auf die Blattoberfläche als auch durch Messung des Kontaktwinkels untersucht. Es wurde dabei nicht nur die Blattoberseite betrachtet sondern auch die Unterseite, da die Applikation von Wirkstoffen in der Landwirtschaft bei Wein und Apfel auf beiden Seiten erfolgt. Bei reiner Betrachtung des Spreitungsverhaltens eines Wassertropfens auf der Ober- und Unterseite beider Arten fiel auf, dass tendenziell alle Blattunterseiten schlechter benetzbar waren als die Oberseiten (Abbildung 45). Benetzungseigenschaften von Blättern hängen zum einen von der chemischen Zusammensetzung und der Struktur der Wachse (Holloway, 1970; Bringe *et al.*, 2006), zum anderen von nicht wachsartigen Oberflächenstrukturen wie beispielsweise Trichomen ab (Koch und Barthlott, 2009).

Die *Solanum* Arten weisen eine sehr hohe Trichomdichte auf, die auf der Blattunterseite höher ist als auf der Blattoberseite. Die regelmäßige Anordnung der Haare und das Vorkommen eines Luftfilms zwischen den Haaren erklärt die schlechte Benetzung der Blattunterseiten (Bhushan *et al.*, 2008). Eine bessere Benetzung der Blattoberseite kann durch beschleunigte Erosion der Wachse durch einwirkende Umweltfaktoren (Regen, Licht...) erklärt werden. Das unter der Wachsschicht liegende Kutingerüst ist aufgrund der vorhandenen Säuregruppen (Schreiber und Schönherr, 2009) deutlich polarer als das Wachs, was zu einer besseren Benetzbarkeit der Blattoberseite führen könnte. Um diese rein durch visuelle Betrachtung erhaltenen Ergebnisse unabhängig verifizieren zu können, wurden Kontaktwinkelmessungen durchgeführt. Bei der Betrachtung der Werte fällt die hohe Standardabweichung auf. Kontaktwinkelmessungen stammen aus der Oberflächenphysik und werden häufig zur Charakterisierung synthetischer Polymere, die vollkommen planar sind, angewendet (Adamson, 1960). Übertragen auf die heterogene Oberfläche eines Blattes kann der Wert des Kontaktwinkels je nach gemessener Stelle und Blattmorphologie stark

variieren. Diese Variation ist nicht nur bei dem Vergleich von Messungen an verschiedenen Blättern zu erkennen sondern auch bei Messungen verschiedener Regionen eines Blattes. Eine neue Herangehensweise an Kontaktwinkelmessungen mit Zuhilfenahme von rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen könnte diese Unsicherheit in Zukunft minimieren (Ensikat *et al.*, 2012). Die Kontaktwinkelmessungen an Kartoffelblättern unterstützen die visuellen Untersuchungen und das Ergebnis, dass die Blattunterseite schlechter benetzbar ist als die Blattoberseite (Tabelle 9). Entgegen der Literatur scheint die Wachszusammensetzung hier jedoch nicht der ausschlaggebende Punkt für die Benetzungsfähigkeit zu sein. Häufig werden Blattoberseiten als hydrophober beschrieben (Holloway, 1970). Der hohe Anteil an lipophilen Alkanen auf der Blattoberseite von Kartoffelblättern unterstützt die in der Literatur bestehende Aussage. Trotzdem sind die Blätter mit einem recht kleinen Kontaktwinkel gut benetzbar. Die im Vergleich dazu eher schlechtere Benetzbarkeit der Unterseite ist erneut durch die hohe Dichte der Trichome zu erklären. Tendenziell weisen jüngere Kartoffelblätter eine schlechtere Benetzbarkeit auf als ältere. Veränderungen in der Benetzbarkeit während der Ontogenese können verschiedene Ursachen haben. Eine Veränderung in der Wachszusammensetzung und Struktur (Holloway, 1970) aufgrund unterschiedlicher Biosyntheseaktivität könnte eine Erklärung dafür sein. Da es sich bei den hier verwendeten Pflanzen um Gewächshauspflanzen handelte, ist eine Veränderung der Benetzung durch epiphyllie Bakterien (Knoll und Schreiber, 1998, 2000) oder Schmutzpartikel aus der Luft (Cape, 1983) auszuschließen. Im Vergleich zu *Solanum tuberosum* wiesen *Solanum lycopersicum* Blätter eine schlechtere Benetzung auf (Tabelle 10). Der Hauptgrund für die schlechte Benetzung ist erneut die Behaarung der Blätter, die bei *Solanum lycopersicum* noch stärker ausgeprägt ist als bei *Solanum tuberosum*. Zwischen den dicht angeordneten Trichomen bildet sich häufig ein Luftfilm aus, der zusätzlich dazu beiträgt, dass der Wassertropfen auf den Haaren sitzen bleibt oder sogar abrollt (Holloway, 1971). Die chemischen Eigenschaften der mit lipophilen Mono- oder Sesquiterpenen gefüllten *glandular trichomes* (Schillmiller *et al.*, 2009) der Tomatenblätter könnten den Effekt der Unbenetzbarkeit weiter verstärken. Wie schon bei Kartoffel ist auch die Unterseite der Tomatenblätter schlechter benetzbar als die Oberseite. Das Tomatenwachs besteht nur aus langkettigen und verzweigten Alkanen, wobei die langkettigen Alkane vermehrt auf der Blattoberseite und die verzweigten vermehrt auf der Blattunterseite lokalisiert sind. Wäre die Wachsmenge oder Zusammensetzung allein ausschlaggebend für die Benetzungsfähigkeit der Blätter, so müssten die älteren Blätter eine schlechtere Benetzung aufweisen als die Jüngeren. Dies ist aber nicht der Fall.

Bei *Vitis vinifera* Blättern konnte ebenfalls die Veränderung des Kontaktwinkels während der Ontogenese beobachtet werden (Tabelle 11). Mit zunehmendem Blattalter werden die Blattoberseiten besser benetzbar. Dies kann durch die Flächenvergrößerung des Blattes

während der Ontogenese und den damit einhergehenden physikalischen und chemischen Veränderungen der Blattoberfläche erklärt werden (Linskens, 1952). Die Blattunterseiten junger und alter *Malus domestica* Blätter sind schlechter benetzbar als die Blattoberseiten (Tabelle 12). Da sich die Stomata bei *Malus domestica* auf der Blattunterseite befinden, wäre eine schlechte Benetzung von Vorteil, um eine Infiltration der Stomata zu verhindern. Ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der durchgeführten Wachsanalyse der Ober- und Unterseiten und den gemessenen Kontaktwinkel ist nicht zu erkennen. Der größte Anteil der lipophilen Alkane und Ketone ist auf der Blattoberseite lokalisiert, was zu der Annahme führen würde, die Oberseite sei schlechter benetzbar als die Unterseite. Vielmehr scheint es die Kombination aus chemischen und physikalischen Eigenschaften zu sein, die hier erneut bei der Benetzung eine Rolle spielen.

Eine schlechte Benetzungsfähigkeit der Blätter schützt die Pflanze vor dem Nährstoffverlust durch *leaching*, d.h. der Diffusion organischer Moleküle und Ionen aus dem intakten Blatt durch die Kutikula in Richtung Blattoberfläche (Tukey, 1970). Die Struktur der Oberflächenwaxe aber auch die regelmäßige Anordnung von Papillen oder Haaren auf der Blattoberfläche kann zur vollständigen Unbenetzung des Blattes (Barthlott und Neinhuis, 1997), dem ABERLEN von Wassertropfen und der gleichzeitigen Reinigung der Oberfläche, dem so genannten Lotus-Effekt führen (Cheng *et al.*, 2006). Bei der Interpretation der gemessenen Kontaktwinkel sind neben der Berücksichtigung der chemischen Zusammensetzung der Waxe auch immer die morphologische Untersuchung der Blätter und der Vergleich zwischen verschiedenen Arten notwendig. Einzelne Regionen mit erhöhter Trichomdichte, wie beispielsweise der Blattnervatur zeigen andere Kontaktwinkel auf als trichomfreie Zonen. Die Anwendung von Kontaktwinkelmessungen bietet somit die Möglichkeit, die heterogene Blattoberfläche sehr spatial nach unterschiedlichen Benetzungseigenschaften aufzulösen. Kenntnisse über eine zeitliche aber auch räumliche Veränderung der Benetzungseigenschaften während der Ontogenese von Blättern sind besonders für den Pflanzenschutz von Interesse. Wirkstoffe sollen an oder in der Pflanze wirken. Ein Abwehen oder Abwaschen des Wirkstoffes vom Blatt durch Wind oder Regen soll verhindert werden (Zabkiewicz, 2007). Das Versetzen einer Wirkstofflösung mit Tensiden setzt die Oberflächenspannung und die Kontaktwinkel dieser Lösung herab (Schönherr und Bukovac, 1972) und ermöglicht eine wesentlich bessere Benetzung der Blattoberflächen und als Folge eine optimierte Aufnahme des Wirkstoffs in die Pflanze.

4.1.5 Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen

Photosyntheseinhibitoren werden im Pflanzenschutz als Herbizide eingesetzt. Ihr Gebrauch hat in der Vergangenheit maßgeblich zur Aufklärung der Photosyntheseabläufe und zur Aufklärung der Struktur der Photosysteme beigetragen. Bei dem Gebrauch dieser Herbizide ist eine Verringerung bzw. vollständige Hemmung der Photosynthese bei gleichzeitigem Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten (Draber *et al.*, 1991). Mit der Junior-PAM Methode kann indirekt durch Messung der Fluoreszenz die Aufnahme von Photosyntheseinhibitoren über die Kutikula gemessen werden (Schreiber *et al.*, 1996b). Diese Methode wurde hier gewählt, da sie im Gegensatz zu aufwendigen radioaktiven Messungen nicht invasiv und schnell ist. Des Weiteren war eine Methode von Nöten, die Messungen an intakten Blättern ermöglicht, da sich von *Solanum lycopersicum* und *Solanum tuberosum* keine Kutikulamembranen isolieren ließen. Um die Aufnahmemechanismen eines Stoffes über die pflanzliche Kutikula (Absorption, Diffusion und Desorption (Schönherr und Baur, 1996)) in das Blattinnere verstehen zu können, ist neben der Verwendung des artifiziellen Testsystems Kutikula auch die Verwendung von intaktem Blattmaterial wichtig, da dies die wirkliche Situation im Feld besser abbildet (Bukovac und Petracek, 1993). Mit den vier getesteten Arten wurde das Spektrum von feinen zu robusten Blättern mit geringer bis starker Behaarung abgedeckt.

Morphologische, anatomische und physiologische Blatteigenschaften wirken sich auf die Benetzungseigenschaften der Blätter aus (Cheng *et al.*, 2006) und besonders die Behaarung kann zur Retention von Wirkstoffen und zu unterschiedlichen Aufnahmeleistungen der selbigen führen (Hall *et al.*, 1997). In den durchgeführten „Aufnahmeexperimenten“ wurde das Herbizid Bentazon (BASF SE, Abbildung 12) verwendet. Unkräuter die mit Bentazon in Berührung kommen sterben, da sie im Gegensatz zur Kulturpflanze nicht so effizient darin sind, Bentazon zu 6-OH und 8-OH Bentazon umzuformen, es an Zuckermoleküle zu konjugieren und es somit zu entgiften (Huber und Otto, 1994). Um die Kulturpflanzen in der Landwirtschaft zusätzlich selektiv schützen zu können, werden den Herbiziden Safener beigefügt, die häufig als Antagonisten zum Herbizid wirken und eine Umwandlung des Wirkstoffes zu weniger toxischen Wirkstoffen fördern (Ebert und Kreuz, 1991). Für die in den Versuchen verwendeten vier Arten wurde die Zeit verglichen, die benötigt wurde, um eine 20%-ige Reduktion in der photochemischen Arbeit durch Herbizidapplikation hervorzurufen. Es musste eine geringe prozentuale Abnahme in der Photosynthese als Vergleichswert gewählt werden, da Voruntersuchungen gezeigt hatten, dass die Aufnahme und Wirkung von Bentazon (Reduktion in der Photosynthese und damit einhergehender Anstieg in der Fluoreszenz) bei *Solanum lycopersicum* und *Solanum tuberosum* zwar sehr schnell erfolgte (Abbildung 68), bei den *Vitis vinifera* und *Malus domestica* Pflanzen jedoch sehr langsam war. Dies führte über längere Zeiten zu der Verdunstung des applizierten Tropfens und einer

Aufkonzentrierung des Wirkstoffes, so dass eine Vergleichbarkeit nicht mehr gegeben wäre. Die bei manchen Messungen auftretende sprunghafte Abnahme der photochemischen Arbeit nach Applikation des Wirkstoffes könnte durch die auf der Oberseite der Blätter vorkommende Trichome erklärt werden. Der Tropfen sitzt auf den Haaren auf und das Fluoreszenzsignal kann kurzzeitig nicht adäquat gemessen werden. Um dieses Phänomen erklären zu können, sollten in Zukunft verschiedene Herbizidkonzentrationen, Lichtintensitäten und Pulsabstände getestet werden.

Setzt man die Permeationsdaten in Beziehung zu den Untersuchungen zur chemischen und morphologischen Charakterisierung der Transportbarriere, so kann gesagt werden, dass bei den Arten mit breitem Wachssubstanzklassenspektrum und einer weniger dichten Behaarung die Aufnahme des Herbizids deutlich langsamer erfolgte. Die schnellere Aufnahme des Herbizids bei den *Solanum* Arten könnte zum einen durch das geringe Wachssubstanzklassenspektrum und zum anderen durch die hohe Anzahl der Trichome erklärt werden. Die Kutikula, die die Trichome umgibt, ist im Vergleich zur Restkutikula des Blattes (Schönherr, 2006) durchlässiger. Dies sollte auch zu schnellerer Aufnahme und Transport des Herbizids in das Blattinnere führen. Diese Annahme konnte durch Vorarbeiten mit dem Farbstoff Berberinchlorid bestätigt werden, der sich bevorzugt in Trichomen anreicherte. Zusätzlich könnten die bei Tomate vorhandenen Drüsenhaare (*glandular trichomes*) einen *sink* für den Wirkstoff bilden und einen Weitertransport des Wirkstoffes ins Blattinnere verzögern oder verhindern. Die Applikation von radioaktiv markierten Stoffen auf die Oberfläche und die getrennte Messung der radioaktiven Substanz in Haaren und Blatt könnten dafür nähere Einblicke bieten. Die schnellere Aufnahme des Herbizids bei den *Solanum* Arten kann zusätzlich durch die Anwesenheit von Stomata auf der Blattoberseite erklärt werden. Reines Wasser zeigt keine Tendenz Stomata zu infiltrieren (Schönherr und Bukovac, 1972). Die Beimengung von Wirkstoffen kann aber zur Erniedrigung der Oberflächenspannung von Lösungen führen. Dies ermöglicht das Eindringen der Flüssigkeit und des Wirkstoffes in das Blatt. Da weder *Vitis vinifera* noch *Malus domestica* Stomata auf der Blattoberseite aufweisen, erfolgt hier die Aufnahme von Bentazon langsamer.

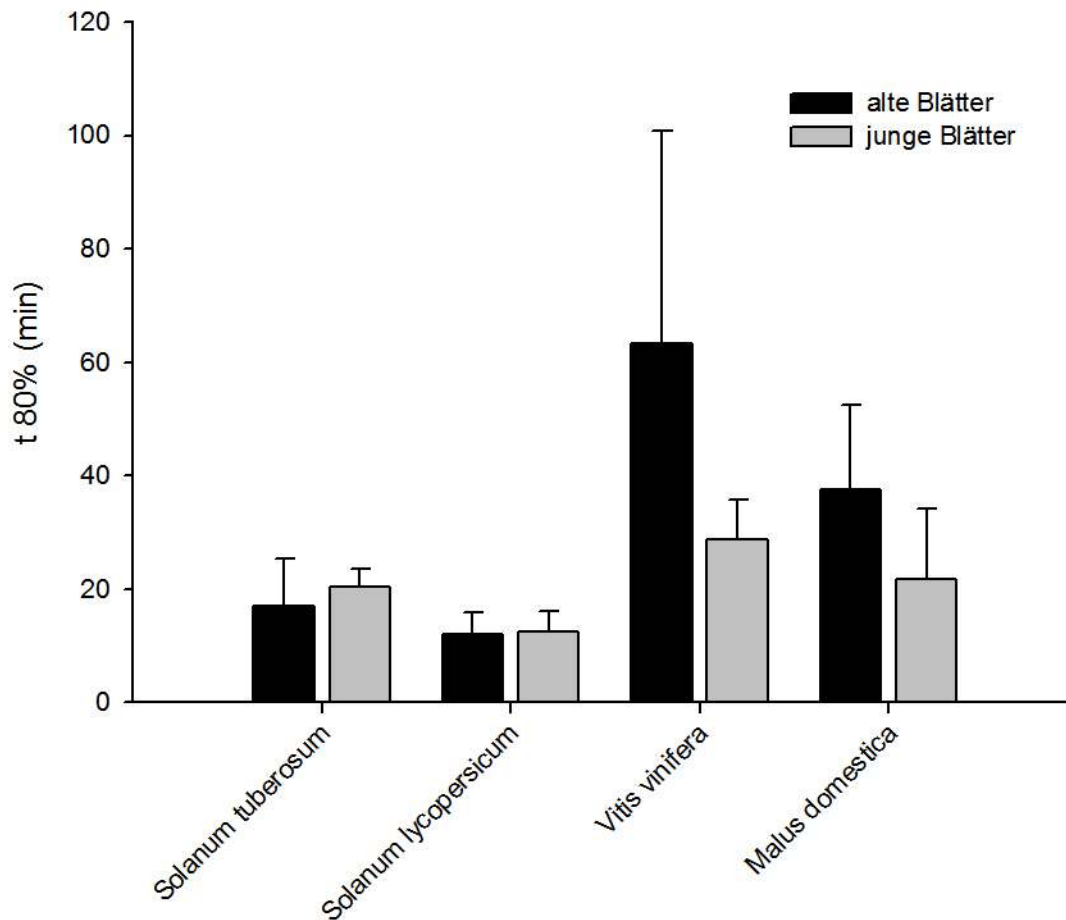


Abbildung 68: Vergleich der Zeiten ($t_{80\%}$ (min)) für eine 80-prozentige Hemmung der Photosyntheserate der vier untersuchten Arten

Dargestellt ist die Zeit (min), die bei den Arten verschiedenen Alters für eine 20 %-ige Reduktion in der Photosynthese benötigt wird.

4.1.6 Oberflächencharakterisierung ausgewählter Nutzpflanzen, Zusammenfassung

Die Oberflächen von *S. tuberosum*, *S. lycopersicum*, *V. vinifera* und *M. domestica* Blättern wurden auf morphologische, physiologische und anatomische Unterschiede hin untersucht. Zu den durchgeführten experimentellen Ansätzen gehörten die morphologische Beschreibung der Pflanzen, rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Ober- und Unterseite verschieden alter Blätter und die chemische Analyse der Oberflächenwache samt Erstellung eines Tiefenprofils. Ferner wurden Experimente hinsichtlich den Benetzungseigenschaften und Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen mit dem Photosynthesehemmer Bentazon durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen führen zu einer

Unterteilung der Arten in zwei Gruppen. Die morphologische Beschreibung der Pflanzen hat gezeigt, dass die Blätter der *Solanum* Arten im Gegensatz zu denen der beiden anderen Arten stark behaart sind. Innerhalb der *Solanum* Arten wiesen die Tomatenblätter eine stärkere Behaarung auf als die Kartoffelblätter. Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen haben gezeigt, dass sich bei den *Solanum* Arten die Stomata sowohl auf der Blattoberseite, als auch auf der Blattunterseite befinden. Bei den anderen Arten waren Stomata nur auf den Blattunterseiten vorhanden. Das Substanzklassenspektrum der kutikulären Wachse der beiden *Solanum* Arten ist im Vergleich zu den anderen Arten gering. Es besteht hauptsächlich aus verzweigten und langkettigen Alkanen. Die Erstellung eines Tiefenprofils der Wachse durch Strippen der Blätter mit Kollodium konnte an allen Arten außer an *S. lycopersicum* erfolgen. Die Untersuchung der Benetzungseigenschaften und ein Vergleich der beiden *Solanum* Arten hat gezeigt, dass besonders die Tomatenblattunterseiten eine schlechte Benetzung aufweisen. Kontaktwinkelmessungen sind sowohl von der chemischen Zusammensetzung der Oberfläche (Holloway, 1970; Bringe *et al.*, 2006) als auch von strukturellen Eigenschaften wie Trichomen oder Papillen abhängig (Ensikat *et al.*, 2012). Die schlechte Benetzungsfähigkeit der Tomatenblattunterseiten kann daher durch die hohe Trichomdichte erklärt werden. PAM-Messungen haben gezeigt, dass die Quantenausbeute bei den *Solanum* Arten nach Applikation des Herbizids schneller sinkt als bei *Vitis vinifera* und *Malus domestica*. Dies bedeutet indirekt, dass die Aufnahme des Wirkstoffes bei den *Solanum* Arten schneller erfolgt. Gründe hierfür sind mit hoher Wahrscheinlichkeit das Vorkommen von Trichomen und Stomata, deren Kutikula eine erhöhte Permeabilität aufweist (Schönherr, 2006). Das im Vergleich dazu breitere Wachssubstanzklassenspektrum und das Fehlen von Stomata auf den Blattoberseiten von *Vitis vinifera* und *Malus domestica* erklärt die deutlich langsamere Aufnahme des Herbizids in die Blätter dieser Arten.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Untersuchung der morphologischen, anatomischen und physiologischen Eigenschaften der Blattoberflächen notwendig sind, um Aufnahmeprozesse innerhalb einer Art aber auch zwischen verschiedenen Arten besser verstehen und vergleichen zu können. Neben Untersuchungen an isolierten Kutikulamembranen ausgewählter Arten sollte auch immer die Verwendung von intakten Blättern der jeweiligen Arten in Erwägung gezogen werden.

4.2 Die Kutikula als Transpirationsbarriere

Die Extraktion von Wachsen in organischem Lösungsmittel erlaubt keine Unterscheidung in epi- und intrakutikuläre Bestandteile. Alle Wachsbestandteile werden herausgelöst. Parallele Transpirationmessungen mit totalextrahierten Matrixmembranen (MX) und unbehandelten Kutikulamembranen unterstreichen die Bedeutung der Wachse (Summe aus epi- und intrakutikulären Wachse) bei der Ausbildung der Transpirationsbarriere. Je nach Art steigt die Transpiration nach Totalextraktion der Wachse um 2-3 Größenordnungen an (Schönherr, 1976; Schönherr und Riederer, 1989; Schreiber und Schönherr, 2009). Um jedoch eine Antwort auf die Frage zu bekommen, in welchem Maße die epikutikulären Wachse für die Bildung der Transpirationsbarriere verantwortlich sind, ist die Etablierung und Anwendung einer Methode von Nöten, die die selektive Entfernung der Oberflächenwachse erlaubt. Voraussetzung dafür ist, dass die Oberflächen der Kutikulamembranen oder intakten Blattscheiben nicht beschädigt werden. Die Messung der Transpiration vor und nach selektiver Entfernung der Oberflächenwachse sowie ihre analytische Untersuchung ist von besonderer Bedeutung, um die potenzielle Funktion (Schreiber, 2010) und chemische Zusammensetzung epikutikulärer Wachse unabhängig von den intrakutikulären Wachsen zu charakterisieren. Spektroskopische Untersuchungen (FTIR, Fourier-Transform-Infrarotspektrometer und Raman) haben in der Vergangenheit zeigen können, dass Triterpene bei *Prunus laurocerasus* in tieferen Schichten lokalisiert und somit Teil der intrakutikulären Wachse sind (Yu *et al.*, 2008; Weissflog *et al.*, 2010) und aliphatische Substanzen sowohl auf als auch in der Kutikula zu finden sind (Jetter *et al.*, 2000; Jetter und Schäffer, 2001). Diese chemischen Unterschiede in den beiden Wachsfraktionen konnten bei weiteren Arten beschrieben werden (Buschhaus und Jetter, 2010). In der Literatur werden verschiedene Methoden beschrieben, die das selektive Entfernen der Oberflächenwachse erlauben. Neben der Verwendung von Gummi arabicum (Jetter und Schäffer, 2001), einem Uhu-Zweikomponentenkleber (Koch *et al.*, 2004), der Verwendung von Kollodium (Haas und Rentschler, 1984) und der Cryo-Technik (Ensikat *et al.*, 2000) ist ebenfalls die Verwendung von Celluloseacetat bekannt (Silcox und Holloway, 1986; Garrec *et al.*, 1995). Neben den meist auf mechanischer Entfernung der Wachse basierenden Techniken sind als weitere Methoden das kurze Dippen in oder das Abwaschen der Wachse mit organischem Lösungsmittel beschrieben (Stammitti *et al.*, 1996). Bis dato wurden diese verschiedenen Methoden meist nur zur chemisch-analytischen Untersuchung der Wachse angewendet. Eine Kombination aus verschiedenen experimentellen Ansätzen zur Aufklärung der Funktion und chemischen Zusammensetzung der Oberflächenwachse wurde nur sehr selten durchgeführt. Transpirationmessungen nach selektiver Wachsentfernung weisen in der Literatur teilweise widersprüchliche Ergebnisse auf. Mit intakten Blättern und isolierten Kutikulamembranen unterschiedlicher Arten konnte kein Effekt auf die Transpiration nach

selektiver Wachsentfernung beobachtet werden (Baur, 1998). Bei der Behandlung von Tomaten- (Vogg *et al.*, 2004) und Kirschfruchtkutikulamembranen (Knoche *et al.*, 2000) hingegen wurde eine zwei- bis dreifache Erhöhung in der Transpiration beschrieben. Voruntersuchungen an *Prunus laurocerasus*, *Hedera helix* und *Ficus elastica* haben gezeigt, dass eine zweifache Behandlung der Oberflächen mit Kollodium ausreicht, um selektiv die epikutikulären Wachse zu entfernen (Zeisler, 2010). Mit der dritten Behandlung stieg die Menge der Triterpenen an. Der zum Teil signifikante Anstieg der Triterpene bedeutete, dass tiefere Schichten der Kutikula erreicht wurden. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen haben diese Ergebnisse unabhängig von den chemischen Analysen bestätigt. Nach einer zweifachen Behandlung der Oberflächen erschienen sie glatt und eine klare Grenze zwischen unbehandelter und behandelter Oberfläche wurde sichtbar. Transpirationmessungen vor und nach selektiver Entfernung der Wachse bzw. Applikation des Lösungsmittels Diethylether-Ethanol als Negativkontrolle haben bei den Arten gezeigt, dass die epikutikulären Wachse nicht an der Bildung der Transpirationsbarriere beteiligt sind. Es konnte kein signifikanter Anstieg in der Transpiration verzeichnet werden. Bei diesen Voruntersuchungen wurde bewusst die Kollodium-Methode gewählt, da sie sehr effizient ist. Sowohl das Auftragen, aber auch das Ablösen der Stripps samt anhaftender Wachse erfolgt sehr schnell (30 Sekunden) ohne dabei die Kutikulamembranen zu beschädigen. Die schrittweise Entfernung der Oberflächenwachse und die jeweils direkte kaum zeitverzögerte Messung der Transpiration vor und nach Oberflächenbehandlung ist somit möglich. Ein ausschlaggebendes Kriterium zur Methodenauswahl war auch, dass in der Literatur eine Regeneration der Oberflächenwachse nach Entfernung im Bereich von 30 Minuten erfolgen kann (Koch *et al.*, 2004). Eine Methode, die lange Zeit dauert, könnte zu dem Problem führen, dass eine mögliche Erhöhung in der Transpiration durch selektive Entfernung der Oberflächenwachse durch eine bereits erfolgte Wachsregeneration nicht mehr nachgewiesen werden kann. Auch für die analytische Untersuchung der Oberflächenwachse hat sich die Kollodiummethode als sehr brauchbar herausgestellt. Die Stripps sind selbst nicht in organischem Lösungsmittel löslich, was eine Kontamination der Proben durch den Nitrozellulosefilm ausschließt. Da Kollodium jedoch in dem organischen Lösungsmittel Diethylether-Ethanol gelöst ist und Wachse sich gut in organischen Lösungsmitteln lösen lassen, wurde diese Methode häufig in der Literatur kritisiert (Jetter *et al.*, 2000). An der Benutzung von Kollodium wird bemängelt, dass das organische Lösungsmittel in tiefere Schichten der Kutikula diffundieren und dort intrakutikuläre Wachsbestandteile herauslösen könnte. Gegen diese Kritik sprechen die Voruntersuchungen an *P. laurocerasus*, *H. helix* und *F. elastica*, die zeigen, dass das Lösungsmittelgemisch Diethylether-Ethanol alleine keinen Effekt auf die kutikuläre Transpiration hat (Zeisler, 2010). Um dies aber umfassender und gründlicher an weiteren Arten zu verifizieren und mit anderen Methoden zu vergleichen,

wurden zusätzlich die Gummi arabicum und Celluloseacetat-Methode zur selektiven Entfernung der Oberflächenwachse angewandt. Gummi arabicum ist in Wasser gelöst. Da Wachse nicht in Wasser löslich sind, wäre ein Anstieg in der Transpiration nach der Gummi arabicum Behandlung auf der rein mechanischen Entfernung der Wachse zurückzuführen. Celluloseacetat ist in dem organischen Lösungsmittel Aceton gelöst. Um die verschiedenen Methoden vergleichen zu können und eine Antwort auf die Frage zu erhalten, ob das Lösungsmittel Diethylether-Ethanol einen Effekt auf die Transpiration hat, wurden chemisch analytische Untersuchungen der Wachse nach Entfernung, rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Oberflächen und Transpirationsmessungen vor und nach Behandlung durchgeführt. Für diese Ansätze wurden sowohl intakte Blattscheiben, als auch isolierte Blattkutikulamembranen und Fruchtkutikulamembranen verwendet. Die Auswahl der verwendeten Pflanzenarten beinhaltet sowohl Arten mit einem hohen Gehalt an Triterpenen, als auch Arten bei denen Triterpene nur in Spuren vorkommen oder sogar vollkommen fehlen. Auf die Verwendung der Cryo-Technik (Ensikat *et al.*, 2000) und dem UHU-Zweikomponentenkleber (Koch *et al.*, 2004) wurde verzichtet. Die Probenvorbereitung beruht bei der Cryo-Technik auf einer Vorfixierung in flüssigem Stickstoff. Eine Weiterverwendung der dadurch beschädigten Membranen in anschließenden Transpirationsmessungen ist somit ausgeschlossen. Der UHU-Zweikomponentenkleber (Koch *et al.*, 2004) eignet sich aufgrund seiner chemischen Zusammensetzung nicht für die analytische Untersuchung der Wachse. Voruntersuchungen haben gezeigt, dass Komponenten aus dem Kleber im Chromatogramm die Wachsmoleküle bei weitem überdecken. Des Weiteren lässt sich der UHU-Kleber nur sehr schwer von den Membranen ablösen. Ein Verletzen der Oberflächen kann nicht ausgeschlossen werden.

4.2.1 Analytische Untersuchungen

4.2.1.1 Abheben der epikutikulären Wachse von *Monstera deliciosa*

Blattscheiben mit Kollodium

Monstera deliciosa Blattscheiben wurden fünf Mal in Folge mit Kollodium behandelt (Abbildung 50). Bereits mit der ersten Behandlung konnte die größte Menge an Oberflächenwachsen selektiv entfernt werden. Die Menge der durch die weiteren Behandlungen zusätzlich entfernten Wachse war im Vergleich dazu geringer. Dies stimmt mit den aus der Literatur bekannten Ergebnissen (Jetter *et al.*, 2000) aber auch mit den Voruntersuchungen an *P. laurocerasus*, *H. helix* und *F. elastica* überein (Zeisler, 2010). Die Summe aus Restwachsmenge und den fünf vorherigen Behandlungen entspricht gut dem Wachsgehalt der parallel extrahierten Kutikulamembranen (Gesamtwachs). Dies zeigt, dass während der Probenverarbeitung keine Wachsbestandteile verloren gehen, und macht deutlich, dass sich diese Methode zur exakten Bestimmung der Wachsmenge und ihrer

Unterteilung in epi- und intrakutikuläre Wachse eignet. Die Betrachtung der Unterteilung in Sterole und langkettige Aliphate macht deutlich, dass mit der selektiven Behandlung vor allem langkettige Aliphate entfernt werden konnten. Dies deutet darauf hin, dass die epikutikulären Wachse von *Monstera deliciosa* ausschließlich aus langkettigen Aliphaten bestehen. Sterole, die sich den Biosyntheseweg mit Triterpenen teilen, gehören zu den intrakutikulären Wachsen und konnten in höheren Mengen erst durch die Totalextraktion isolierter Kutikulamembranen isoliert werden. Bei der Behandlung der Blattscheiben konnten sowohl kurzkettige als auch langkettige Monomere von der Oberfläche entfernt werden (Abbildung 50 D). Dieses Ergebnis unterscheidet sich von den Voruntersuchungen an *Prunus laurocerasus*, bei denen vor allem kurzkettige Monomere entfernt und langkettige erst durch die Restwachsanalyse isoliert werden konnten (Zeisler, 2010).

4.2.1.2 Abheben der epikutikulären Wachse von *Prunus laurocerasus* Blattscheiben mit Gummi arabicum

Als Vergleich zu den Voruntersuchungen an *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen und aufgrund der Kritik, Kollodium sei in einem organischen Lösungsmittel gelöst, wurde Gummi arabicum als weiteres Agens für die selektive Entfernung von Oberflächenwachsen getestet. Da Gummi arabicum in *Aqua demin* gelöst ist, kann jeglicher Einfluss eines organischen Lösungsmittels auf die selektive Wachsentfernung ausgeschlossen werden. Die selektive Entfernung beruht rein auf einem mechanischen Prinzip. Für diesen Ansatz mussten intakte Blattscheiben verwendet werden, da sich das Gummi arabicum nicht von selbst von der Oberfläche löste und jeder Versuch es von einer isolierten Kutikulamembran zu entfernen dazu führte, dass sie rissen. Eine Unterscheidung der beiden Wachsfraktionen und eine online Weitermessung der Transpiration wäre bei der Verwendung von Gummi arabicum bei Kutikulamembranen somit ausgeschlossen. Neben dem Ausschluss von Experimenten mit isolierten Kutikulamembranen und der damit einhergehenden Limitierung der Methode ist die lange Wartezeit (45 min) zwecks Trocknung zwischen den einzelnen Behandlungen ein weiterer Nachteil von Gummi arabicum als Agens zur selektiven Wachsentfernung.

Wie auch bei der Kollodiumbehandlung von *Monstera deliciosa* Blattscheiben konnte mit der ersten Gummi arabicum Behandlung die höchste Menge an Oberflächenwachsen entfernt werden (Abbildung 51 A). Diese Menge ist im Vergleich zu *M. deliciosa* und den anderen bereits untersuchten Arten höher. Die selektiv entfernten Wachse bestehen hauptsächlich aus langkettigen Aliphaten und zu einem geringen Anteil auch aus Triterpenen (Abbildung 51 B). Der Anteil der Triterpene ist im Vergleich zu der Menge an Triterpenen, die durch die parallele Restwachsbestimmung isoliert werden können, extrem gering, könnte aber darauf hindeuten, dass das Blattmaterial durch die Verwendung von Gummi arabicum und dessen Entfernen von der Blattoberfläche mit einer Pinzette doch manchmal verletzt wird. Dies

würde auch die höhere Wachsmenge nach der ersten Behandlung im Vergleich zur Kollodiummethode erklären. Langkettige aliphatische Bestandteile sind nicht nur im epidermalen sondern auch im intrakutikulären Wachs vorhanden. Das Verletzen der Blattoberfläche könnte nicht nur zu einer höheren Menge an Triterpenen sondern auch zu einer höheren Menge an langkettigen Aliphaten führen. Die Voruntersuchungen mit Kollodium an *Prunus laurocerasus* konnten zeigen, dass bei der Behandlung vor allem kurzkettige Monomere von der Oberfläche entfernt wurden. Langkettige Substanzen konnten hingegen erst in höheren Mengen durch die Restwachsbestimmung nachgewiesen werden. Dies ist bei Verwendung von Gummi arabicum an *Prunus* Blattscheiben nicht zu erkennen und könnte darauf hindeuten, dass durch die Entfernung des Polymers die Oberfläche gestört wird. Dadurch werden kurzkettige als auch langkettige Monomere zu etwa gleichen Teilen entfernt.

4.2.1.3 Abheben der epikutikulären Wachse von *Prunus laurocerasus*

Kutikeln mit Celluloseacetat

Neben der Verwendung von Kollodium und Gummi arabicum wurde als drittes Agens zur selektiven Wachsentfernung Celluloseacetat getestet. Celluloseacetat ist wie Kollodium (Diethylether-Ethanol) in einem organischen Lösungsmittel (Aceton) gelöst. Voruntersuchungen haben gezeigt, dass Wachse in Aceton gut löslich sind, in Diethylether-Ethanol hingegen nicht. Diese Voruntersuchungen unterstützen die Ergebnisse der chemischen Analysen der selektiven Wachsentfernung mit Celluloseacetat. Bereits mit der ersten Behandlung konnten Triterpene von der Oberfläche entfernt werden. Dieser Gehalt stieg stetig von Behandlung zu Behandlung an und erreichte mit der Fünften unter Einbezug der ersten vier Behandlungen einen Wert von $2,80 \pm 1,70 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Abbildung 52 B). Im Vergleich zu den beiden anderen Methoden konnte mit der Celluloseacetatbehandlung die höchste Menge an Triterpenen von der Oberfläche entfernt werden. Der Grund für die hohe Menge an herausgelösten Triterpenen ist das organische Lösungsmittel Aceton. Im Vergleich zu Kollodium, welches ebenfalls in einem organischen Lösungsmittel gelöst ist, dauert die Trocknung des Celluloseacetatfilms wesentlich länger. Zusätzlich stellt Aceton ein wesentlich besseres Lösungsmittel für Wachse dar. Das Aceton dringt vermutlich auch während des längeren Trocknungsprozesses in tiefere Schichten der Kutikula und löst die intrakutikulären Wachsbestandteile. Eine klare Unterteilung in epidermalen und intrakutikulären Wachse ist durch die Verwendung von Celluloseacetat tatsächlich nicht möglich und macht diese Methode zur Aufklärung der Frage, in welchem Maße die epikutikulären Wachse für die Bildung der Transpirationsbarriere verantwortlich sind, unbrauchbar.

4.2.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

4.2.2.1 Die selektive Entfernung der Oberflächenwachse mit drei verschiedenen Ansätzen

Neben den chemisch analytischen Untersuchungen der Oberflächenwachse wurden zusätzlich unabhängige rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zur Bestätigung der selektiven Wachsentfernung gemacht.

Neben den in den chemischen Analysen verwendeten Arten wurden zusätzlich von weiteren Arten die Oberflächenwachse selektiv mit Kollodium entfernt und die Oberflächen rasterelektronenmikroskopisch untersucht (Abbildung 53). Ferner wurde bei diesen Arten der Effekt der selektiven Wachsentfernung auf die Wasserpermeabilität durch Transpirationmessungen bestimmt. Auf die zusätzliche chemische Analyse der Oberflächenwachse wurde bei diesen Arten aus Zeitgründen verzichtet. Nach der zweifachen Behandlung der Arten mit Kollodium erschienen die zur Hälfte behandelten Oberflächen glatt. Es waren keine oder nur eher wenige Oberflächenwachse zu erkennen und eine klare Grenze zwischen behandelter und unbehandelter Oberfläche entstand. Ein Vergleich der Arten und deren Oberflächenstrukturen spiegelt die hohe Vielfältigkeit der Wachsstrukturen wider. Die unabhängige rasterelektronenmikroskopische Untersuchung eines abgezogenen Stripps bestätigte die chemisch-analytischen Daten, die auf ein rein mechanisches Prinzip der Wachsentfernung hindeuteten. Die Wachse klebten an dem entfernten Stripp, was ihre gaschromatographische Untersuchung möglich machte. Frisch isolierte *Prunus* Kutikulamembranen ließen sich interessanterweise nicht stripfen (Abbildung 54 C+D). Erst nach einer Lagerungszeit von etwa 2 Jahren konnte die Behandlung mit Kollodium und die damit einhergehende selektive Wachsentfernung erfolgen (Abbildung 54 A+B). Die frisch isolierten Kutikulamembranen wiesen keine Oberflächenstrukturen auf. Sie glichen einer totalextrahierten Kutikulamembran (MX). Bei dem Versuch das Kollodium von diesen Kutikulamembranen zu entfernen, rissen sie sofort. Nach der etwa zweijährigen Lagerung der Kutikulamembranen wurden Oberflächenstrukturen sichtbar, die Oberflächen erschienen rau. Eine parallele Beobachtung ist im Zusammenhang mit Transpirationsdaten aus der Literatur bekannt. Die Wasserpermeabilität isolierter Kutikulamembranen ist abhängig von ihrer Lagerungszeit. Je länger die Lagerungszeit, desto geringer die Wasserpermeabilität. Diese Beobachtung passt zu den durchgeführten rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen und kann durch eine Umlagerung und Diffusion der Wachse an die Oberfläche nach der Isolation erklärt werden (Geyer und Schönherr, 1990).

Neben der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung der zur Hälfte mit Kollodium behandelten Oberflächen, wurde die Oberfläche von *Prunus laurocerasus* Blattscheiben mit Gummi arabicum behandelt und ebenfalls rasterelektronenmikroskopisch untersucht (Abbildung 55). Nach der zweifachen Behandlung der intakten Blattscheiben erschienen die Oberflächen glatt, es konnten keine Wachstrukturen erkannt werden (Abbildung 55 B und C). Eine klare Grenze zwischen behandelter und unbehandelter Oberfläche konnte im Gegensatz zu Kollodium nicht erkannt werden. Grund hierfür könnten die unterschiedlichen Konsistenzen der Polymere sein. Da Kollodium leicht viskos ist und sich die zur Hälfte behandelte Stelle von der nichtbehandelten mit bloßem Auge unterscheidet, ist eine erneute Behandlung exakt derselben Stelle möglich. Bei Gummi arabicum ist dies aufgrund des wässrigen Charakters nicht möglich. Die selektive Wachsentfernung von *Prunus laurocerasus* Kutikulamembran wurde zusätzlich mit Celluloseacetat rasterelektronenmikroskopisch untersucht (Abbildung 56). Die für *Prunus* typischen schuppenförmigen Oberflächenwachse (A und B) sind durch die zweifache Behandlung entfernt worden, die Oberfläche erscheint glatt (C und D). Die Vorbereitung einer zur Hälfte mit Celluloseacetat behandelten Kutikulamembran war nicht möglich, da sich das in Aceton gelöste Celluloseacetat immer sofort auf der gesamten Kutikulamembran ausbreitete.

4.2.3 Transpirationsmessungen

In der Literatur werden viele Transpirationsexperimente an isolierten Kutikulamembranen (Riederer und Schreiber, 2001) und intakten Blattscheiben beschrieben (Schreiber, 2001). Experimente zur Wasserpermeabilität als auch Transportversuche mit organischen Substanzen (Kirsch *et al.*, 1997) haben zeigen können, dass sich die Leitwerte von isolierten Kutikulamembranen und intakten Blattscheiben nicht signifikant voneinander unterscheiden (Schreiber, 2001). Dies bedeutet, dass sich die Barriere während der Isolation der Kutikulamembranen nicht verändert, und unterstützt ihre Verwendung in Transportexperimenten. Viele Messungen wurden mit totalextrahierten Kutikulamembranen (MX) durchgeführt und es konnte ein klarer Anstieg in der Transpiration nach der Wachsentfernung beobachtet werden (Schönherr und Lenzian, 1981).

Um aber eine Antwort auf die Frage zu erhalten, in welchem Maße die epikutikulären Wachse zur Bildung der Transpirationsbarriere beitragen, mussten Transpirationsmessungen vor und nach dem selektivem Entfernen der Oberflächenwachse mit Kollodium, Gummi arabicum und Celluloseacetat durchgeführt werden. Als Negativkontrollen zu der jeweiligen selektiven Entfernung diente die Applikation der Lösungsmittel, in denen die Agenzien gelöst sind. Sollten die epikutikulären Wachse für die Transpirationsbarriere verantwortlich sein, so ist ein Anstieg in der Transpiration nach selektiver Entfernung zu erwarten. Die durchgeführten radioaktiven Transpirationsmessungen erfolgten über 100 % Luftfeuchte. Die Transpirationsmessungen mussten radioaktiv durchgeführt werden, da bei der gravimetrischen Methode die treibende Kraft bei 100 % Luftfeuchte null ist. Es würde somit keine Netto-Transpiration stattfinden. Mit der radioaktiven Messmethode ist des Weiteren eine sehr präzise Messung der Transpiration über kurze Zeiträume möglich, was sie für diesen experimentellen Ansatz sehr interessant macht.

4.2.3.1 Messung der Transpiration vor und nach selektivem Entfernen der Oberflächenwachse von isolierten Kutikulamembranen und intakten Blattscheiben mit Kollodium

Die Messung der Transpiration vor und nach selektivem Entfernen der Oberflächenwachse mit Kollodium erfolgte an verschiedenen Arten. Die Arten wurden ausgewählt, da sie sich in ihrer Wachsmenge, Zusammensetzung, aber auch in ihren aus der Literatur bekannten Leitwerten unterscheiden. Neben Blattkutikeln wurden auch Fruchtkutikeln (*Solanum lycopersicum*) verwendet, um zu untersuchen, ob sich die selektive Entfernung bei Früchten anders als bei Blättern auswirkt. Es wurden sowohl isolierte Kutikulamembranen als auch intaktes Blattmaterial verwendet, da sich die isolierten Kutikulamembranen mancher Arten gar nicht oder erst nach einer gewissen Lagerungszeit stripfen ließen. Die isolierten Kutikulamembranen und intakten Blattscheiben wurden nach einer mindestens einstündigen

Messung der Anfangstranspiration zweifach in Folge mit Kollodium oder als Negativkontrolle mit dem organischen Lösungsmittel Diethylether-Ethanol behandelt. Auf eine weitere Behandlung der Oberflächen wurde verzichtet, da die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen konnten, dass eine zweifache Behandlung ausreicht um die Oberflächenwachse selektiv zu entfernen. Auch die analytischen Daten einiger Arten zeigten, dass mit der dritten Behandlung intrakutikuläre Bestandteile herausgelöst werden. Die selektive Entfernung der Oberflächenwachse hatte außer bei den *Solanum* Fruchtkutikeln (Effekt: $1,40 \pm 0,36$) keinen Effekt auf die Transpiration (Tabelle 13). Die gemittelten Effekte sind nicht verschieden von eins. Die leichte Erhöhung der Transpiration bei *Solanum* Fruchtkutikeln stimmt mit den aus der Literatur bekannten Messungen der Transpiration nach selektiver Entfernung an Tomatenfrüchten überein (Vogg *et al.*, 2004). Vergleicht man diese leichte Transpirationserhöhung mit den großen Effekten nach totaler Lösungsmittlextraktion (Schönherr und Lenzian, 1981), so ist dieser Effekt jedoch vergleichsweise klein. Auch die Behandlung mit dem organischen Lösungsmittelgemisch Diethylether-Ethanol hat außer bei *Schefflera* (Effekt: $1,35 \pm 0,13$) keinen signifikanten Effekt auf die Transpiration. Die Ergebnisse nach Lösungsmittelapplikation schließen einen Lösungsmittelleffekt aus und bestätigen die Brauchbarkeit der Kollodiummethode. Den epikutikulären Wachsen wird häufig die Funktion als Transpirationsbarriere zugesprochen. Eine Antwort auf die Frage zu erhalten, in welchem Maße die epikutikulären Wachse für die Transpirationsbarriere verantwortlich sind, ist von besonderem Interesse, da weder die Dicke der Kutikula (Kamp, 1930) noch die Gesamtwachsmenge (Schreiber und Riederer, 1996) ausschlaggebend für den Transpirationsschutz sind. Stattdessen ist es wahrscheinlich eher die Wachszusammensetzung und die molekulare Anordnung der Wachse, welche die Barriereigenschaften ausbilden (Schreiber *et al.*, 1997). Entgegen den wenigen Angaben in der Literatur führte die selektive Entfernung der Oberflächenwachse mit Kollodium bei den hier untersuchten Arten nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Transpiration (Knoche *et al.*, 2000). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass sich die Transpirationsbarriere bei den untersuchten Arten in tieferen Schichten der Kutikula befindet. Die intrakutikulären Wachse, bestehend aus Triterpenen und langkettigen Aliphaten, dichten die Kutikula wahrscheinlich von innen ab und schützen die Pflanze vor dem Wasserverlust an die Atmosphäre. Die Lokalisation der Transpirationsbarriere im Inneren der Kutikula scheint auch sinnvoll, da die Oberflächen von Blättern in ständigem Kontakt mit biotischen und abiotischen Faktoren sind. Wind, Regen aber auch Bakterien, Pilze und Insekten könnten die äußere Wachsschicht verletzen oder erodieren und der Schutz vor Austrocknung wäre dann nicht mehr gegeben.

4.2.3.2 Messung der Transpiration vor und nach selektivem Entfernen der Oberflächenwachse von intakten Blattscheiben mit Gummi arabicum

Dass die kutikuläre Transpirationsbarriere nicht auf der Oberfläche sondern in tieferen Schichten lokalisiert ist, konnte durch die Versuche an *Prunus laurocerasus* Blattscheiben und Kutikulamembranen und der Gummi arabicum Methode weiter bestätigt werden. Die Anfangstranspiration wurde erneut über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde gemessen. Intakte Blattscheiben wurden anschließend zweifach in Folge mit Gummi arabicum behandelt. Eine Behandlung an isolierten Kutikulamembranen konnte nicht erfolgen, da sie bei dem Versuch, das Polymer von der Oberfläche zu entfernen, rissen. Als Negativkontrolle diente die Applikation von *Aqua demin* auf isolierten *Prunus* Kutikulamembranen. Da sich die Leitwerte während des Isolationsprozesses der Membranen nicht verändern, konnte ein solcher experimenteller Vergleich (Blattscheiben/Kutikula) durchgeführt werden (Schreiber, 2001). Da auch kein signifikanter Transpirationsanstieg nach Behandlung mit Gummi arabicum gemessen werden konnte, wird die oben gemachte Schlussfolgerung bestätigt, dass die epikutikulären Wachse nicht zur Bildung der kutikulären Transpirationsbarriere beitragen.

4.2.3.3 Messung der Transpiration vor und nach selektivem Entfernen der Oberflächenwachse von isolierten Kutikulamembranen durch Celluloseacetat

Als drittes Agens für die selektive Wachsentfernung und anschließenden Transpirationmessungen wurde in Aceton gelöstes Celluloseacetat verwendet. Die Transpiration von isolierten *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen wurde vor und nach der Behandlung mit Celluloseacetat und Aceton als Negativkontrolle über einen Zeitraum von zwei Stunden gemessen. Sowohl die Behandlung mit Celluloseacetat als auch die Behandlung mit Aceton führte zu einem signifikanten Anstieg der Transpiration (Tabelle 15). Die hier durchgeführten Transpirationmessungen und auch die chemisch analytischen Untersuchungen der selektiv abgehobenen Wachse mit Celluloseacetat (Abbildung 52) unterstreichen die Annahme, dass die in tieferen Schichten der Kutikula lokalisierte Transpirationsbarriere beeinträchtigt wird. Die selektive Entfernung der Wachse mit dem in Aceton gelösten Celluloseacetat führte im Vergleich zu Kollodium und Gummi arabicum zu einer signifikant erhöhten Menge an Triterpenen (Abbildung 52). Dies bedeutet, dass Wachsbestandteile aus tieferen Schichten der Kutikula mobilisiert und herausgelöst wurden. Sollte die Transpirationsbarriere nicht auf sondern in der Kutikula lokalisiert sein, so wird sie durch das Herauslösen der intrakutikulären Wachsbestandteile aufgrund der Verwendung von Celluloseacetat gestört

und die Transpiration steigt an. Voruntersuchungen haben zeigen können, dass Wachse gut in Aceton löslich sind. Im Vergleich zu Diethylether-Ethanol werden in Aceton Triterpene besonders gut gelöst. Des Weiteren ist die Trocknungszeit von Aceton im Vergleich zu der von Diethylether-Ethanol länger. Aceton kann somit besser in tiefere Schichten der Kutikula diffundieren und stört die dort lokalisierte Transpirationsbarriere. Aufgrund der Kombination aus den chemisch-analytischen Daten und den dazugehörigen Transpirationsexperimenten kann gesagt werden, dass sich die Celluloseacetat-Methode zum selektiven Abheben der epikutikulären Wachse und zur Klärung der Frage wo die kutikuläre Transpirationsbarriere lokalisiert ist nicht eignet.

4.2.4 Der Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf die Barriere

Als Vergleich zu den Transpirationsmessungen vor und nach selektiver Wachsentfernung wurden weiterhin Transpirationsmessungen vor und nach der Applikation von Lösungsmitteln mit unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften durchgeführt (Tabelle 3, Tabelle 4). Die Anfangstranspiration wurde über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde radioaktiv gemessen. Die Applikation der Lösungsmittel erfolgte außer bei *Aqua demin* zweifach in Folge. Die Transpiration wurde nach der Behandlung erneut für mindestens eine Stunde gemessen. Die höchsten Effekte auf die Transpiration von *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen konnten durch die Applikation von Chloroform (Effekt: $4,81 \pm 2,79$) und Aceton (Effekt: $3,72 \pm 1,88$) erzielt werden. Die Applikation von Ethanol, Diethylether-Ethanol und Hexan hatte dagegen kaum oder keinen Effekt (Abbildung 57). Analytische Voruntersuchungen bei denen jeweils eine Kutikulamembran für 10 s in das jeweilige Lösungsmittel getaucht wurde, haben gezeigt, dass Wachse besonders gut in Aceton und Chloroform löslich sind. Eine Aufteilung nach Triterpenen und langkettigen Aliphaten hat gezeigt, dass mit Aceton und Chloroform eine besonders hohe Menge an Triterpenen herausgelöst wird. Triterpene sind in tieferen Schichten der *Prunus* Kutikulamembran lokalisiert und gehören zu den intrakutikulären Wachsen (Yu *et al.*, 2008). Diese Voruntersuchungen und auch die Transpirationsmessungen vor und nach Lösungsmittelapplikation unterstützen die Hypothese einer Lokalisation der kutikulären Transpirationsbarriere in tieferen Schichten der Kutikula. Die analytischen Voruntersuchungen mit Diethylether-Ethanol, Hexan und Ethanol haben im Gegensatz dazu zeigen können, dass vor allem langkettige Aliphate aber kaum Triterpene gelöst werden. Die Lösungsmittel dringen nicht in tiefe Schichten der Kutikula ein und ein Anstieg der Transpiration nach Applikation dieser Lösungsmittel bleibt daher aus. Ein direkter Zusammenhang zwischen den in Tabelle 3 aufgeführten Dampfdrücken und Dipolmomenten und den Effekten auf die Transpiration konnte aber nicht gefunden werden. Der errechnete Leitwert für isolierte *Prunus* Kutikulamembranen ist vor der Behandlung mit den

verschiedenen Lösungsmitteln höher als der in der Literatur zu findende Wert von 1×10^{-10} m/s. Transpirationmessungen über 100 % Luftfeuchte führen zu einer erhöhten Wasserpermeabilität (Schreiber, 2001). In der Literatur werden zwei Wege für den Transport von Wasser durch die Kutikula beschrieben. Der eine Weg wird durch das Kutin und den ein- und aufgelagerten Wachsen gebildet, der andere führt entlang von polaren Poren. Die erhöhte Wasserpermeabilität aufgrund der hohen Luftfeuchte kann durch einen veränderten Zustand der polaren Poren erklärt werden. Die freien Carboxyl-Gruppen binden Wasser, die Kutikula quillt und die Wasserpermeabilität der polaren Poren wird erhöht (Schreiber, 2001). Ein Vergleich zwischen den errechneten Leitwerten isolierter Kutikulamembranen und totalextrahierter Membranen (MX) unterstreicht die Wichtigkeit der Wachse (Summe aus epi- und intrakutikulären Wachsen) als Transpirationsbarriere. Die Transpiration steigt nach der Extraktion in organischem Lösungsmittel an (Schreiber und Schönherr, 2009).

4.2.5 Die Kutikula als Transpirationsbarriere, Zusammenfassung

Die Transpirationsbarriere der pflanzlichen Kutikula wird durch epi- und intrakutikuläre Wachse etabliert (Schönherr und Riederer, 1989). Die Verwendung von drei verschiedenen Agenzien zur selektiven Entfernung der Oberflächenwachse hat zur Aufklärung der Frage beigetragen, in welchem Maße besonders die epikutikulären Wachse für die Bildung der Transpirationsbarriere verantwortlich sind. Zur Aufklärung der Frage aber auch zur Bestimmung, welche Methode sich besonders für die Fragestellung eignet, wurden chemische Analysen der entfernten Wachse, rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der behandelten Oberflächen und Transpirationmessungen vor und nach der Behandlung der Oberflächen mit den verschiedenen Agenzien durchgeführt. Ein Vergleich der Ergebnisse der drei Methoden hat gezeigt, dass sich Kollodium zur selektiven Entfernung der Oberflächenwachse am besten eignet. Im Gegensatz zu der Gummi arabicum Methode konnten mit Kollodium sowohl isolierte Kutikulamembranen als auch intakte Blattscheiben verwendet werden. Die chemische Analyse der selektiv entfernten Wachse zeigte, dass vor allem langkettige Aliphate von der Oberfläche abgehoben wurden. Triterpene wurden in hohen Mengen erst durch eine Totalextraktion in organischem Lösungsmittel extrahiert. Diese Methode eignet sich demnach zur exakten Diskriminierung epi- und intrakutikulärer Wachse. Die durchgeführten Transpirationmessungen vor und nach der selektiven Entfernung der Oberflächenwachse mit Kollodium führen zu der Schlussfolgerung, dass sich die Transpirationsbarriere nicht auf der Oberfläche sondern in tieferen Schichten der Kutikula befindet. Die Kritik, dass Kollodium in einem organischen Lösungsmittel gelöst ist und damit als Methode nicht anwendbar sein sollte (Jetter *et al.*, 2000) ist somit nicht berechtigt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch die Applikation von Diethylether-Ethanol allein keinen Effekt auf die Transpiration hatte. Die

Transpirationserhöhung nach Celluloseacetatanwendung ist dadurch zu erklären, dass Aceton als organisches Lösungsmittel die Transpirationsbarriere im Inneren der Kutikula tatsächlich angreift. Die Anwendung dieser Methode zur selektiven Entfernung der Oberflächenwachse und für parallele Transpirationsstudien empfiehlt sich daher nicht.

Epikutikuläre Wachse spielen weniger als Transpirationsbarriere eine Rolle, aber bei anderen Prozessen wie der UV-Reflektion (Jacobs *et al.*, 2007), der Selbstreinigung der Oberfläche (Neinhuis und Barthlott, 1997) und dem Schutz vor Mikroorganismen (Lindow und Brandl, 2003) und Herbivoren (Lemieux, 1996) sollte ihnen eine wichtige Rolle zukommen.

4.3 Die Kutikula als epiphyller Lebensraum

Die Oberflächen von Pflanzenblättern sind mit einer hohen Bakteriendichte ($10^6 - 10^7$ Zellen/cm²) besiedelt (Dulla *et al.*, 2005). Das Vorkommen und die Dichte von Bakterienpopulationen kann allerdings saisonal stark variieren. Verschiedene Blätter derselben Pflanze oder verschiedene Regionen eines Blattes (Kinkel *et al.*, 1995) können sich ebenfalls in ihrer Bakteriendichte und -zusammensetzung unterscheiden. Neben den Unterschieden zwischen verschiedenen Blättern oder verschiedenen Regionen eines Blattes wurden Unterschiede in der Bakterienzusammensetzung je nach Alter der Blätter (Ercolani, 1991) oder zwischen Blattober- und Unterseiten beschrieben (Krimm *et al.*, 2005). Aus der Luft gelangen die Bakterien durch Wind, Regen (Lindow, 1996) und über Insekten (Lilley *et al.*, 1997) auf die Blattoberfläche.

Die Besiedlung mit Bakterien hängt von den physiko-chemischen Eigenschaften der Oberfläche ab. Bakterien müssen sich vor Abwaschung durch Regen und vor Abwehung durch Wind schützen. Erst das Anhaften durch Pilli (Romantschuk, 1992) oder extrazelluläre Polymere (Beattie und Lindow, 1999) an die hydrophobe Blattoberfläche ermöglicht eine erfolgreiche Kolonisation des Blattes. Versuche an Maiswachsmutanten unterstreichen die Wichtigkeit der Wachskomposition beim Kolonisationsprozess durch Bakterien. Mutanten, die eine hydrophobere Oberfläche aufwiesen konnten in Versuchen nur schwer mit Bakterien kolonisiert werden (Beattie und Marcell, 2002). Weitere Versuche mit unterschiedlichen Luftfeuchtigkeiten haben gezeigt, dass die Besiedlungsdichte bei geringer Luftfeuchte gering, bei erhöhter Luftfeuchte höher ist (Monier und Lindow, 2003). Mikroskopische Untersuchungen haben ergeben, dass Bakterien nicht homogen auf der Blattoberfläche verteilt sind. Eine besonders hohe Dichte kann in der Nähe von Stomata (Mansvelt und Hattingh, 1987), an der Basis von Trichomen (Krimm *et al.*, 2005) und in der Nähe der Blattnervatur gefunden werden (Beattie und Lindow, 1999). Eine Erklärung für das erhöhte Vorkommen der Bakterien an diesen Stellen ist die erhöhte Nährstoff- und Wasserdiffusion aus dem Blattinneren an die Oberfläche, bedingt durch eine an diesen Stellen durchlässigere Kutikula. Neben den abiotischen Faktoren, die sich auf die Kolonisation und Komposition der Bakterienpopulationen auswirken, müssen Bakterien untereinander um die meist knappen Nährstoffe konkurrieren. Manche Bakterien produzieren und sondern Stoffe aus, die das Wachstum anderer Bakterien unterbinden (Kinkel und Lindow, 1993), oder die es ermöglichen weitere Bakterien in ihrer Umgebung wahrzunehmen und mit ihnen über *quorum sensing* zu kommunizieren (Cha *et al.*, 1998). Bakterien nutzen die Fähigkeit des *quorum sensings*, um Aggregate zu bilden, die sie u.a. vor Austrocknung schützen (Costerton *et al.*, 1995). Als weitere Anpassungen der Bakterien an den lebensfeindlichen Lebensraum Kutikula ist die aktive Reduktion der Bakterienzellgröße (Björklöf *et al.*, 2000) bei Nährstoffarmut oder das aktive Eindringen der Bakterien in das Pflanzeninnere zu

nennen. Um die Nährstoffverfügbarkeit auf der Blattoberfläche zu erhöhen, bilden manche Bakterien, wie auch *Pseudomonas syringae* Biotenside (Bunster *et al.*, 1989b), die die Oberflächenspannung von Wasser herabsetzen. Eine dadurch verbesserte Benetzung fördert die Bildung von Wasserfilmen auf der Blattoberfläche z. B. nach Regen, und erhöht somit den Diffusionsprozess von Ionen und organischen Molekülen aus dem Blatt an die Oberfläche (Knoll und Schreiber, 2000). Neben der Fähigkeit der Biotenside, die Oberflächenspannung von Wasser herabzusetzen und gleichzeitig die Verfügbarkeit der organischen Moleküle durch den *leaching* Prozess für Bakterien zu erhöhen, können sich die Bakterien aufgrund der Biotenside besser auf der heterogenen Blattoberfläche bewegen und so auch leichter durch Stomata ins Blattinnere gelangen. Einmal ins Blattinnere gelangt, können pathogene Bakterien Krankheiten auslösen (Beattie und Lindow, 1999) und sich in der gesamten Pflanze ausbreiten.

Der Einfluss biotensidproduzierender *Pseudomonas syringae* Bakterien, deren Überstände und auf gereinigten Extrakte auf die Transpiration von *Prunus laurocerasus* und *Populus canescens* Kutikulamembranen wurde untersucht. Es wurden die Arten *Prunus laurocerasus* und *Populus canescens* gewählt, da sie in der Literatur gut beschrieben sind (Kirsch *et al.*, 1997; Schreiber, 2001; Schreiber und Schönherr, 2009) und sich von ihren Blättern ohne weiteres Kutikulamembranen isolieren lassen. Ein rein visueller Vergleich zwischen den isolierten Kutikulamembranen der beiden Arten lässt die von *Prunus laurocerasus* stabiler erscheinen. Von *Populus canescens* Kutikulamembranen ist bekannt, dass sie eine hohe Dichte an polaren Poren aufweisen (Schreiber und Schönherr, 2009). Polare Poren zeigen eine lokal erhöhte Diffusion von organischen Substanzen aus dem Blattinneren an die Oberfläche. Da viele organische Substanzen der Pflanze und auch Ionen aufgrund ihrer Ladung und Größe nicht durch den lipophilen Teil der Kutikula diffundieren können, sind sie auf die Diffusion durch diese Bereiche angewiesen (Schönherr, 2000, 2001, 2002). Dies macht die Regionen der polaren Poren besonders attraktiv für die Besiedlung von Bakterien (Remus-Emsermann *et al.*, 2011). Für die Untersuchung der Fragestellung, ob die Transpiration der beiden Kutikularten nach den verschiedenen Behandlungen ansteigt, wurden experimentell unabhängige Ansätze gewählt. Die Pflanzenarten wurden auf ihre Wachszusammensetzung hin analytisch untersucht und miteinander verglichen. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Bakterien wurden durchgeführt und Bakteriensuspensionen, Überstände und auf gereinigte Extrakte rein visuell und durch Kontaktwinkelmessungen auf Tensidproduktion getestet. Neben der Verwendung von WT *Pseudomonas syringae* Bakterien wurden ferner Mutanten in den Transpirationsstudien verwendet, die ganz oder zum Teil in ihrer Fähigkeit zur Biotensidproduktion gestört sind. Die Durchführung von Transpirationsexperimenten sollte zur Aufklärung der Frage dienen, in wie weit die kutikuläre Barriere nach Inokulation mit Bakterien verändert wird. Diese Ansätze

sollen zu einem besseren Verständnis der Bakterienkolonisation und eventuellem Krankheitsbefall von Pflanzen durch Bakterien führen.

4.3.1 Analytische Untersuchungen

4.3.1.1 Gesamtwachsanalyse von *Prunus laurocerasus* und *Populus canescens* Kutikulamembranen

Die Diffusionsrate von Wasser und organischen Molekülen wird durch die Wachse (Summe aus epi- und intrakutikulären Wachsen) bestimmt. Voruntersuchungen haben zeigen können, dass weder die Dicke der Kutikulamembran, noch die Gesamtwachsmenge (Becker *et al.*, 1986) dabei ausschlaggebende Kriterien darstellen. Stattdessen scheint die Kristallinität der Wachse bzw. das Verhältnis von kristallinem zu amorphen Wachs eine entscheidende Rolle bei den Diffusionsprozessen zu spielen (Merk *et al.*, 1997; Schreiber *et al.*, 1997). Die Gesamtwachsanalysen von isolierten *Prunus laurocerasus* und *Populus canescens* Kutikulamembranen dienten dazu, die beiden Arten hinsichtlich ihrer Wachszusammensetzung zu vergleichen und diese Ergebnisse mit denen aus den mit Bakterien durchgeführten Transpirationsstudien in Verbindung zu setzen. Für *Prunus* konnte eine Gesamtwachsmenge von $84,42 \pm 9,63 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, bestehend aus 30 Einzelsubstanzen, identifiziert werden. Den größten Anteil am Wachs machten dabei die Triterpene gefolgt von den Alkanen aus (Abbildung 58). Im Vergleich zu *Prunus* konnte bei der chemisch analytischen Untersuchung der *Populus* Kutikulamembranen eine signifikant geringere Wachsmenge von $38,27 \pm 6,63 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ identifiziert werden. Das Wachs bestand nur aus langkettigen Aliphaten, Triterpene konnten nicht nachgewiesen werden (Abbildung 59). Die Verwendung dieser beiden Pflanzenarten, die sich nicht nur in ihrer Kutikuladicke und dem Vorkommen von polaren Poren, sondern auch in ihrer Wachsmenge und Zusammensetzung unterscheiden, machten sie besonders für Interaktionsstudien mit Oberflächenbakterien interessant.

4.3.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der *Pseudomonas syringae* Bakterien

Bakterien sind nicht homogen auf der pflanzlichen Kutikula verteilt. Das Zusammenlagern zu Aggregaten nutzen Bakterien, um sich vor abiotischen und biotischen Stressfaktoren zu schützen (Costerton *et al.*, 1995). Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der *Pseudomonas syringae* WT Bakterien auf einer isolierten *Prunus* Kutikulamembran konnten dies bestätigen (Abbildung 60). Die Bakterien lagern sich eng zu Aggregaten zusammen. Es scheint als würden sie zusätzlich durch ein extrazelluläres Polymer zusammengehalten.

4.3.3 Überprüfung der Bakteriensuspensionen, Überstände und Extrakte auf Tensidproduktion, Spreitungsverhalten auf Parafilm und Kontaktwinkelmessungen

Vor der Verwendung in Transpirationsstudien wurden die Bakteriensuspensionen, Überstände und grob auf gereinigten Extrakte auf Tensidproduktion untersucht. Das Schütteln der Bakterienkulturen führte außer bei der Dbl ko- Mutante zur Schaumbildung. Es konnte daher angenommen werden, dass die Biotenside Syringafaktin und/oder das Rhamnolipid bei allen Kulturen, außer bei den Dbl ko- Bakterien gebildet wurden. Aufgrund des *knockouts* in der Biosynthese der Biotenside konnten die Dbl ko- Bakterien als zusätzliche Negativkontrolle zu *Aqua demin* eingesetzt werden. Ein Vergleich zwischen dem Spreitungsverhalten von Tropfen der verschiedenen Bakterienstämme oder deren Überstände und *Aqua demin* auf Parafilm haben zeigen können, dass das Spreitungsverhalten der Bakterienkulturen und Überstände im Vergleich zu Wasser und der Dbl ko- Mutante größer ist (Abbildung 61). Tenside setzen die Oberflächenspannung von Wasser herab und erhöhen die Benetzungsfähigkeit der Oberfläche. Die Bildung der Biotenside und die damit einhergehende bessere Benetzungsfähigkeit der Oberfläche ist für *Pseudomonas syringae* Bakterien von großem Nutzen, da sie sich dadurch besser auf der hydrophoben Blattoberfläche fortbewegen können (Déziel *et al.*, 1999). Desweiteren bewirken die Biotenside, dass sich ein homogener Wasserfilm auf der Blattoberfläche bildet, der sie vor Austrocknung schützt (Beattie und Lindow, 1995) und den *leaching* Prozess erhöht (Knoll und Schreiber, 2000). Die nach Burch *et al.*, (2010) fertig hergestellten und für Transpirationsstudien verwendeten auf gereinigten Extrakte zeigten ein ähnliches Spreitungsverhalten wie das der Bakteriensuspensionen und Überstände. Bei allen Extrakten, bis auf den der Dbl ko- Bakterien, konnte auf Tensidproduktion geschlossen werden. Im Vergleich zu *Aqua demin* zeigten die Tropfen der auf gereinigten Extrakte ein größeres Spreitungsverhalten. Tropfen des Dbl ko- Extraktes verhielten sich hingegen wie *Aqua demin*, was das Fehlen der Biotenside in diesem Extrakt bestätigte. Problematisch bei

der Verwendung der Bakteriensuspensionen und Überstände ist, dass deren Gehalt nur durch die Einstellung der optischen Dichte innerhalb und zwischen den Versuchen konstant gehalten werden konnte. Eine exakte Bestimmung der Biotensidkonzentration war nicht möglich.

Ein Vergleich der Kontaktwinkelmessungen an unbehandelten *Prunus laurocerasus* und *Populus canescens* Kutikulamembranen macht deutlich, dass *Prunus* Kutikulamembranen mit einem Winkel von $82,95 \pm 11,89^\circ$ besser benetzbar sind als *Populus* Kutikulamembranen (Kontaktwinkel: $121 \pm 4,45^\circ$). Die unterschiedliche Wachszusammensetzung der Arten und auch die Struktur der Oberflächenwachse wirken sich dabei auf die Kontaktwinkelmessungen aus und machen den Vergleich dieser Arten in den Transpirationmessungen weiter interessant. Die Messung der Kontaktwinkel an isolierten Kutikulamembranen beider Pflanzenarten war nach der Vorbehandlung mit Phosphatpuffer bzw. Bakterien über Nacht nicht möglich. Die Wassertropfen spreiteten direkt auf der mit Salzen des Phosphatpuffers bedeckten Oberfläche. Die Oberfläche wurde durch die Vorbehandlung hydrophiler.

4.3.4 Transpirationmessungen

Alle durchgeführten Transpirationmessungen erfolgten über 100 % Luftfeuchtigkeit, um das Absterben der Bakterien und eine eventuelle Transpirationserhöhung durch abgegebene Enzyme zu verhindern. Des Weiteren konnte durch die Messung über 100 % Luftfeuchtigkeit sichergestellt werden, dass es nicht zur Kristallisation und Aufkonzentrierung der Biotenside während der Versuche kommt. Die Bakterienkulturen und Überstände wurden sowohl in Phosphatpuffer als auch in *Aqua demin* angesetzt. Das Ansetzen in Phosphatpuffer sollte das Absterben der Bakterienzellen durch osmotischen Stress verhindern. Um eine Antwort auf die Frage zu erhalten, ob die Bakterien, die Überstände, oder die Extrakte die kutikuläre Barriere der Pflanzen verändern, wurde die Wasserpermeabilität vor und nach der Behandlung gemessen und die Effekte berechnet. Aus der Literatur ist bekannt, dass der Transport von organischen Molekülen gut mit dem Wassertransport korreliert (Niederl *et al.*, 1998). Eine Erhöhung der Transpiration ist für die Bakterien nicht so relevant, sollte aber auf einen erhöhten Transport von Ionen und organischen Substanzen, die wichtige Nährstoffe darstellen, an die Blattoberfläche hindeuten. Eine Erhöhung in der Transpiration nach Behandlung ließe darauf schließen, dass die Bakterien in der Lage sind, aktiv die Durchlässigkeit der Kutikula zu verändern. In allen Versuchen wurde eine optische Dichte von 1 gewählt, was 10^8 Bakterienzellen pro Milliliter entspricht.

4.3.4.1 Einfluss tensidproduzierender Bakterien auf die Transpiration von *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen

Isolierte *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen wurden nach einer einstündigen Messung der Anfangstranspiration mit 100 µl der WT, Syf- und Dbl ko- Bakterien in Phosphatpuffer behandelt. Die Applikation der Dbl ko- Mutante diente dabei als Negativkontrolle zu den beiden anderen Bakterienstämmen, da die Bildung der Biotenside aufgrund des *knockouts* ausbleibt. Nach der Trocknungsphase über Nacht wurde die Transpiration erneut über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde gemessen. Sowohl die Applikation der WT Bakterien als auch die Applikation der MT Bakterien hatte einen Effekt auf die Transpiration der isolierten *Prunus* Kutikulamembranen (Abbildung 62). Da der Effekt nach Applikation der Dbl ko- Mutante tendenziell höher ist als der nach der WT- Applikation, musste darauf geschlossen werden, dass die Erhöhung der Transpiration durch den Einsatz des Phosphatpuffers und nicht durch die Biotenside zu erklären ist. Salze können die Transpiration von astomatären Kutikulamembranen erhöhen. Der Anstieg der Transpiration basiert auf dem Aufquellen der Kutikula und einer dadurch erhöhten Durchlässigkeit der polaren Poren (Elshatshat *et al.*, 2007). Neben dem Einfluss des Phosphatpuffers könnten des Weiteren Enzyme, die von den Bakterien während der Bakteriensuspensionsvorbereitung freigegeben wurden, für die Erhöhung der Transpiration verantwortlich sein.

4.3.4.2 Einfluss von Bakterienüberständen auf die Transpiration von *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen

Um den Einfluss von Bakterienzellen auf die Transpiration auszuschließen und nur den Effekt der produzierten Biotenside zu messen, wurden *Prunus* Kutikulamembranen nach einer einstündigen Messung der Anfangstranspiration mit 100 µl der WT und Syf-Überstände in Phosphatpuffer behandelt. Nach der Trocknungsphase über Nacht wurde die Transpiration erneut über einen mindestens einstündigen Zeitraum gemessen. Nach der Behandlung mit dem WT-Überstand konnte ein leichter Anstieg in der Transpiration verzeichnet werden. Kein Effekt konnte nach der Behandlung mit dem Überstand beobachtet werden, der von Bakterien stammte, die in der Siringafaktin-Produktion einen *knockout* aufwiesen (Abbildung 63). Im Vergleich zu den mit Bakteriensuspensionen durchgeführten Transpirationmessungen scheint die Verwendung des Phosphatpuffers bei der Applikation von Bakterienüberständen keinen Effekt auf die Transpiration zu haben. Die Erhöhung der Transpiration ist demnach auf die Bakterienzellen zurückzuführen. Im Vergleich zu synthetischen Tensiden ist die Erhöhung der Transpiration nach Applikation des WT-Überstandes vergleichsweise gering. Je nach Größe und Polarität der eingesetzten synthetischen Tenside, kann die Transpiration um 1-2 Größenordnungen ansteigen (Schreiber und Schönherr, 2009). Für diese ausgeprägte Zunahme des kutikulären

Transports ist die Voraussetzung eine Sorption der ungeladenen Tenside in der transportlimitierenden Barriere der Kutikula (Baur, 1999). Die von *Pseudomonas syringae* produzierten Biotenside sind aber geladen und sie weisen im Vergleich zu den meisten getesteten synthetischen Tensiden eine sehr hohe Molekülmasse auf (Déziel *et al.*, 1999; Berti *et al.*, 2007). Aufgrund der Polarität und Größe ist das Eindringen der Biotenside in die Kutikula auszuschließen. Vielmehr ist eine Wirkungsweise als *humectants* an der Blattoberfläche wahrscheinlich. Die lipophilen Fettsäurereste der Biotenside könnten sich an die lipophilen Oberflächenwachse anlagern, die polaren Reste wären der Atmosphäre zugewandt und könnten Wasser binden und so die Nährstoffverfügbarkeit erhöhen.

4.3.4.3 Einfluss von auf gereinigten Biotensid-Extrakten auf die Transpiration von *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen

Neben der Verwendung von Bakteriensuspensionen und Überständen wurde ferner der Effekt grob auf gereinigter Extrakte (Burch *et al.*, 2010) auf die Transpiration von *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen untersucht. Die Herstellung der auf gereinigten Extrakte umfasste das mehrmalige Waschen der Bakteriensuspensionen mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität und anschließender Trocknung. Die so hergestellten Extrakte wurden mit *Aqua demin* versetzt, gevortext und nach einer mindestens einstündigen Messung der Anfangstranspiration auf die Membranen appliziert. Die Extrakte wurden mit *Aqua demin* statt Phosphatpuffer versetzt, um einen Anstieg der Transpiration durch die darin gelösten Salze (Elshatshat *et al.*, 2007) zu verhindern. Ein Anstieg der Transpiration durch Bakterienzellen und/oder freigesetzte Enzyme kann durch die Applikation der Extrakte ausgeschlossen werden. Durch den Einsatz der auf gereinigten Extrakte in Transpirationsexperimenten bestand die Möglichkeit, den reinen Wirkungsmechanismus der von *Pseudomonas syringae* Bakterien produzierten Biotenside näher zu untersuchen. Ein Vergleich zwischen den Effekten und auch der Vergleich zwischen den verschiedenen Transpirationskinetiken (Abbildung 64) machte deutlich, dass die Applikation des Rh1a-Extrakts tendenziell zu einer Erhöhung in der Transpiration führte. Das Rh1a-Extrakt stammte von Bakterien, die das Syringafaktin bilden konnten, aber in der Biosynthese des Rhamnolipids einen *knockout* aufwiesen. Die leichte Erhöhung der Transpiration beruht demnach rein auf dem Biotensid Syringafaktin, welches aufgrund der Polarität und Größe nicht in die Kutikula eindringt, sondern an der Oberfläche wirkt. Die Applikation der beiden anderen Extrakte hatte im Vergleich zum Rh1a-Extrakt keinen Einfluss auf die Transpiration. Grund hierfür ist, dass das Rh1a-/Syf-Extrakt von Bakterien isoliert wurde, die in der Produktion beider Biotenside einen *knockout* aufwiesen. Durch die Applikation dieses Extraktes wurde somit rein der Effekt von Wasser auf die Transpiration gemessen. Mit einem Effekt von $0,97 \pm 0,14$ kommt dieser dem in einem anderen Zusammenhang gemessenen

Effekt für Wasser (Abbildung 57) und dem aus der Literatur bekannten Effekt sehr nahe (Krimm *et al.*, 2005). Das als HAA (*3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alcanoic acid*) benannte Extrakt enthielt Vorläuferprodukte (*precursors*) des Rhamnolipidbiosyntheseweges. Die genaue physiologische Rolle dieser Vorläuferprodukte ist nicht bekannt. Ihnen wird eine Funktion als oberflächenaktive Substanzen zugesprochen (Déziel *et al.*, 2003), die die Fortbewegung von Bakterien auf der hydrophoben Blattoberfläche erleichtern. Ein Grund für das Ausbleiben einer Transpirationserhöhung nach Applikation des HAA Extraktes könnte das Fehlen der als Biotensid benötigten Eigenschaften sein. HAA ist noch kein fertig ausgebildetes Biotensid, sondern eine Vorstufe dazu.

4.3.4.4 Einfluss tensidproduzierender Bakterien auf die Transpiration von *Populus canescens* Kutikulamembranen

Als Vergleich zu den an *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen durchgeführten Transpirationsexperimenten wurde ferner der Effekt von Bakteriensuspensionen auf die Transpiration von *Populus canescens* Kutikulamembranen untersucht. Da die gemessenen Effekte bei *Prunus* nach den verschiedenen Applikationen tendenziell gering und weitere Untersuchungen zur Wirkungsweise der Biotenside angestrebt wurden, wurde *Populus* als weitere Art ausgewählt. Die Kutikulamembran von *Populus* unterscheidet sich in ihrer Wachsmenge und Zusammensetzung, den Benetzungseigenschaften und dem Vorkommen von polaren Poren (Schönherr und Schreiber, 2004) von der von *Prunus*. Neben diesen Unterschieden weist *Populus* mit $2,68 \times 10^{-9}$ m/s (Schreiber und Schönherr, 2009) einen höheren Leitwert auf. Bakterien siedeln sich bevorzugt in der Nähe von polaren Poren an, da dort die Diffusion von organischen Substanzen, wie Fruktose, erhöht ist (Remus-Emsermann *et al.*, 2011). Da ein Co-Transport zwischen Wasser und organischen Substanzen besteht (Niederl *et al.*, 1998), sollte eine Erhöhung der Transpiration sich auch in einer Erhöhung der Verfügbarkeit organischer Substanzen zeigen. Desweiteren würde eine deutliche Erhöhung in der Transpiration von *Populus* Kutikulamembranen für eine Wirkungsweise der Biotenside an den polaren Poren sprechen. Dieser lokalen Wirkungsweise der Tenside konnte bei *Prunus laurocerasus* Membranen aufgrund der fehlenden polaren Poren nicht nachgegangen werden.

Populus canescens Kutikulamembranen wurden nach einer zweistündigen Messung der Anfangstranspiration mit 100 μ l in *Aqua demin* gelöste WT-, bzw. Syf- Bakterien behandelt. Nach der Trocknungsphase über Nacht wurde die Transpiration erneut über einen Zeitraum von zwei Stunden gemessen. Die gemittelten Kinetiken aber auch die Effekte machen deutlich, dass die Transpiration nach WT Bakterienapplikation leicht ansteigt (Abbildung 65). Die Applikation der Syf-Bakterien (*knockout* in der Syringafaktinbiosynthese) führt im Vergleich zur WT Applikation zu keiner Erhöhung der Transpiration (Effekt: $0,94 \pm 0,14$).

Diese Ergebnisse stimmen mit denen von applizierten Bakterienüberständen auf *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen überein. Die Applikation des WT-Überstandes hatte einen Effekt auf die Transpiration, die Applikation des Syf-Überstandes jedoch nicht (Abbildung 63). Grund für das Ausbleiben einer Transpirationserhöhung nach Applikation der Syf-Bakterien könnte das Fehlen des Biotensids Syringafaktin sein. Das Rhamnolipid hat aufgrund seiner chemischen Struktur nicht so stark ausgeprägte Biotensideigenschaften wie das Syringafaktin. Es scheint eine größere Rolle bei der *swarming motility*, der Fortbewegung von Bakterien auf der Blattoberfläche, zu übernehmen. Die durch die Verwendung von *Populus* Kutikulamembranen erhöhte Wirksamkeit der Biotenside konnte nicht festgestellt werden. Die gemittelten Effekte ähneln denen von *Prunus laurocerasus* Kutikulamembranen. Dies unterstreicht erneut die Annahme, dass die Biotenside aufgrund ihrer Größe und Polarität auch nicht bevorzugt an den polaren Poren wirken. Vielmehr ist es ein Grenzflächeneffekt, der zu der leichten Erhöhung der Transpiration führt. Ein weiterer Grund für das Ausbleiben von großen Effekten könnte der experimentelle Aufbau und die Art der Effektberechnung sein. Lokale Erhöhungen in der Transpiration, wie z.B. an polaren Poren (Remus-Emsermann *et al.*, 2011) können nicht erkannt werden, da die Transpiration über die gesamte Kutikulafäche berechnet wird.

4.3.4.5 Einfluss von Bakterienüberständen auf die Transpiration von *Populus canescens* Kutikulamembranen

Neben der Verwendung von Bakteriensuspensionen wurde auch der Effekt von Bakterienüberständen auf die Transpiration von *Populus* Kutikulamembranen untersucht. In dem ersten experimentellen Ansatz wurden die Bakterien in Phosphatpuffer gelöst und abzentrifugiert. Nach einer zweistündigen Messung der Anfangstranspiration über 100 % Luftfeuchte wurden die Kutikulamembranen mit dem WT- und Syf- (kein Syringafaktin, nur Rhamnolipid) Überstand behandelt. Als Negativkontrolle diente die Applikation von Phosphatpuffer. Die Behandlung mit Phosphatpuffer erfolgte um sicherzustellen, dass eine eventuelle Erhöhung in der Transpiration nicht aufgrund der gelösten Salze erfolgte. Die gemittelten Kinetiken der verschiedenen Behandlungen und die errechneten Effekte (Abbildung 66) konnten zeigen, dass die Transpiration nach der Behandlung mit den Überständen, als auch nach der Applikation des Phosphatpuffers anstieg. Die gemittelten Effekte der verschiedenen Behandlungen sind statistisch nicht verschieden voneinander und kommen dem von Phosphatpuffer sehr nahe. Da die Effekte der biotensidhaltenden Überstände in etwa gleich groß sind und sich von dem von Phosphatpuffer nicht unterscheiden, kann darauf geschlossen werden, dass die Erhöhung in der Transpiration allein durch die Salze und nicht durch die Biotenside zu erklären ist. Salze können den Ionisationsgrad der Säuregruppen im Kutin erhöhen. Die Kutikula schwillt an, der Wassergehalt in der Kutinmatrix ist erhöht und die Permeabilität steigt (Elshatshat *et al.*, 2007). Um eine Erhöhung der Transpiration durch die Verwendung des Puffers auszuschließen und um den Effekt der reinen biotensidhaltenden Überstände besser untersuchen zu können, wurden die Bakterienüberstände in einem zweiten experimentellen Ansatz in *Aqua demin* statt Phosphatpuffer angesetzt. Die Kutikulamembranen wurden, wie schon im ersten Durchgang, nach der zweistündigen Messung der Anfangstranspiration mit den Überständen, bzw. *Aqua demin* behandelt. Nach der Trocknung über Nacht wurde die Transpiration erneut über einen Zeitraum von zwei Stunden gemessen. Neben der Applikation des WT- und Syf- Überstandes wurde zusätzlich der Effekt des Dbl ko-Überstandes untersucht. Da der Dbl ko-Überstand von Bakterien stammte, die in der Synthese der beiden Biotenside einen *knockout* aufweisen, kann er als zusätzliche Negativkontrolle angesehen werden. Weder die Applikation der verschiedenen Bakterienüberstände, noch die Applikation von *Aqua demin* führte zu einer Erhöhung der Transpiration. Die gemittelten Kinetiken verliefen nach den Behandlungen linear (Abbildung 67). Der Grund für das Ausbleiben eines Effekts könnte erneut die nur annähernd über die OD der Bakterien bestimmte Biotensidkonzentration sein. Die Schaumbildung nach Schütteln der WT- und Syf- Überstände wies auf oberflächenaktive Substanzen, nicht aber auf ihre Konzentration hin. Die Menge der gebildeten Biotenside hängt stark von dem

physiologischen Zustand der Bakterien ab. Voruntersuchungen haben zeigen können, dass sie die Biotenside bei Nährstoffmangel auch wieder als C-Quelle nutzen und konsumieren (persönliche Mitteilung A. Burch). Dies würde zu einer verringerten Biotensidkonzentration und dem Ausbleiben eines Effektes führen.

4.3.5 Die Kutikula als epiphyller Lebensraum, Zusammenfassung

Die Kombination aus chemisch-analytischen Untersuchungen, Rasterelektronenmikroskopie, Kontaktwinkel- und Transpirationmessungen ermöglichte es, den Einfluss von *Pseudomonas syringae* Bakterien, Überständen und Extrakten auf die Transpiration isolierter Kutikulamembranen zu untersuchen. Die Verwendung von Kutikulamembranen zweier Arten, die sich in ihrer Wachsmenge und Zusammensetzung, ihren Benetzungseigenschaften, dem Vorkommen von polaren Poren und ihren Leitwerten unterscheiden (Schreiber und Schönherr, 2009), sollte ferner Aufschlüsse über die potentielle Wirkungsweise der Biotenside geben. Isolierte Kutikulamembranen eignen sich als Modellsystem für bakterielle Interaktionsstudien. Die Versuche können unter kontrollierten Versuchsbedingungen wie z.B. konstanter Luftfeuchtigkeit, durchgeführt werden. Da das lebende Gewebe der Blätter während der Kutikulaisolation verdaut wird, können Parameter, wie die potentielle Produktion von antimikrobiellen Wirkstoffen durch das lebende Blatt, ausgeschlossen werden. Auf steriles Arbeiten wurde während den Transpirationmessungen verzichtet. Bei der hohen *Pseudomonas syringae* Bakteriendichte (10^8 Bakterien/ml) hätte das Vorkommen vereinzelter Bakterien einer anderen Art kaum einen Einfluss auf die Durchführung der Versuche gehabt. Des Weiteren wird durch den Verzicht auf steriles Arbeiten die Interaktion zwischen Bakterien und Kutikulamembranen möglichst realistisch gestaltet.

Kontaktwinkelmessungen und die visuelle Überprüfung des Spreitungsverhaltens von Tropfen der Bakteriensuspensionen, Überständen und auf gereinigten Extrakten haben das Vorhandensein bzw. Fehlen (Dbl ko-) der Biotenside belegen können. Eine nähere Bestimmung der Biotensidkonzentration, außer über die optische Dichte der Bakterien, war experimentell nicht möglich. Eine Auftrennung und gaschromatographische Konzentrationsbestimmung würde es ermöglichen verschiedene Verdünnungsreihen zu erstellen und den Effekt dieser Konzentrationen auf die Transpiration besser zu untersuchen. Die Verwendung von Phosphatpuffer eignete sich als Bakteriennährlösung für die hier durchgeführten Messungen nicht, da die Salze allein zu einem Anstieg in der Transpiration führten (Elshatshat *et al.*, 2007). Da es sich bei den Versuchen nie um Langzeitexperimente über mehrere Tage handelte, kann ein Absterben der Bakterien aufgrund von Nährstoffmangel ausgeschlossen werden. Die Durchführung von Langzeitexperimenten könnte bei der Aufklärung der Biotensidwirkung helfen. Die errechneten Effekte stammten von Messungen, die höchstens über einen zweistündigen Zeitraum nach

Bakteriensuspension- und Überstandapplikation erfolgt sind. Biotenside werden von Bakterien nicht nur zur Verbesserung der Fortbewegung gebildet, sondern auch, um den *leaching* Prozess zu erhöhen (Tukey, 1970). Die Bakterien haben möglicherweise innerhalb dieser kurzen Zeit keinen Nährstoffmangel auf der Kutikulamembran erlitten, daher keine weiteren Biotenside gebildet und ein Effekt auf die Transpiration blieb aus. Neben der Durchführung von Kurzzeitexperimenten kann das Ausbleiben eines Transpirationseffektes durch die Struktur der Tenside erklärt werden. Aufgrund der chemischen Eigenschaften und Größe der Biotenside kann eine Wirkung der Biotenside in tieferen Schichten der Kutikulamembran ausgeschlossen werden. Vielmehr ist ein Grenzflächeneffekt und eine Wirkung als *humectant* wahrscheinlich. Eine Optimierung des Versuchsaufbaus, z.B. durch das Einsetzen von Bioreportern (Remus-Emsermann *et al.*, 2011), könnte zur lokalen Aufklärung potentieller Transpirationserhöhungen führen. Mit diesem experimentellen Ansatz war die Berechnung der Effekte nur über die gesamte Kutikulafäche möglich. Lokale Erhöhungen der Transpiration an den von Bakterien bevorzugten Stellen konnten hier nicht berücksichtigt werden.

5 Zusammenfassung

Alle primären oberirdischen Pflanzenorgane werden von der Kutikula bedeckt, die die Grenzfläche zwischen Pflanze und Umwelt bildet. Die Kutikula ist eine extrazelluläre lipophile Membran, bestehend aus dem Polymer Kutin und ein- und aufgelagerten Wachsen. Ihre wichtigste Funktion ist der Schutz der Pflanze vor Austrocknung und Pathogenbefall. Im Rahmen dieser Dissertation wurden unter Verwendung mikroskopischer, chemisch-analytischer und transportphysiologischer Methoden verschiedene strukturelle und funktionelle Aspekte der pflanzlichen Kutikula untersucht.

Detaillierte Untersuchungen der Oberflächeneigenschaften der Blätter der vier wichtigen Nutzpflanzen Kartoffel (*Solanum tuberosum*), Tomate (*Solanum lycopersicum*), Wein (*Vitis vinifera*) und Apfel (*Malus domestica*) ergaben deutliche Unterschiede im Wachsgehalt, im Substanzklassenspektrum der Wachse, in der Stomatalokalisation und in den Benetzungseigenschaften dieser Arten. Die beiden Solanacaen (Tomate und Kartoffel) wiesen Stomata auf beiden Blattseiten auf. Das Substanzklassenspektrum der Wachse war gering und wurde von langkettigen linearen und verzweigten Alkanen dominiert. Stängel und Blätter wiesen eine hohe Trichomdichte auf. Bei Wein und Apfel befanden sich die Stomata nur auf der Blattunterseite, die Trichomdichte war vergleichsweise gering und beide Arten wiesen ein komplexes Wachsmuster mit einem hohen Substanzklassenspektrum auf. Indirekte Messungen zur kutikulären Permeabilität mit Hilfe des Photosyntheseinhibitors Bentazon und der Chlorophyll-Fluoreszenz Methode zeigten eine sehr schnelle Hemmung der Photosynthese bei beiden Solanacaen im Gegensatz zu Wein und Apfel. Diese Ergebnisse sind für die Optimierung der Wirkstoffaufnahme von entscheidender Bedeutung. Sie belegen die deutlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Kulturpflanzen und sie stellen die oftmals ausschließliche Verwendung von Modellsystemen zur Optimierung der Wirkstoffaufnahme in Kulturpflanzen, wie z. B. das Arbeiten mit isolierten Kutikularmembranen von astomatären, trichomfreien Blättern, in Frage.

Der Beitrag der epikutikulären Wachse zur Etablierung der kutikulären Transpirationsbarriere sollte mittels Radiotracer-Studien untersucht werden. Rasterelektronenmikroskopische und chemisch-analytische Untersuchungen zeigten, dass die epikutikulären Wachse von elf verschiedenen Arten mit einer zweifachen Kollodiumbehandlung vollständig entfernt werden konnten. Die kutikuläre Permeabilität von radioaktivem Wasser änderte sich nach der Entfernung der epikutikulären Wachse mittels Kollodium nicht. Damit konnte für die hier untersuchten Arten zum ersten Mal gezeigt werden, dass die epikutikulären Wachse keinen wesentlichen Beitrag zu kutikulären Transportbarriere leisten. Die hier gewonnen experimentellen Befunde widerlegen die immer wieder in der Literatur zu findende spekulative Aussage, die epikutikulären Wachse würden die kutikuläre Transpirationsbarriere ausbilden. Die Funktion der epikutikulären Oberflächenwachse scheint demnach nicht darin zu liegen, die Transpirationsbarriere auszubilden. Sie sind vielmehr in anderen wichtigen

Prozessen wie dem Lotus-Effekt, Schutz vor UV-Strahlung und Schutz vor Mikroorganismen und Herbivoren involviert.

Die Kutikula bildet für Mikroorganismen (Bakterien, Pilzen und Hefen) den natürlichen Lebensraum. Das epiphyllle Bakterium *Pseudomonas syringae* zeichnet sich durch die Bildung von Biotensiden aus, die ihre Fortbewegung auf der sehr hydrophoben Blattoberfläche verbessern. In transportphysiologischen Untersuchungen sollte untersucht werden, ob die Permeabilität isolierter Kutikularmembranen der Blätter von Pappel (*Populus canescens*) und Kirschlorbeer (*Prunus laurocerasus*) durch Biotenside, ähnlich wie durch synthetische Tenside erhöht wird. Nach Inokulation der Kutikula mit Biotensidproduzierenden Bakterien, Überständen und dem auf gereinigten Biotensid wurden keine oder nur minimale Erhöhungen der kutikulären Transpiration beobachtet. Diese Ergebnisse zeigten, dass im Gegensatz zu den technischen Tensiden, die vergleichsweise großen und sehr polaren Biotenside keine Permeabilitätsänderungen der Kutikula bewirken können.

6 Literaturverzeichnis

- Adamson A** (1960) Physical chemistry of surfaces. Wiley, New York
- Baker E** (1974) The influence of environment on leaf wax development in *Brassica oleracea* var. gemmifera. *New Phytologist* **73**: 955-966
- Barthlott W, Neinhuis C** (1997) Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta* **202**: 1-8
- Baur P** (1998) Mechanistic aspects of foliar penetration of agrochemicals and the effect of adjuvants. *Recent Research Developments in Agricultural and Food Chemistry* **2**: 809-837
- Baur P** (1999) Surfactant Effects on Cuticular Penetration of Neutral Polar Compounds: Dependence on Humidity and Temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 753-761
- Baur P, Terence Grayson B, Schönherr J** (1996) Concentration-Dependent Mobility of Chlorfenvinphos in Isolated Plant Cuticles. *Pesticide Science* **47**: 171-180
- Beattie G, Lindow S** (1995) The Secret Life of Foliar Bacterial Pathogens on Leaves. *Annual Review of Phytopathology* **33**: 145-172
- Beattie G, Lindow S** (1999) Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology* **89**: 353-359
- Beattie G, Marcell L** (2002) Comparative Dynamics of Adherent and Nonadherent Bacterial Populations on Maize Leaves. *Phytopathology* **92**: 1015-1023
- Becker M, Kerstiens G, Schönherr J** (1986) Water permeability of plant cuticles: permeance, diffusion and partition coefficients. *Trees* **1**: 54-60
- Bensalem-Fnayou A, Jellouli N, Bouamama B, Mliki A, Ghorbel A** (2009) Investigations on the leaf surface ultrastructure in grapevine (*Vitis vinifera* L.) by scanning microscopy. *Scanning* **31**: 127-131
- Berti A, Greve N, Christensen Q, Thomas M** (2007) Identification of a Biosynthetic Gene Cluster and the Six Associated Lipopeptides Involved in Swarming Motility of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Journal of Bacteriology* **189**: 6312-6323
- Bhushan B, Koch K, Jung Y** (2008) Nanostructures for superhydrophobicity and low adhesion. *Soft Matter* **4**: 1799-1804
- Bird D** (2008) The role of ABC transporters in cuticular lipid secretion. *Plant Science* **174**: 563-569
- Björklöf K, Nurmiäho-Lassila E, Klinger N, Haahtela K, Romantschuk M** (2000) Colonization strategies and conjugal gene transfer of inoculated *Pseudomonas syringae* on the leaf surface. *Journal of Applied Microbiology* **89**: 423-432
- Bringe K, Schumacher C, Schmitz-Eiberger M, Steiner U, Oerke E-C** (2006) Ontogenetic variation in chemical and physical characteristics of adaxial apple leaf surfaces. *Phytochemistry* **67**: 161-170
- 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
- Bukovac M, Petracek P** (1993) Characterizing pesticide and surfactant penetration with isolated plant cuticles. *Pesticide Science* **37**: 179-194
- Bunster L, Fokkema N, Schippers B** (1989a) Effect of surface-active *Pseudomonas* spp. on leaf wettability. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 1340-1345
- Bunster L, Fokkema NJ, Schippers B** (1989b) Effect of surface-active *Pseudomonas* spp. on leaf wettability. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 1340-1345
- Burch A, Shimada B, Browne P, Lindow S** (2010) Novel high-throughput detection method to assess bacterial surfactant production. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 5363-5372
- Burghardt M, Friedmann A, Schreiber L, Riederer M** (2006) Modelling the effects of alcohol ethoxylates on diffusion of pesticides in the cuticular wax of *Chenopodium album* leaves. *Pest Management Science* **62**: 137-147
- Buschhaus C, Herz H, Jetter R** (2007) Chemical composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on the adaxial side of *Ligustrum vulgare* leaves. *New Phytologist* **176**: 311-316

- Buschhaus C, Jetter R** (2010) Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: How do plants seal their epidermal surfaces? *Journal of Experimental Botany* **62**: 841-853
- Buschhaus C, Jetter R** (2012) Composition and physiological function of the wax layers coating *Arabidopsis* leaves: β -amyirin negatively affects the intracuticular water barrier. *Plant Physiology* **160**: 1120-1129
- Cape J** (1983) Contact angles of water droplets on needles of Scots Pine (*Pinus sylvestris*) growing in polluted atmospheres. *New Phytologist* **93**: 293-299
- Casado C, Heredia A** (1999) Structure and dynamics of reconstituted cuticular waxes of grape berry cuticle (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Experimental Botany* **50**: 175-182
- Cha C, Gao P, Chen Y-C, Shaw P, Farrand S** (1998) Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 1119-1129
- Chamel A, Pineri M, Escoubes M** (1991) Quantitative determination of water sorption by plant cuticles. *Plant, Cell and Environment* **14**: 87-95
- Cheng Y, Rodak D, Wong C, Hayden C** (2006) Effects of micro-and nano-structures on the self-cleaning behaviour of lotus leaves. *Nanotechnology* **17**: 1359
- Costerton J, Lewandowski Z, Caldwell D, Korber D, Lappin-Scott H** (1995) Microbial biofilms. *Annual Reviews in Microbiology* **49**: 711-745
- Déziel E, Lepine F, Dennie D, Boismenu D, Mamer OA, Villemur R** (1999) Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Molecular and Cell Biology of Lipids* **1440**: 244-252
- Déziel E, Lépine F, Milot S, Villemur R** (2003) rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* **149**: 2005-2013
- Draber W, Kluth J, Tietjen K, Trebst A** (1991) Herbizide in der Photosyntheseforschung. *Angewandte Chemie* **103**: 1650-1663
- Duda J, Zielinski J** (1996) Free-volume theory. *Plastics Engineering, New York* **32**: 143-171
- Dulla G, Marco M, Quinones B, Lindow S** (2005) A closer look at *Pseudomonas syringae* as a leaf colonist. *American Society for Microbiology* **71**: 469
- Ebert E, Kreuz K** (1991) Die Selektivität von Herbiziden. *Das Prinzip der Safener. Biologie in unserer Zeit* **21**: 298-306
- Edwards D, Abbott G, Raven J** (1996) Cuticles of early land plants: a palaeoecophysiological evaluation. *In Plant cuticles: an integrated functional approach*. BIOS Scientific Publishers Ltd.: Oxford, UK, pp 1-31
- Elshatshat S, Schreiber L, Schönherr J** (2007) Some cesium and potassium salts increase the water permeability of stomatous isolated plant cuticles. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **170**: 59-64
- Ensikat H, Mayser M, Barthlott W** (2012) Superhydrophobic and Adhesive Properties of Surfaces: Testing the Quality by an Elaborated Scanning Electron Microscopy Method. *Langmuir* **28**: 14338-14346
- Ensikat H, Neinhuis C, Barthlott W** (2000) Direct Access to Plant Epicuticular Wax Crystals by a New Mechanical Isolation Method. *International Journal of Plant Sciences* **161**: 143-148
- Ercolani G** (1991) Distribution of epiphytic bacteria on olive leaves and the influence of leaf age and sampling time. *Microbial Ecology* **21**: 35-48
- Espelie K, Davis R, Kolattukudy P** (1980) Composition, ultrastructure and function of the cutin-containing and suberin-containing layers in the leaf, fruit peel, juice-sac and inner seed coat of grapefruit (*Citrus-paradisi* Macfed.). *Planta* **149**: 498-511
- Fang X, Qiu F, Yan B, Wang H, Mort A, Stark R** (2001) NMR studies of molecular structure in fruit cuticle polyesters. *Phytochemistry* **57**: 1035
- Garrec J-P, Henry C, Le Maout L** (1995) Cire epi-et intracuticulaires: etude de leur separation, de leurs caracteristiques chimiques et de leurs roles respectifs dans la permeabilite cuticulaire. *Environmental and Experimental Botany* **35**: 399-409

- Geyer U, Schönherr J** (1990) The effect of the environment on the permeability and composition of *Citrus* leaf cuticles. *Planta* **180**: 147-153
- Goffreda J, Steffens J, Mutschler M** (1990) Association of epicuticular sugars with aphid resistance in hybrids with wild tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **115**: 161-165
- Guhling O, Hobl B, Yeats T, Jetter R** (2006) Cloning and characterization of a lupeol synthase involved in the synthesis of epicuticular wax crystals on stem and hypocotyl surfaces of *Ricinus communis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **448**: 60-72
- Gülz P** (1994) Epicuticular leaf waxes in the evolution of the plant kingdom. *Journal of Plant Physiology* **143**: 453-464
- Haas K, Rentschler I** (1984) Discrimination between epicuticular and intracuticular wax in blackberry leaves: Ultrastructural and chemical evidence. *Plant Science Letters* **36**: 143-147
- Hall F, Downer R, Cooper J, Ebert T, Ferree D** (1997) Changes in spray retention by apple leaves during a growing season. *HortScience* **32**: 858-860
- Holloway P** (1970) Surface factors affecting the wetting of leaves. *Pesticide Science* **1**: 156-163
- Holloway P** (1971) The chemical and physical characteristics of leaf surfaces. Sect. I, Chap. 2. *In*. Preece, T, F., Dickinson, C, H ed (s). *Ecology of leaf surface micro-organisms*. Academic Press
- Huber R, Otto S** (1994) Environmental behavior of bentazon herbicide. *In* *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer, pp 111-134
- Hunt G, Baker E** (1980) Phenolic constituents of tomato fruit cuticles. *Phytochemistry* **19**: 1415-1419
- Jacobs J, Koper G, Ursem W** (2007) UV protective coatings: A botanical approach. *Progress in Organic Coatings* **58**: 166-171
- Jeffree C** (1986) The cuticle, epicuticular waxes and trichomes of plants, with reference to their structure, functions and evolution. *In* *Insects and the Plant Surface*, Edward Arnold, pp 23-64
- Jetter R, Kunst L, Samuels A** (2008) 4 Composition of plant cuticular waxes. *Annual Plant Reviews, Biology of the Plant Cuticle* **23**: 145
- Jetter R, Schäffer S** (2001) Chemical Composition of the *Prunus laurocerasus* Leaf Surface. Dynamic Changes of the Epicuticular Wax Film during Leaf Development. *Plant Physiology* **126**: 1725-1737
- Jetter R, Schäffer S, Riederer M** (2000) Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L. *Plant, Cell & Environment* **23**: 619-628
- Kamp H** (1930) Untersuchungen über Kutikularbau und kutikuläre Transpiration von Blättern. *Jahrbuch für wissenschaftlichen Botanik* **72**: 403-465
- Kang J-H, Shi F, Jones A, Marks M, Howe G** (2010) Distortion of trichome morphology by the hairless mutation of tomato affects leaf surface chemistry. *Journal of Experimental Botany* **61**: 1053-1064
- Kinkel L, Lindow S** (1993) Invasion and exclusion among coexisting *Pseudomonas syringae* strains on leaves. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 3447-3454
- Kinkel L, Wilson M, Lindow S** (1995) Effect of sampling scale on the assessment of epiphytic bacterial populations. *Microbial Ecology* **29**: 283-297
- Kirkwood R** (1999) Recent developments in our understanding of the plant cuticle as a barrier to the foliar uptake of pesticides. *Pesticide Science* **55**: 69-77
- Kirsch T, Kaffarnik F, Riederer M, Schreiber L** (1997) Cuticular permeability of the three tree species *Prunus laurocerasus* L., *Ginkgo biloba* L. and *Juglans regia* L.: comparative investigation of the transport properties of intact leaves, isolated cuticles and reconstituted cuticular waxes. *Journal of Experimental Botany* **48**: 1035-1045
- Knoche M, Peschel S, Hinz M, Bukovac M** (2000) Studies on water transport through the sweet cherry fruit surface: characterizing conductance of the cuticular membrane using pericarp segments. *Planta* **212**: 127-135

- Knoll D, Schreiber L** (1998) Influence of epiphytic micro-organisms on leaf wettability: wetting of the upper leaf surface of *Juglans regia* and of model surfaces in relation to colonization by micro-organisms. *New Phytologist* **140**: 271-282
- Knoll D, Schreiber L** (2000) Plant–microbe interactions: wetting of Ivy (*Hedera helix* L.) leaf surfaces in relation to colonization by epiphytic microorganisms. *Microbial Ecology* **40**: 33-42
- Koch K, Barthlott W** (2009) Superhydrophobic and superhydrophilic plant surfaces: an inspiration for biomimetic materials. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **367**: 1487-1509
- Koch K, Neinhuis C, Ensikat H-J, Barthlott W** (2004) Self assembly of epicuticular waxes on living plant surfaces imaged by atomic force microscopy (AFM). *Journal of Experimental Botany* **55**: 711-718
- Köhler W, Schachtel G, Voleske P** (2012) Biostatistik. In Springer, Berlin Heidelberg,
- Kolattukudy P** (1981) Structure, Biosynthesis, and Biodegradation of Cutin and Suberin. *Annual Review of Plant Physiology* **32**: 539-567
- Krimm U, Abanda-Nkpawatt D, Schwab W, Schreiber L** (2005) Epiphytic microorganisms on strawberry plants (*Fragaria ananassa* cv. Elsanta): identification of bacterial isolates and analysis of their interaction with leaf surfaces. *FEMS Microbiology Ecology* **53**: 483-492
- Kunst L, Samuels A** (2003) Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research* **42**: 51-80
- Lemieux B** (1996) Molecular genetics of epicuticular wax biosynthesis. *Trends in Plant Science* **1**: 312-318
- Lilley A, Hails R, Cory J, Bailey M** (1997) The dispersal and establishment of pseudomonad populations in the phyllosphere of sugar beet by phytophagous caterpillars. *FEMS Microbiology Ecology* **24**: 151-157
- Lindow S** (1996) Role of immigration and other processes in determining epiphytic bacterial populations. In *Aerial plant surface microbiology*. Plenum Press, New York, pp 155-168
- Lindow S, Brandl M** (2003) Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 1875-1883
- Linskens H** (1952) Über die Änderung der Benetzbarkeit von Blattoberflächen und deren Ursache. *Planta* **41**: 40-51
- Mansvelt E, Hatingh M** (1987) Scanning electron microscopy of colonization of pear leaves by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Canadian Journal of Botany* **65**: 2517-2522
- Markstädter C** (1994) Untersuchungen zur jahreszeitlichen Entwicklung der kutikulären Wachse von *Fagus sylvatica* L. Dissertation, Universität Kaiserslautern
- Martin C, Glover B** (2007) Functional aspects of cell patterning in aerial epidermis. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 70-82
- Mercier J, Lindow S** (2000) Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 369-374
- Merk S, Blume A, Riederer M** (1997) Phase behaviour and crystallinity of plant cuticular waxes studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Planta* **204**: 44-53
- Monier J, Lindow S** (2003) Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 15977-15982
- Neinhuis C, Barthlott W** (1997) Characterization and distribution of water-repellent, self-cleaning plant surfaces. *Annals of Botany* **79**: 667-677
- Neinhuis C, Koch K, Barthlott W** (2001) Movement and regeneration of epicuticular waxes through plant cuticles. *Planta* **213**: 427-434
- Nes W** (1974) Role of sterols in membranes. *Lipids* **9**: 596-612
- Niederl S, Kirsch T, Riederer M, Schreiber L** (1998) Co-Permeability of ³H-Labeled Water and ¹⁴C-Labeled Organic Acids across Isolated Plant Cuticles Investigating Cuticular Paths of Diffusion and Predicting Cuticular Transpiration. *Plant Physiology* **116**: 117-123

- Nip M, Tegelaar E, Leeuw J, Schenck P, Holloway P** (1986) A new non-saponifiable highly aliphatic and resistant biopolymer in plant cuticles. *Naturwissenschaften* **73**: 579-585
- Pye J, Yu H, Kolattukudy P** (1994) Identification of a Lipid Transfer Protein as the Major Protein in the Surface Wax of Broccoli (*Brassica oleracea*) Leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **311**: 460-468
- Quigley N, Gross D** (1994) Syringomycin production among strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: conservation of the syrB and syrD genes and activation of phytotoxin production by plant signal molecules. *Molecular Plant Microbe Interactions* **7**: 78-78
- Radler F** (1965) The Surface Waxes of the Sultana Vine (*Vitis Vinifera* Cv. Thompson Seedless). *Australian Journal of Biological Sciences* **18**: 1045-1056
- Reicosky D, Hanover J** (1978) Physiological effects of surface waxes I. Light reflectance for glaucous and nonglucous *Picea pungens*. *Plant Physiology* **62**: 101-104
- Remus-Emsermann M, de Oliveira S, Schreiber L, Leveau J** (2011) Quantification of lateral heterogeneity in carbohydrate permeability of isolated plant leaf cuticles. *Frontiers in Plant-Microbe Interaction* **2**
- Rhee Y, Hlousek-Radojic A, Ponsamuel J, Liu D, Post-Beittenmiller D** (1998) Epicuticular wax accumulation and fatty acid elongation activities are induced during leaf development of leeks. *Plant Physiology* **116**: 901-911
- Riederer M, Markstadter C** (1996) Cuticular waxes: a critical assessment of current knowledge. *In* Plant cuticles: an integrated functional approach. BIOS Scientific Publishers Ltd.: Oxford, UK, pp 189-200
- Riederer M, Schneider G** (1989) Comparative study of the composition of waxes extracted from isolated leaf cuticles and from whole leaves of *Citrus*: Evidence for selective extraction. *Physiologia Plantarum* **77**: 373-384
- Riederer M, Schneider G** (1990) The effect of the environment on the permeability and composition of *Citrus* leaf cuticles .2. composition of soluble cuticular lipids and correlation with transport-properties. *Planta* **180**: 154-165
- Riederer M, Schreiber L** (2001) Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *Journal of Experimental Botany* **52**: 2023-2032
- Romantschuk M** (1992) Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology* **30**: 225-243
- Rosenquist J, Morrison J** (1988) The development of the cuticle and epicuticular wax of the grape berry. *Vitis* **27**: 63-70
- Schilmiller A, Schauvinhold I, Larson M, Xu R, Charbonneau A, Schmidt A, Wilkerson C, Last R, Pichersky E** (2009) Monoterpenes in the glandular trichomes of tomato are synthesized from a neryl diphosphate precursor rather than geranyl diphosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 10865-10870
- Schneider G** (1990) Die kutikulären Wachse von *Citrus aurantium* L. und *Fagus sylvatica* L.: Einfluss des Blattalters auf Zusammensetzung und Eigenschaften. Dissertation, Technische Universität München
- Schönherr J** (1976) Water permeability of isolated cuticular membranes: the effect of cuticular waxes on diffusion of water. *Planta* **131**: 159-164
- Schönherr J** (1993) Effects of alcohols, glycols and monodisperse ethoxylated alcohols on mobility of 2, 4-D in isolated plant cuticles. *Pesticide Science* **39**: 213-223
- Schönherr J** (2000) Calcium chloride penetrates plant cuticles via aqueous pores. *Planta* **212**: 112-118
- Schönherr J** (2001) Cuticular penetration of calcium salts: effects of humidity, anions, and adjuvants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **164**: 225-231
- Schönherr J** (2002) A mechanistic analysis of penetration of glyphosate salts across stomatous cuticular membranes. *Pest Management Science* **58**: 343-351
- Schönherr J** (2006) Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. *Journal of Experimental Botany* **57**: 2471-2491
- Schönherr J, Baur P** (1994) Modelling penetration of plant cuticles by crop protection agents and effects of adjuvants on their rates of penetration. *Pesticide Science* **42**: 185-208

- Schönherr J, Baur P** (1996) Cuticle permeability studies. *In* Aerial Plant Surface Microbiology. Springer, pp 1-23
- Schönherr J, Bukovac M** (1972) Penetration of Stomata by Liquids: Dependence on Surface Tension, Wettability, and Stomatal Morphology. *Plant Physiology* **49**: 813-819
- Schönherr J, Lenzian K** (1981) A simple and inexpensive method of measuring water permeability of isolated plant cuticular membranes. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **102**: 321-327
- Schönherr J, Riederer M** (1989) Foliar Penetration and accumulation of organic-chemicals in plant cuticles. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **108**: 1-70
- Schönherr J, Schreiber L** (2004) Size selectivity of aqueous pores in stomatous cuticular membranes isolated from *Populus canescens* (Aiton) Sm. leaves. *Planta* **219**: 405-411
- Schreiber L** (1996) Wetting of the upper needle surface of *Abies grandis*: influence of pH, wax chemistry and epiphyllic microflora on contact angles. *Plant, Cell & Environment* **19**: 455-463
- Schreiber L** (2001) Effect of temperature on cuticular transpiration of isolated cuticular membranes and leaf discs. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1893-1900
- Schreiber L** (2005) Polar Paths of Diffusion across Plant Cuticles: New Evidence for an Old Hypothesis. *Annals of Botany* **95**: 1069-1073
- Schreiber L** (2010) Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. *Trends in Plant Science* **15**: 546-553
- Schreiber L, Franke R, Hartmann K** (2005a) 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 L, Krimm U, Knoll D** (2008) Interactions between epiphyllic microorganisms and leaf cuticles. *In* Plant surface microbiology. Springer, pp 145-156
- Schreiber L, Krimm U, Knoll D, Sayed M, Auling G, Kroppenstedt R** (2005b) Plant-microbe interactions: identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability. *New Phytologist* **166**: 589-594
- Schreiber L, Riederer M** (1996) Ecophysiology of cuticular transpiration: comparative investigation of cuticular water permeability of plant species from different habitats. *Oecologia* **107**: 426-432
- Schreiber L, Riederer M, Schorn K** (1996a) Mobilities of organic compounds in reconstituted cuticular wax of barley leaves: effects of monodisperse alcohol ethoxylates on diffusion of pentachlorophenol and tetracosanoic acid. *Pesticide Science* **48**: 117-124
- Schreiber L, Schönherr J** (2009) Water and Solute Permeability of Plant Cuticles *In* Springer, Berlin Heidelberg,
- Schreiber L, Schorn K, Heimbürg T** (1997) ²H NMR study of cuticular wax isolated from *Hordeum vulgare* L. leaves: identification of amorphous and crystalline wax phases. *European Biophysics Journal* **26**: 371-380
- Schreiber L, Skrabs M, Hartmann K, Diamantopoulos P, Simanova E, Santrucek J** (2001) Effect of humidity on cuticular water permeability of isolated cuticular membranes and leaf disks. *Planta* **214**: 274-282
- Schreiber U, Kühl M, Klimant I, Reising H** (1996b) Measurement of chlorophyll fluorescence within leaves using a modified PAM fluorometer with a fiber-optic microprobe. *Photosynthesis Research* **47**: 103-109
- Silcox D, Holloway P** (1986) A simple method for the removal and assessment of foliar deposits of agrochemicals using cellulose acetate film stripping. *Aspects of Applied Biology* **11**: 13-17
- Singh B, Sahu P, Sharma M** (2002) Anti-inflammatory and antimicrobial activities of triterpenoids from *Strobilanthes callosus* Nees. *Phytomedicine* **9**: 355-359
- Stammitti L, Derridj S, Garrec JP** (1996) Leaf epicuticular lipids of *Prunus laurocerasus*: importance of extraction methods. *Phytochemistry* **43**: 45-48

- Szafranek B, Synak E** (2006) Cuticular waxes from potato (*Solanum tuberosum*) leaves. *Phytochemistry* **67**: 80-90
- Tukey JH** (1970) The leaching of substances from plants. *Annual Review of Plant Physiology* **21**: 305-324
- Vogg G, Fischer S, Leide J, Emmanuel E, Jetter R, Levy A, Riederer M** (2004) Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid β -ketoacyl-CoA synthase. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1401-1410
- Wagner G** (1991) Secreting glandular trichomes: more than just hairs. *Plant Physiology* **96**: 675-679
- Walton T** (1990) Waxes, cutin and suberin. *Methods in Plant Biochemistry* **4**: 5-158
- Weissflog I, Vogler N, Akimov D, Dellith A, Schachtschabel D, Svatos A, Boland W, Dietzek B, Popp J** (2010) Toward in Vivo Chemical Imaging of Epicuticular Waxes. *Plant Physiology* **154**: 604-610
- Wilson M, Lindow S** (1994) Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 4468-4477
- Yu M, Konorov S, Schulze H, Blades M, Turner R, Jetter R** (2008) In situ analysis by microspectroscopy reveals triterpenoid compositional patterns within leaf cuticles of *Prunus laurocerasus*. *Planta* **227**: 823-834
- Zabkiewicz J** (2007) Spray formulation efficacy-holistic and futuristic perspectives. *Crop Protection* **26**: 312-319
- Zeisler V** (2010) Untersuchung zur chemischen Zusammensetzung und Funktion epikutikulärer Wachse als Transpirationsbarriere am Blatt. Diplomarbeit, Universität Bonn

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung einer pflanzlichen Kutikula (geändert nach Jeffree, 1986)	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung einer polaren Pore	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Wirkstoffaufnahme durch die Kutikula ins Blatt	12
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Phyllosphäre	14
Abbildung 5: Abheben der Wachse mit Hilfe von Kollodium und Celluloseacetat	21
Abbildung 6: Abheben der Oberflächenwachse mit Hilfe von Gummi arabicum	22
Abbildung 7: Die bei allen Versuchen verwendeten Blätter von <i>S. lycopersicum</i> und <i>S. tuberosum</i>	23
Abbildung 8: Die bei allen Versuchen verwendeten Blätter von <i>V. vinifera</i> und <i>M. domestica</i>	24
Abbildung 9: Reaktionsmechanismus der Derivatisierung	25
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur radioaktiven Messung der Transpiration	29
Abbildung 11: Schematische Darstellung einer Kontaktwinkelmessung	37
Abbildung 12: Chemische Struktur des verwendeten Herbizids Bentazon	39
Abbildung 13: Experimenteller Versuchsaufbau der Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen mittels Junior-PAM	40
Abbildung 14: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von alten <i>Solanum tuberosum</i> Blättern	45
Abbildung 15: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von jungen <i>Solanum tuberosum</i> Blättern	46
Abbildung 16: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines <i>Solanum tuberosum</i> Trichoms	47
Abbildung 17: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von alten <i>Solanum lycopersicum</i> Blättern	48
Abbildung 18: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von jungen <i>Solanum lycopersicum</i> Blättern	49
Abbildung 19: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von <i>Solanum lycopersicum</i> Trichomen	50
Abbildung 20: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von alten <i>Vitis vinifera</i> Blättern	51
Abbildung 21: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von jungen <i>Vitis vinifera</i> Blättern	52

Abbildung 22: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von alten <i>Malus domestica</i> Blättern	54
Abbildung 23: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von jungen <i>Malus domestica</i> Blättern	55
Abbildung 24: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Gesamtwachsanalyse von alten und jungen <i>Solanum tuberosum</i> Blättern geordnet nach der Retentionszeit der Substanzen	57
Abbildung 25: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalyse der Ober- und Unterseite alter (A) und junger (B) <i>Solanum tuberosum</i> Blätter	58
Abbildung 26: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalyse der Ober- und Unterseite alter (A) und junger (B) <i>Solanum tuberosum</i> Blätter	59
Abbildung 27: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Analyse der abgehobenen Wachse von <i>Solanum tuberosum</i> Blattoberseiten mit Kollodium	60
Abbildung 28: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Analysen der abgehobenen Wachse von <i>Solanum tuberosum</i> Blattoberseiten mit Kollodium	61
Abbildung 29: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Analysen der abgehobenen Wachse von <i>Solanum tuberosum</i> Blattoberseiten mit Kollodium	62
Abbildung 30: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Gesamtwachsanalyse von alten und jungen <i>Solanum lycopersicum</i> Blättern geordnet nach der Retentionszeit der Substanzen	63
Abbildung 31: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalyse der Ober- und Unterseite alter (A) und junger (B) <i>Solanum lycopersicum</i> Blätter	64
Abbildung 32: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalyse der Ober- und Unterseite alter (A) und junger (B) <i>Solanum lycopersicum</i> Blätter	65
Abbildung 33: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Gesamtwachsanalyse von alten und jungen <i>Vitis vinifera</i> Blättern geordnet nach der Retentionszeit der Substanzen	66
Abbildung 34: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalyse der Ober- und Unterseite alter (A) und junger (B) <i>Vitis vinifera</i> Blätter	67
Abbildung 35: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalyse der Ober- und Unterseite alter (A) und junger (B) <i>Vitis vinifera</i> Blätter	68
Abbildung 36: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalysen der abgehobenen Wachse von <i>Vitis vinifera</i> Blattoberseiten mit Kollodium	69
Abbildung 37: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalysen der abgehobenen Wachse von <i>Vitis vinifera</i> Blattoberseiten mit Kollodium	70
Abbildung 38: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalysen der abgehobenen Wachse von <i>Vitis vinifera</i> Blattoberseiten mit Kollodium	71

Abbildung 39: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Gesamtwachsanalyse von alten und jungen <i>Malus domestica</i> Blättern geordnet nach der Retentionszeit der Substanzen	72
Abbildung 40: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalyse der Ober- und Unterseite alter (A) und junger (B) <i>Malus domestica</i> Blätter	73
Abbildung 41: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalyse der Ober- und Unterseite alter (A) und junger (B) <i>Malus domestica</i> Blätter	74
Abbildung 42: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalysen der abgehobenen Wachse von <i>Malus domestica</i> Blattoberseiten mit Kollodium	75
Abbildung 43: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalysen der abgehobenen Wachse von <i>Malus domestica</i> Blattoberseiten mit Kollodium	76
Abbildung 44: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalysen der abgehobenen Wachse von <i>Malus domestica</i> Blattoberseiten mit Kollodium	77
Abbildung 45: Visuelle Untersuchung der Benetzungseigenschaften der vier untersuchten Arten	78
Abbildung 46: Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen an <i>Solanum tuberosum</i>	81
Abbildung 47: Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen an <i>Solanum lycopersicum</i>	82
Abbildung 48: Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen an <i>Vitis vinifera</i>	83
Abbildung 49: Chlorophyll-Fluoreszenz Messungen an <i>Malus domestica</i>	84
Abbildung 50: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalysen der abgehobenen Wachse von <i>Monstera deliciosa</i> Blattscheiben mit Kollodium	88
Abbildung 51: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalysen der abgehobenen Wachse von <i>Prunus laurocerasus</i> Blattscheiben mit Gummi arabicum	91
Abbildung 52: Absolute Darstellung der Ergebnisse der Wachsanalyse der abgehobenen Wachse von <i>Prunus laurocerasus</i> Kutikeln mit Celluloseacetat	94
Abbildung 53: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Grenzen zwischen unbehandelten und zweifach mit Kollodium behandelten Oberflächen verschiedener Arten	96
Abbildung 54: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Prunus laurocerasus</i> Kutikulamembranen unterschiedlicher Lagerungszeit	97
Abbildung 55: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von unbehandelten und mit Gummi arabicum behandelten <i>Prunus laurocerasus</i> Blattoberseiten	98
Abbildung 56: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von unbehandelten und mit Celluloseacetat behandelten <i>Prunus laurocerasus</i> Kutikulamembranen	99
Abbildung 57: Effekte der Behandlung mit verschiedenen Lösungsmitteln auf die kutikuläre Transpiration von <i>Prunus laurocerasus</i> Kutikulamembranen	104

Abbildung 58: Gemittelter Wachsgehalt in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ isolierter <i>Prunus laurocerasus</i> Kutikulamembranen	106
Abbildung 59: Gemittelter Wachsgehalt in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ isolierter <i>Populus canescens</i> Kutikulamembranen	108
Abbildung 60: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Pseudomonas syringae</i> WT Bakterien auf einer isolierten <i>Prunus laurocerasus</i> Kutikulamembran	109
Abbildung 61: Überprüfung der Tensidproduktion von <i>Pseudomonas syringae</i>	110
Abbildung 62: Gemittelte Kinetiken und Effekte auf die Transpiration der mit Bakterien behandelten <i>Prunus laurocerasus</i> Kutikulamembranen über 100 % Luftfeuchte	112
Abbildung 63: Gemittelte Kinetiken und Effekte auf die Transpiration der mit Überständen behandelten <i>Prunus laurocerasus</i> Kutikulamembranen über 100 % Luftfeuchte	113
Abbildung 64: Gemittelte Kinetiken und Effekte auf die Transpiration der mit auf gereinigten Extrakten behandelten <i>Prunus laurocerasus</i> Kutikulamembranen über 100 % Luftfeuchte	114
Abbildung 65: Gemittelte Kinetiken und Effekte auf die Transpiration der mit Bakterien behandelten <i>Populus canescens</i> Kutikulamembranen über 100 % Luftfeuchte	115
Abbildung 66: Gemittelte Kinetiken und Effekte auf die Transpiration der mit Überständen behandelten <i>Populus canescens</i> Kutikulamembranen über 100 % Luftfeuchte	116
Abbildung 67: Gemittelte Kinetiken und Effekte auf die Transpiration der mit Überständen behandelten <i>Populus canescens</i> Kutikulamembranen über 100 % Luftfeuchte	117
Abbildung 68: Vergleich der Zeiten ($t_{80\%}$ (min)) für eine 80-prozentige Hemmung der Photosyntheserate der vier untersuchten Arten	132

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Temperaturprogramm für die analytische Auftrennung von Wachsbestandteilen	26
Tabelle 2: Programm zur Überprüfung der Säulenqualität vor und nach jeder analytischen Untersuchung	27
Tabelle 3: Verwendete Lösungsmittel für Transpirationsstudien samt zugehöriger Dampfdrücke und Dipolmomente	30
Tabelle 4: Übersicht der applizierten Lösungsmittel auf Kutikulamembranen	30
Tabelle 5: In Transpirationsstudien verwendete <i>Pseudomonas syringae</i> Bakterienstämme	32
Tabelle 6: In Transpirationsstudien verwendete Bakterienüberstände	35
Tabelle 7: In Transpirationsstudien verwendete auf gereinigte Extrakte	35
Tabelle 8: Physikalische und chemische Eigenschaften von Bentazon	39
Tabelle 9: Kontaktwinkelmessungen an <i>Solanum tuberosum</i>	79
Tabelle 10: Kontaktwinkelmessungen an <i>Solanum lycopersicum</i>	79
Tabelle 11: Kontaktwinkelmessungen an <i>Vitis vinifera</i>	80
Tabelle 12: Kontaktwinkelmessungen an <i>Malus domestica</i>	80
Tabelle 13: Gemittelte Effekte der Kollodium und Diethylether-Ethanol Behandlung auf die Transpirationsraten intakter Blattscheiben und isolierter Kutikulamembranen	101
Tabelle 14: Gemittelte Effekte der Gummi arabicum und Wasserbehandlung auf die Transpirationsrate intakter <i>Prunus laurocerasus</i> Blattscheiben und isolierter Kutikulamembranen	102
Tabelle 15: Gemittelte Effekte der Celluloseacetat- und Acetonbehandlung auf die Transpirationsraten isolierter <i>Prunus laurocerasus</i> Kutikulamembranen	103

7.3 Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der Konzentration der Substanzen	27
Formel 2: Berechnung der Leitwerte	31
Formel 3: Berechnung der Sputterschicht	37
Formel 4: Formel zur Berechnung des Yields (Y(II))	41

7.4 Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
<i>Aqua demin.</i>	demineralisiertes Wasser
BS	Blattscheibe
BSTFA	N,O-Bistrimethylsilyltrifluoracetamid
Bq	Becquerel
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CM	<i>cuticular membrane</i>
d	Dicke
Dbl ko-	<i>double knockout</i> = Doppelknockout
Don	Donor
dpm	<i>decays per minute</i> = Zerfall pro Minute
E ₁	Anfangssteigung
E ₂	Endsteigung
F	Fluss
F0	Grundfluoreszenz
Fm	maximale Fluoreszenz
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Gramm
g	maximale Beschleunigung
GC	Gaschromatograph(ie)
h	Stunden
HAA	3-(3-hydroxyalkanoyloxy) <i>alkanoic acid</i>
Hz	Hertz
k	Konstante
KB Agar	King Agar B
kV	Kilovolt
l	Liter
M	molar
m	Meter
mbar	Millibar
mm	Millimeter

m ²	Quadratmeter
m ³	Kubikmeter
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mg	Milligramm
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometr(ie)
MW	arithmetischer Mittelwert
MX	Matrixmembran
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	nanomolar
OD	optische Dichte
p	<i>probability value</i> = Signifikanz
P	Leitwert
PAM	<i>pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry</i>
PS II	Photosystem II
Rec	Receiver
Rh1a-	Rhamnolipid <i>knockout</i>
Rh1a-/Syf-	Extrakt der Doppelknockout Mutanten
s	Sekunden
SEM	<i>scanning electron microscope</i> = Rasterelektronenmikroskopie
Stabw	Standardabweichung
Syf-	Syringafaktin <i>knockout</i>
t	Zeit
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
Y(II)	<i>yield</i> = Quantenausbeute des Photosystems II
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

7.5 Chemikalienliste

Agar	für die Mikrobiologie, Fluka-Sigma-Aldrich (Steinheim, Dtlid.)
Aceton	Fluka-Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
BSTFA	Macherey- Nagel (Düren, Deutschland)
Chloroform	für Analyse $\geq 99\%$; Merck (Darmstadt, Deutschland)
Cellulase	Novozymes (Denmark)
Celluloseacetat	rein, Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Citronensäure- monohydrat	$\geq 99,5\%$; Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Collodion	4-8 % in Ethanol, Diethylether ; Fluka (Taufkirchen, Dtlid.)
Diethylether	Fluka (Taufkirchen, Deutschland)
Dikaliumhydrogen- phosphat	für Analyse $\geq 99\%$; Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	für Analyse $\geq 99\%$; Merck (Darmstadt, Deutschland)
Gummi arabicum	Ph. Eur. sprühgetrocknet, Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glycerol	99% für Analysen; Grüssing (Filsum, Deutschland)
Hexan	für Analyse $\geq 99\%$; Merck (Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumsulfat- Heptahydrat	für Analyse $\geq 99\%$; Fluka-Sigma-Aldrich (Steinheim, Dtlid.)
Methanol	pro analysis; Sigma Aldrich (USA)
Natriumazid	$\geq 99\%$, Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumtetraborat	Puriss, $\geq 98\%$; Fluka-Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Pectinase	Novozymes (Denmark)
Protease Pepton	für die Mikrobiologie, Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Pyridin	Puriss, absolut, $\geq 0,005\text{ H}_2\text{O}$; Sigma Aldrich (USA)
Silikonfett	Wacker Chemie GmbH (München, Deutschland)
Ultima Gold	Perkin Elmer (Rodgau, Deutschland)

7.6 Lösungen und Medien

7.6.1 Enzymlösung

0,1 M Zitronensäuremonohydrat

2% (v/v) Cellulase

2% (v/v) Pektinase

0,1% (v/v) NaN_3

pH-Wert 3

7.6.2 Borax-Lösung

0,01 M Natriumtetraborat

pH-Wert 9

7.6.3 KB Agar

Protease Pepton	20 g/l
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	1,15 g/l
Magnesiumsulfat Heptahydrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	1,5 g/l
Glycerin	10 ml/l
Agar	15 g/l
<i>Aqua demin</i>	985 ml
Rifampicilin	5 mg/l

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

Bonn, den