

**Die Entwicklung der glandulären Typ VI Trichome von wilden
(*Solanum habrochaites*) und kultivierten Tomaten (*Solanum
lycopersicum*)**

Doktorarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften)

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Nick Bergau

geboren am 23.05.1989

in Annaberg-Buchholz

Erstgutachter: Prof. Dr. Alain Tissier

Zweitgutachter: Prof. Dr. Klaus Humbeck

Drittgutachter: Prof. Dr. Martin Hülkamp

Eingereicht am: 27.04.2017

Tag der Verteidigung: 20.10.2017

Science is a wonderful thing if one does not have to earn one's living at it.

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

<i>Zusammenfassung</i>	<i>VIII</i>
<i>Summary</i>	<i>X</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>XII</i>
<i>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</i>	<i>XIV</i>
1. Einleitung	1
<u>1.1. Trichommorphologie</u>	1
<u>1.2. Sekundärmetabolismus der glandulären Trichome</u>	4
<u>1.3. Funktion und Bedeutung der in den Trichomen produzierten</u>	
<u>Sekundärstoffe</u>	5
<u>1.4. Trichomentwicklung</u>	7
<u>1.5. Funktion und Aufbau der Zellwand</u>	9
1.5.1. Entstehung des sekretorischen Hohlraumes innerhalb der Zellwand	9
1.5.2. Aufbau pflanzlicher Zellwände	10
1.5.3. Auflockerung pflanzlicher Zellwandstrukturen	12
<u>1.6. Ernte von glandulären Trichomen</u>	13
<u>1.7. Zielstellung</u>	14
2. Material und Methoden	17
<u>2.1. Anzucht der Pflanzen</u>	17
<u>2.2. Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM)</u>	17
<u>2.3. Licht- und Fluoreszenzmikroskopie</u>	17
<u>2.4. Anfärbung des sekretorischen Hohlraumes</u>	18
<u>2.5. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)</u>	19
<u>2.6. Einbettung in PEG 1500</u>	19
<u>2.7. Anfärbung von Lignin und Suberin</u>	20
<u>2.8. Immunmarkierungen</u>	20
<u>2.9. Bestimmung des Rutingehaltes</u>	21
<u>2.10. Extraktion und Analyse der autofluoreszierenden Substanzen</u>	22
<u>2.11. Extraktion von Zellwandmaterial</u>	23
<u>2.12. Massenspektrometrische Untersuchung der Pektinstruktur</u>	24
<u>2.13. Analyse verschiedener Flavonoid-Konjugate aus sortierten Trichomen</u>	25

Inhaltsverzeichnis

<u>2.14. Trichomernte</u>	26
<u>2.15. Dichtegradientenzentrifugation</u>	27
<u>2.16. Durchflusszytometrie</u>	28
<u>2.17. RNA-Isolation</u>	28
<u>2.18. Transkriptanalyse mittels RNA-Seq</u>	29
<u>2.19. Genexpressionsanalyse mittels qPCR</u>	30
3. Ergebnisse	34
<u>3.1. Morphologische Charakterisierung der Entwicklung von</u> <u>Typ VI glandulären Trichomen</u>	34
3.1.1. Mikroskopische Betrachtung glandulärer Typ VI Trichome	34
3.1.2. Identifizierung junger Typ VI Trichome	36
3.1.3. Akkumulation gelb-grün fluoreszierender Substanzen in jungen Typ VI Trichomen	39
3.1.3.1. <i>Untersuchung bereits bestehender Flavonoid-Mutantenlinien</i>	39
3.1.3.2. <i>Analyse der fluoreszierenden Substanzen</i>	41
3.1.4. Ultrastruktur junger und reifer Typ VI Trichome	43
3.1.4.1. <i>Frühe Entwicklungsstadien</i>	43
3.1.4.2. <i>Subzelluläre Struktur von jungen und reifen Trichomen</i>	44
3.1.4.3. <i>Die Zwischenzelle: Die Entstehung einer Sollbruchstelle</i>	46
<u>3.2. Zellwandanalysen</u>	48
3.2.1. Histologische Färbung verschiedener Zellwandpolymere	49
3.2.2. Immunmarkierungen	49
3.2.3. Analyse der Pektinstruktur mittel LC-MS	51
<u>3.3. Genexpressions- und Sekundärmetabolitanalyse junger und reifer</u> <u>Typ VI Trichome</u>	53
3.3.1. Ernte und Sortierung von Typ VI Trichomen verschiedener Entwicklungsstadien	53
3.3.1.1. <i>Trichomernte</i>	53
3.3.1.2. <i>Trichomsortierung</i>	55
3.3.1.3. <i>Analyse der sortierten Trichome</i>	59
3.3.2. RNA-Seq-Analyse mittels 3'-library-Sequencing	61
3.3.3. Datenvalidierung mittel qPCR	64
3.3.4. Expressionsanalyse ausgewählter Gene in den jungen und reifen Trichomen von <i>S. lycopersicum</i>	68

3.3.5. Einfluss des <i>knock-down</i> von <i>Bli1</i> auf die Entwicklung der Typ VI Trichome	70
4. Diskussion	72
<u>4.1. Morphologie der Entwicklung der Typ VI Trichome</u>	72
4.1.1. Architektur der Typ VI Trichome von <i>S. habrochaites</i> und <i>S. lycopersicum</i>	72
4.1.2. Entwicklungsstadien der Typ VI Trichome	74
4.1.3. Gelb-grüne Autofluoreszenz der jungen Trichome	76
4.1.4. Ausbildung einer Sollbruchstelle für die Freisetzung der Sekundärmetabolite	79
<u>4.2. Analyse der Zellwandstruktur</u>	82
4.2.1. Immunmarkierung verschiedener Pektin-Epitope	82
4.2.2. Vergleichende Analyse der Pektinstruktur der Trichome von <i>S. habrochaites</i> und <i>S. lycopersicum</i>	83
<u>4.3. Analyse von Metabolismus und Genexpression der sich-entwickelnden Trichome</u>	84
4.3.1. Etablierung einer Methode für die Ernte von jungen und reifen Typ VI Trichomen	84
4.3.2. Genexpression in jungen und reifen Trichomen	87
5. Ausblick	91
6. Literatur	93
7. Danksagung	114
8. Eidesstattliche Erklärung	116
9. Anhang	117

Zusammenfassung

Trichome sind haarähnliche Strukturen, die auf nahezu allen Landpflanzen vorkommen. Von besonderem Interesse für die Forschung sind dabei die glandulären Trichome, die auf etwa 30% der Landpflanzen vorzufinden sind. Sie besitzen die Fähigkeit, große Mengen an sekundären Pflanzenstoffen zu produzieren, die unter anderem als Duftstoffe, Nahrungsergänzungsmittel oder Medikamente Verwendung finden. Für die Pflanzen selbst dienen die in den glandulären Trichomen produzierten Stoffe vor allem der Abwehr von Pflanzenschädlingen. Zahlreiche Kulturpflanzen, etwa aus der Familie der *Solanaceen*, haben diese natürliche Art der Schädlingsabwehr während der Domestizierung jedoch zum Teil verloren. Eine Wiedereinführung dieser durch die glandulären Trichome vermittelten natürlichen Resistenzen in die Kulturpflanzen erfordert, neben einer detaillierten Analyse der Biosynthesewege der Sekundärstoffe, vor allem ein Verständnis der entwicklungspezifischen Prozesse, die die Morphologie und Anatomie der Trichome regulieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher ein Einblick in die Entwicklung der glandulären Trichome am Beispiel der Typ VI Trichome der Wildtomate *S. habrochaites* und der Kulturtomate *S. lycopersicum* gewonnen werden.

Die mit mikroskopischen Verfahren untersuchte Struktur der Typ VI Trichome von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* zeigt einen vergleichbaren Aufbau aus einer Stielzelle, einer Zwischenzelle und vier glandulären Zellen, die einen sekretorischen Hohlraum umschließen. Die Typ VI Trichome von *S. habrochaites* besitzen dabei einen sehr großen Hohlraum, in welchem große Mengen an Sekundärmetaboliten gelagert werden können. Bei den Typ VI Trichomen von *S. lycopersicum* ist der Hohlraum hingegen stark verkleinert was mit einer verringerten Akkumulation von Sekundärmetaboliten einhergeht. Durch Berührung der Typ VI Trichome erfolgt in beiden Fällen die Freisetzung der gespeicherten Sekundärstoffe durch eine Sollbruchstelle in der Zellwand.

Bei der Analyse verschiedener Entwicklungsstadien der Typ VI Trichome mittels Fluoreszenz-, Hellfeld- und Elektronenmikroskopie zeigte sich ein vergleichbarer Grundmechanismus der Trichomentwicklung in *S. habrochaites* und *S. lycopersicum*, der sich hauptsächlich durch die Entwicklung des sekretorischen Hohlraumes unterscheidet. In den jungen Trichomen beider Tomatenlinien akkumuliert eine gelb-grün fluoreszierende Substanz, die im Verlauf der weiteren Entwicklung verschwindet. Untersuchungen an einer Mutantenlinie (LA1049) weisen darauf hin, dass es sich bei der fluoreszierenden Substanz um ein Derivat des Riboflavins (wie FMN oder FAD) handelt und dass die Bildung und

Akkumulation des entsprechenden Derivates eine wichtige Rolle bei der Trichomentwicklung spielen könnten. Die genaue Struktur der fluoreszierenden Substanz, sowie deren Funktion bei der Entwicklung der Typ VI Trichome von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum*, konnte bisher jedoch nicht aufgeklärt werden.

Zellwandfärbungen, Immunmarkierung und Massenspektrometrie ergaben des Weiteren einen ersten Einblick in die Struktur der Zellwände der Typ VI Trichome. Die hierbei erhaltenen Daten liefern Hinweise darauf, dass sich die Zellwände von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* hinsichtlich der Methylierung und Acetylierung des Pektins voneinander unterscheiden und dass die Demethylierung und der Abbau der inneren Zellwand in den jungen Trichomen von *S. habrochaites* maßgeblich an der Bildung des sekretorischen Hohlraumes beteiligt sein könnten.

Voraussetzung für weitere molekularbiologische Analysen der Trichomentwicklung war eine effiziente Methode für die Ernte und Sortierung von Typ VI Trichomen verschiedener Entwicklungsstadien. Die hierfür etablierte Methode, basierend auf einer Kombination aus Dichtegradientenzentrifugation und Durchflusszytometrie, eröffnet zahlreiche Möglichkeiten für die Untersuchung der Metabolit-, Transkript- und Proteinlevel unterschiedlicher Entwicklungsstadien dieser hochspezialisierten Strukturen. Hierbei konnten zum einen erhöhte Mengen verschiedener Flavonoid-Konjugate in den jungen Trichomen nachgewiesen werden. Zum anderen konnten durch RNA-Seq und qPCR Unterschiede und Gemeinsamkeiten in der Genexpression junger und reifer Trichome von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* detektiert werden. Die hierbei identifizierten potenziell an der Entwicklung beteiligten Gene bilden eine Grundlage für eine zukünftige funktionelle Charakterisierung z.B. durch die Erstellung von *knock-out*-Linien oder *in vitro* Assays.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit ein grundlegender Einblick in die Entwicklung der Typ VI Trichome der Tomaten gewonnen werden. Die hierbei erhaltenen Erkenntnisse und methodischen Fortschritte bei der Ernte, Isolierung und phytochemischen Charakterisierung verschiedener Entwicklungsstadien der Trichome stellen einen wichtigen Schritt in Richtung der Wiedereinführung natürlicher Resistenzen in die Kulturformen der Tomate dar.

Summary

Trichomes are hair-like structures that occur on the surface of almost all land plants. Of peculiar interest for the research are the glandular trichomes which occur on 30% of the land plants. These trichomes are able to produce huge quantities of secondary metabolites that can be used as fragrances, dietary supplements, or drugs. For the plants themselves, the secondary metabolites produced in these trichomes are important for their defense against herbivores and pests. However, many domesticated plants, like members of the *Solanaceae*, partially lost this natural defense during domestication. The reintroduction of this natural defense mechanism into the cultivated tomato requires detailed knowledge not only of its biosynthetic metabolism, specifically with respect to secondary metabolites, but also of the molecular basis of trichome development. Therefore, this thesis compares the morphology, gene expression and functional aspects of the type VI trichomes of the wild tomato *S. habrochaites* and the cultivated tomato *S. lycopersicum*.

The structure of type VI trichomes was examined using different microscopic techniques. In *S. habrochaites* and *S. lycopersicum* these trichomes consist of a stalk cell, an intermediate cell and four glandular cells which surround a secretory cavity. The type VI trichomes of *S. habrochaites* have a large secretory cavity apparently required to store huge amounts of secondary metabolites, whereas in the case of *S. lycopersicum* this cavity is much smaller, thereby restricting the accumulation of secondary metabolites. Due to a predetermined breaking point between the intermediate and the glandular cells the stored secondary metabolites are rapidly released once the trichomes are mechanically damaged by insects or other herbivores.

Further analysis by fluorescence-, brightfield-, and electron microscopy provided insight into the different developmental stages of the type VI trichomes. The main macroscopic difference during trichome development in *S. habrochaites* and *S. lycopersicum* concerned the size of the secretory cavity, which was much larger in *S. habrochaites*. The young trichomes of both lines show a bright green-yellow fluorescence that disappears during trichome maturation. LC-MS analysis performed with a mutant line (LA1049), where this fluorescence seemed to be restricted to vesicle-like structures, indicates that the fluorescent substance is a derivative of riboflavin (like FMN or FAD) and that the formation of this substance could play a key role in the development of type VI trichomes of tomatoes. However, the exact structure of the substance and its role in trichome development of *S. habrochaites* and *S. lycopersicum* remains so far unclear.

First insights into the cell wall structure of the type VI trichomes were gained by cell-wall staining, immunostainings, and LC-MS analysis. These combined data indicated differences in the methylation and acetylation pattern of pectin in *S. habrochaites* and *S. lycopersicum* and suggested that the degradation of the inner cell wall plays an important role in the formation of the secretory cavity.

A method for the harvest and separation of young and mature type VI trichomes was established. The method, based on a combination of density gradient centrifugation and flow cytometry, allows for the first time the investigation of the metabolome, transcriptome and proteome of trichomes of different developmental stages. The analysis of secondary metabolites revealed increased contents of particular flavonoid conjugates in the young trichomes, whereas older trichomes show significant lower levels. Analysis of the gene expression using RNA-Seq and qPCR of young and mature trichomes of *S. habrochaites* and *S. lycopersicum* lead to the identification of genes which are potentially involved in trichome development and therefore, can be seen as interesting candidates for further characterization, e.g. by knock-out and *in vitro* functional experiments.

In summary, the current thesis gives an essential insight into the structures and development of type VI trichomes of wild and cultivated tomato species. The newly established methods concerning the harvest and the isolation of young and mature trichomes combined with the phytochemical characterization of trichomes of different developmental stages are fundamental to initiate the reintroduction of natural resistances into the cultivated tomatoes in the future.

Abkürzungsverzeichnis

AGP	Arabinogalaktanprotein
Bli	<i>Blind-like</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Cas	<i>CRISPR-associated</i>
cDNA	<i>complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
CES	<i>Collision Energy Spread</i>
CID	<i>Collision Induced Dissociation</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
EMS	<i>Enhanced Mass Scan</i>
EPI	<i>Enhanced Product Ion Scan</i>
ESEM	<i>Environmental Scanning Electron Microscopy</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMN	Flavin-Mono-Nukleotid
FSC-A	<i>Forward Scatter Area</i>
FSC-H	<i>Forward Scatter Hight</i>
HPD	<i>High Pressure Dispenser</i>
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
LSM	<i>Laser Scanning Microscope</i>
MEcPP	<i>2-C-Methylerythritol-2,4-cyclopyrophosphate</i>
MEP	<i>2-C-Methylerythritol-4-phosphate</i>
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
mRNA	<i>messenger Ribonucleic Acid</i>
MS	Massenspektrometrie
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
ppb	<i>parts per billion</i>
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RFU	<i>Relative Fluorescent Units</i>
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
RNAi	<i>Ribonucleic Acid interference</i>

RT	Raumtemperatur
SPE	<i>Solide Phase Extraction</i>
SSCCD	<i>Slow-Scan Charge-Coupled Device</i>
SWATH	<i>Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra</i>
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
TOF	<i>Time-of-flight</i>
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
UV	Ultraviolett
VIGS	<i>Virus Induced Gene Silencing</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildungen des Hauptteils:

Abbildung 1:	Übersicht der unterschiedlichen Erscheinungsformen der Trichome	2
Abbildung 2:	Übersicht der verschiedenen Trichomtypen der Tomate	4
Abbildung 3:	Entwicklung eines peltaten Trichoms	8
Abbildung 4:	Grundaufbau der pflanzlichen Zellwand	12
Abbildung 5:	Überblick über die Trichomdichte und die Struktur der Typ VI Trichome von <i>S. habrochaites</i> und <i>S. lycopersicum</i>	35
Abbildung 6:	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Apex von <i>S. habrochaites</i>	36
Abbildung 7:	Übersicht der Entwicklungsstadien glandulärer Typ VI Trichome	38
Abbildung 8:	Typ VI Trichome von <i>S. habrochaites</i> LA1777 vor und nach der Ernte	39
Abbildung 9:	Akkumulation autofluoreszierender Substanzen in den Flavonoid-Mutantenlinien LA3189 und LA1049	41
Abbildung 10:	Analyse der fluoreszierenden Substanz von <i>S. lycopersicum</i> LA1049, LA4024 und <i>S. habrochaites</i> LA1777 Trichomen	43
Abbildung 11:	Subzelluläre Struktur junger und reifer Typ VI Trichome	46
Abbildung 12:	Detailaufnahmen der Struktur junger und reifer Typ VI Trichome	48
Abbildung 13:	Immunmarkierung verschiedener Pektin-Epitope an den Typ VI Trichomen von <i>S. habrochaites</i>	50
Abbildung 14:	Massenspektrometrische Analyse der Pektinstruktur der Typ VI Trichome	52
Abbildung 15:	Trichomernte mittels Glaskugelmethode	54
Abbildung 16:	Übersicht der Arbeitsschritte zur Trennung von jungen und reifen Trichomen für die Analyse der Genexpression und der Sekundärmetabolitgehalte	55

Abbildung 17:	Anreicherung junger Typ VI Trichome von <i>S. habrochaites</i> in Sorbitolpuffer	57
Abbildung 18:	Histogramme einer Fraktion junger Trichome von <i>S. habrochaites</i>	59
Abbildung 19:	Extraktion von RNA und Sekundärmetaboliten aus sortierten jungen und reifen Trichomen von <i>S. habrochaites</i>	61
Abbildung 20:	Funktionelle Zuordnung der in den jungen und reifen Trichomen von <i>S. habrochaites</i> LA1777 differentiell exprimierten Gene	64
Abbildung 21:	Einfluss des <i>knock-down</i> von <i>Bli1</i> auf die Entwicklung der Typ VI Trichome von <i>S. lycopersicum</i>	71
Abbildung 22:	Unterschiedlicher Aufbau pflanzlicher Drüsen	74
Abbildung 23:	Autofluoreszenz bei Trichomen	76
Abbildung 24:	Entstehung des sekretorischen Hohlraumes	83
Abbildung 25:	Trichomentwicklung und Flavonoidmetabolismus	86

Abbildungen des Anhangs:

Abbildung A1:	Lagerstätte der Sekundärmetabolite in den Typ VI Trichomen von <i>S. habrochaites</i> LA1777	117
Abbildung A2:	Fluoreszenzspektren isolierter Trichome von <i>S. habrochaites</i>	118
Abbildung A3:	Entwicklungsstadien intakter glandulärer Typ VI Trichome	119
Abbildung A4:	Rutingehalt der Trichome verschiedener Tomatenlinien	120
Abbildung A5:	Vesikelförmige Strukturen in den Typ VI Trichomen von LA1049	120
Abbildung A6:	Massenspektrometrischer Abgleich der fluoreszierenden Substanz aus LA1049 Trichomen mit Riboflavin	121
Abbildung A7:	Frühe Entwicklungsstadien der Typ VI Trichome von <i>S. habrochaites</i>	122
Abbildung A8:	Elektronenmikroskopische (TEM) Detailaufnahmen des sekretorischen Köpfchens der Typ VI Trichome	123
Abbildung A9:	Anfärbung von Lignin und Suberin	124

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung A10:	Sortierung junger und reifer Typ VI Trichome von <i>S. habrochaites</i> LA1777 mittels Percoll®-Dichtegradient	124
Abbildung A11:	Anreicherung junger Typ VI Trichome von <i>S. habrochaites</i> in Ethanol/ RNeasy®	125
Abbildung A12:	Anreicherung von jungen Typ VI Trichomen von <i>S. habrochaites</i> für die RNA-Seq-Analyse	126

Tabellenverzeichnis

Tabellen des Hauptteils:

Tabelle 1:	MRM Übergänge der detektierten Flavonoid-Konjugate	26
Tabelle 2:	Sequenzen der bei der Datenvalidierung mittels qPCR verwendeten Primer	31
Tabelle 3:	Quantifizierung der Anreicherung junger Trichome in Sorbitolpuffer und Ethanol	58
Tabelle 4:	Validierung der RNA-Seq-Daten von <i>S. habrochaites</i> LA1777 mittels qPCR	67
Tabelle 5:	Expressionsanalyse ausgewählter Gene in den jungen und reifen Trichomen von <i>S. lycopersicum</i> LA4024	69

1. Einleitung

Die Photosynthese der Pflanzen stellt die Grundlage nahezu allen Lebens auf der Welt dar. Daher ist es nicht verwunderlich, dass Pflanzen bereits seit Jahrtausenden vom Menschen kultiviert und studiert werden. Einen besonderen Fortschritt stellte dabei die Entwicklung des Lichtmikroskops im 17. Jahrhundert dar, wodurch erstmals Einblicke in die pflanzliche Feinstruktur gewonnen werden konnten die nicht mit bloßem Auge erkennbar ist. Ein sehr umfangreicher Bereich dieses pflanzlichen Mikrokosmos wird dabei durch die verschiedensten Auswüchse der Epidermis dargestellt. Betrachtet man beispielsweise die Oberfläche eines Tomatenblattes unter dem Lichtmikroskop, so fällt einem auf den ersten Blick die große Menge und Vielfalt an haarähnlichen Strukturen auf, die aus der Epidermis entwachsen. Diese Strukturen werden als Trichome bezeichnet und sind auf der Oberfläche nahezu aller Landpflanzen zu finden.

1.1. Trichomorphologie

Trichome können die unterschiedlichsten Erscheinungsformen haben. So können sie entweder verzweigt (Abbildung 1 A) oder unverzweigt (Abb.1 B, C, D, E), ein- (Abb.1 A, D) oder mehrzellig (Abb. 1 B, C, E) sein und von wenigen Mikrometern (Abb.1 A, C, D) bis zu mehreren Zentimetern (Abb. 1 B, E) groß werden. Für die Pflanzen können die Trichome die unterschiedlichsten Aufgaben erfüllen. So dienen sie den Pflanzen unter anderem als Schutz vor Austrocknung und UV-Strahlung (Ehleringer 1984; Liakopoulos *et al.* 2006), zur Abwehr von Fraßfeinden (Simmons *et al.* 2004; Cardoso 2008) und Pathogenen (Sheperd *et al.* 2005), bei der Exkretion von Schwermetallen (Sarret *et al.* 2006) oder auch zur Anlockung von Bestäubern (Werker 2000).

Anhand ihres Aufbaus lassen sich zwei Klassen von Trichomen unterscheiden, die glandulären und die nicht-glandulären Trichome. Die nicht-glandulären Trichome sind einfache haarähnliche Strukturen, die aus einer oder mehreren Zellen bestehen und auf fast allen Angiospermen, sowie einigen Gymnospermen und Moosen vorkommen (Wagner 2004). Die glandulären Trichome dagegen treten nur bei ca. 30% der Gefäßpflanzen auf (Dell und McComb, 1978; Fahn, 2000) und sind mit ihrer Struktur aus Basal-, Stiel- und Apikalzellen komplexer aufgebaut.

Einleitung

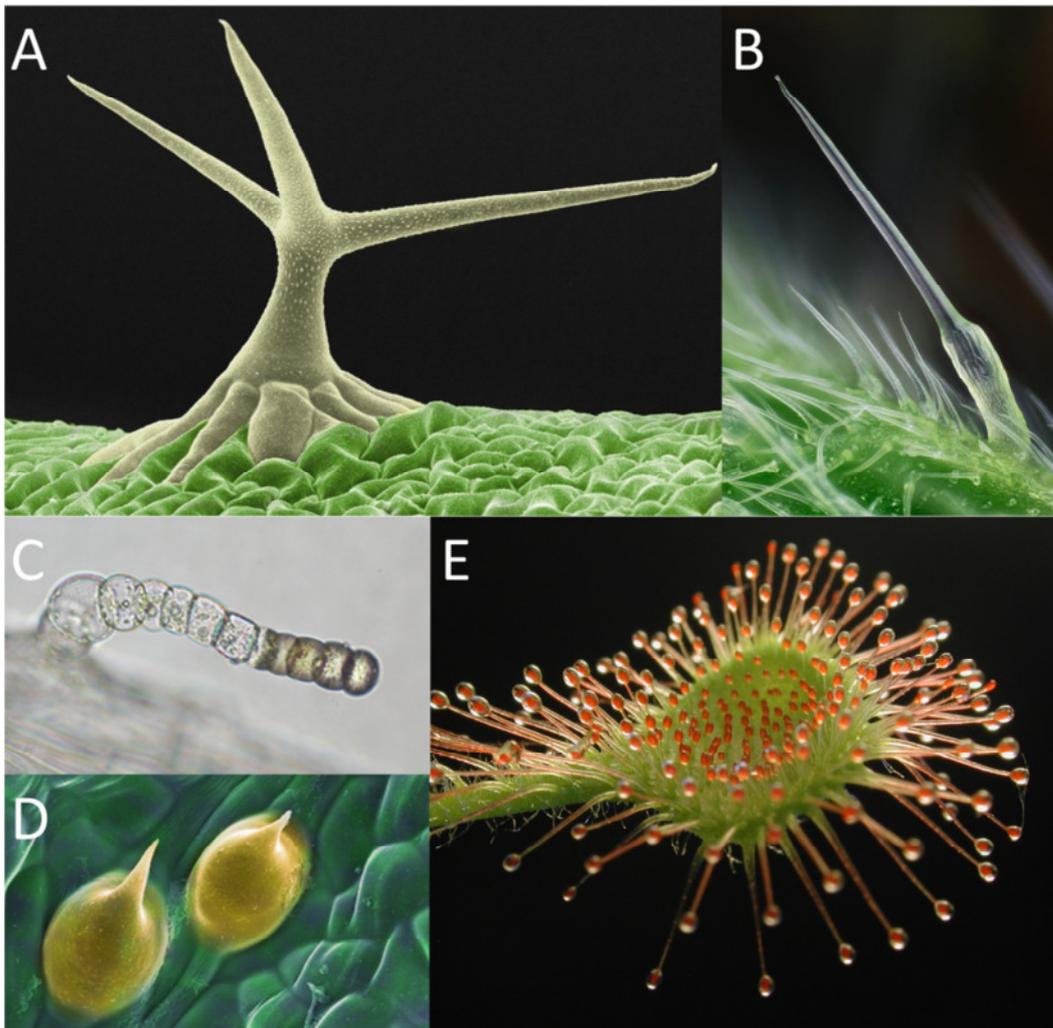


Abbildung 1: Übersicht der unterschiedlichen Erscheinungsformen der Trichome: Verzweigtes Trichom der Acker-Schmalwand (A), Brennhaare der Brennnessel (B), glanduläres Trichom der Sonnenblume (C), nicht-glanduläre Trichome des Cannabis (D) und Klebehaare des Sonnentaus (E).

Quelle Bilder: A: <http://dev.cam.msu.edu/wp-content/uploads/Trichome2a-1024x696.jpg>;
B: <http://www.thrips-id.de/Resources/Zitronenmelisse.jpg?498>; C: Aschenbrenner *et al.* 2013;
D: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/06/Drosera_rotundifolia_leaf1.jpg;
E: http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/imgmay14/Cannabis-article-web_files/image008.png

Da die am besten charakterisierte Modellpflanze *A. thaliana* keine glandulären Trichome besitzt, finden bei der Untersuchung des Aufbaus der glandulären Trichome und der in ihnen ablaufenden Biosynthesewege andere Modellpflanzen Verwendung. Geeignete Modellorganismen hierfür finden sich unter anderem im Reich der *Lamiaceae*, der *Asteraceae* oder der *Solanaceae*, wobei der Fokus der Forschung der letzten Jahre sich besonders auf die Sektion der Tomaten aus der Gattung *Solanum* konzentrierte. Tomatenpflanzen können insgesamt acht verschiedene Typen an nicht-glandulären (Typ II, III, V und VIII) und glandulären (Typ I, IV, VI und VII) Trichomen besitzen (Luckwill 1943; Channarayappa *et al.* 1992; Glas *et al.* 2012; siehe Abbildung 2). Die Struktur und

die Größe der glandulären Trichome sind hierbei zwischen den einzelnen Typen sehr unterschiedlich. Die Typ I Trichome bestehen aus einem langen, multizellulären Stiel, an dessen Ende sich ein kleines, einzelliges oder zweizelliges sekretorisches Köpfchen befindet. Die Gesamtlänge beträgt dabei 2-3 mm, weshalb die Typ I Trichome bereits mit bloßem Auge zu erkennen sind. Die Typ IV Trichome besitzen den gleichen Aufbau wie die Typ I Trichome und bestehen somit ebenfalls aus einem multizellulären Stiel und einem ein- oder zweizelligen Köpfchen. Sie sind mit einer Länge von 0,2 bis 0,4 mm jedoch deutlich kürzer als die Typ I Trichome. Da sich die Typ I und IV Trichome in ihrer Funktion und Struktur sehr ähnlich sind, können sie auch als verschiedene Erscheinungsformen eines einzigen Trichomtyps angesehen werden (Kang *et al.* 2010). Bei den Typ VI Trichomen hingegen besteht der Stiel nur aus einer einzelnen langen Zelle, wobei eine kleine Zwischenzelle als Verbindung zwischen dem Stiel und dem sekretorischen Köpfchen fungiert. Im Gegensatz zu den Typ I und IV Trichomen besteht das sekretorische Köpfchen der Typ VI Trichome aus vier gleichgroßen Zellen, die symmetrisch auf einer Ebene liegen. Die Köpfchen der Typ VI Trichome sind dabei deutlich größer als die der anderen Typen an glandulären Trichomen. Die Typ VII Trichome haben ebenfalls nur einen einzelligen Stiel und ein multizelluläres Köpfchen. Im Gegensatz zu den Typ VI Trichomen haben die Typ VII Trichome jedoch eine viel kürzere Stielzelle, die ohne Zwischenzelle direkt mit dem sekretorischen Köpfchen verbunden ist. Weiterhin ist die Struktur des sekretorischen Köpfchens variabler als bei den Typ VI Trichomen. So kann das Köpfchen aus 4 bis 10 sekretorischen Zellen aufgebaut sein und eine rundliche oder eher längliche Form haben und ist trotz der höheren Anzahl an Zellen deutlich kleiner als das Köpfchen der Typ VI Trichome.

Die Anzahl und die Zusammensetzung der Trichome können zwischen den unterschiedlichen Tomatenarten sehr stark variieren. So besitzt die Kulturtomate *Solanum lycopersicum* (veraltet *Lycopersicon esculentum*) Trichome der Typen I, III, V, VI, VII und VIII wohingegen die Wildtomate *Solanum habrochaites* (veraltet *Lycopersicon hirsutum*) Trichome der Typen I, III, IV, VI und VII besitzt. Die Dichte an Trichomen ist dabei zwischen *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* sehr unterschiedlich, wobei *S. habrochaites* in der Regel deutlich mehr Trichome als *S. lycopersicum* besitzt. Der am stärksten abundante Typ von glandulären Trichomen wird dabei in beiden Fällen durch die Typ VI Trichome dargestellt.

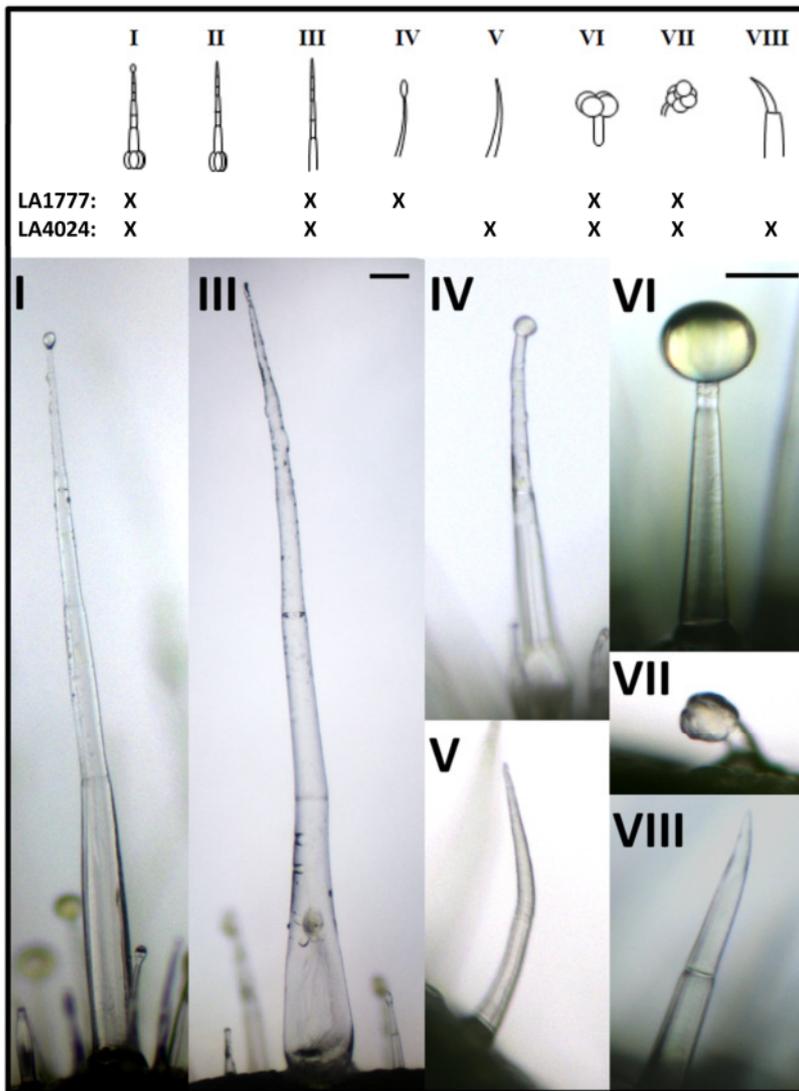


Abbildung 2: Übersicht der verschiedenen Trichomtypen der Tomate: Struktur und Verteilung der Trichome der Tomaten bei der Wildlinie *S. habrochaites* LA1777 und der Kulturlinie *S. lycopersicum* LA4024 nach Glas *et al.* 2012 (oben). Nahaufnahme der verschiedenen Trichomtypen (unten). Die Bilder der Typ I, III, IV, VI, VII Trichome stammen von LA1777, die Bilder der Typ V und VIII Trichome stammen von LA4024. Für die Trichome I und III bzw. IV, V, VI, VII und VIII gilt jeweils derselbe Maßstabsbalken ($\cong 50 \mu\text{m}$).

1.2. Sekundärmetabolismus der glandulären Trichome

Glanduläre Trichome haben die Fähigkeit Sekundärmetabolite aus den unterschiedlichsten Stoffklassen zu produzieren, zu lagern und auch zu sekretieren. So können in den Trichomen Terpene, Phenylpropanoide, Flavonoide, Methylketone, Acylzucker und Alkaloide gebildet werden (Glas *et al.* 2012). Die unterschiedlichen Trichomtypen können dabei unterschiedliche Arten von Sekundärmetaboliten produzieren, sekretieren und lagern. So werden in den Typ I und Typ IV Trichomen, neben Flavonoiden, Phenylpropanoiden und Alkaloiden, vor allem sehr große Mengen an Acylzuckern produziert und sekretiert (McDowell *et al.* 2011; Li *et al.* 2013; Nakashima *et al.* 2016). Die Freisetzung der produzierten Metabolite erfolgt dabei, ähnlich wie bei den kapitativen Trichomen der *Lamiaceae*n (Werker 1993; siehe 1.4.), direkt nach der Synthese, wodurch sich kleine klebrige Tröpfchen auf der Oberfläche der Trichomköpfchen bilden

(McDowell *et al.* 2011). Im Gegensatz dazu produzieren die Typ VI Trichome, neben geringeren Mengen an Fettsäuren und Flavonoiden, sehr große Mengen an Terpenen (McDowell *et al.* 2011; Li *et al.* 2013), die nicht unmittelbar nach der Synthese freigesetzt werden. Stattdessen werden die produzierten Metabolite, wie bei den peltaten Trichomen der *Lamiaceae*n (Werker 1993; siehe 1.4.), zunächst in einem sekretorischen Hohlraum gelagert. Hier verbleiben sie bis zu ihrer Freisetzung durch bestimmte äußere Bedingungen bzw. Berührung. Bei den Typ VII Trichomen scheint im Kontrast zu den Typ I, IV und VI Trichomen keine Produktion, Sekretion und Lagerung von großen Mengen an Sekundärstoffen zu erfolgen. Vielmehr scheinen die Typ VII Trichome, ähnlich wie die kurzen glandulären Trichome des Tabaks (Shepherd *et al.* 2005), neben einigen Alkaloiden vor allem verschiedene Proteine wie Protease-Inhibitoren zu produzieren (McDowell *et al.* 2011).

Die Menge der durch die glandulären Trichome synthetisierten Sekundärstoffe kann sowohl zwischen den verschiedenen Pflanzenarten als auch innerhalb verschiedener Akzessionen einer Pflanzenart sehr verschieden sein. Allgemein lässt sich jedoch sagen, dass glanduläre Trichome eine Art Biofabrik darstellen, die zur Biosynthese enormer Mengen an Sekundärmetaboliten fähig sind (Tissier 2012). So kann der Anteil, der allein durch die Trichome produzierten Sekundärmetabolite bei bis zu 30% des Blatttrockengewichtes liegen (Dell und McComb 1978). Auch von den Trichomen der Tomatenpflanzen werden zum Teil sehr große Mengen an Sekundärmetaboliten produziert. So machen etwa die in den glandulären Trichomen der Wildtomate *Solanum pennellii* gebildeten Acylzucker bis zu 20% der Blattrockenmasse aus (Fobes *et al.* 1985).

1.3. Funktion und Bedeutung der in den Trichomen produzierten Sekundärstoffe

Die in den glandulären Trichomen produzierten Sekundärmetabolite können für die Pflanze von unterschiedlicher Bedeutung sein. In den allermeisten Fällen sind sie jedoch in die Verteidigung der Pflanzen gegen Pathogene und Herbivoren involviert. So können sie direkt zur Verteidigung gegen verschiedene Pflanzenschädlinge beitragen, indem sie diese fixieren und/ oder vergiften (Gentile und Stoner 1968; Goffreda *et al.* 1990; Hawthorne *et al.* 1990; Leidl *et al.* 1995; Frelichowski und Juvik 2001; Kennedy 2003; Puterka *et al.* 2003; Simmons *et al.* 2012). Sie können jedoch auch als chemische Signale dienen, um Fraßfeinde der Schädlinge anzulocken, von denen die Pflanzen befallen sind (Beale *et al.* 2006; Weinhold und Baldwin 2011).

Einleitung

Die in den glandulären Trichomen produzierten Sekundärmetabolite sind jedoch nicht nur für die Pflanzen wertvoll. Sie können darüber hinaus auch von großer wirtschaftlicher Bedeutung sein. So werden die in den Trichomen produzierten Sekundärmetabolite beispielsweise als Nahrungsergänzungsmittel und Duftstoffe (Schilmiller *et al.* 2008), natürliche Pestizide (Weston *et al.* 1989; Snyder *et al.* 1993; Frelichowski und Juvik 2001; Kennedy 2003; Zhang *et al.* 2008) oder in einigen Fällen auch als Medikamente (Weathers *et al.* 2011) eingesetzt. Aufgrund dieser wachsenden Bedeutung, der in den Trichomen produzierten sekundären Pflanzenstoffe, sind diese in den letzten Jahrzehnten zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt. Hierbei wurde das Augenmerk zum einen auf die Biosynthesewege verschiedener wirtschaftlich relevanter Stoffe gerichtet (Gang *et al.* 2001; Gang *et al.* 2002; Croteau *et al.* 2005; Covello 2008; Sallaud *et al.* 2009; Sallaud *et al.* 2012; Božić *et al.* 2015; Scheler *et al.* 2016). Zum anderen konzentrierte sich die Forschung vor allem auf die natürlichen Resistenzen gegen Pflanzenschädlinge, die durch die Trichome und die in ihnen produzierten Sekundärmetabolite vermittelt werden. Hierbei zeigte sich, dass viele durch den Menschen genutzte Kulturpflanzen natürliche Abwehrmechanismen, die durch die Trichome vermittelt werden, im Laufe der Domestizierung verloren haben. Besonders gut lässt sich dies im Falle der Tomaten nachvollziehen. So besitzen die im Bereich der Anden heimischen Wildformen der Tomate eine sehr hohe Resistenz gegen verschiedenste Pflanzenschädlinge, wohingegen die kultivierten Tomatenlinien zumeist sehr anfällig für Schädlinge und Krankheiten sind (Channarayappa *et al.* 1992). Die erhöhten Resistenzen der Wildformen korrelieren hierbei zum einen mit einer höheren Dichte an glandulären Trichomen (Channarayappa *et al.* 1992). Zum anderen produzieren die Trichome der Wildtomaten meist wesentlich größere Mengen an verschiedenen Sekundärmetaboliten (McDowell *et al.* 2011), wobei die verstärkte Akkumulation einzelner Substanzen ein entscheidendes Kriterium für die erhöhten Resistenzen darstellt (Frelichowski und Juvik 2001).

Ein Ziel der aktuellen Forschung im Bereich der glandulären Trichome ist die Wiedereinführung der durch die glandulären Trichome vermittelten natürlichen Resistenzen in unsere Kulturpflanzen, die zu einer massiven Senkung des Einsatzes von Pflanzenschutzmitteln während der Kultivierung der Pflanzen führen könnte. Dies wiederum würde einen positiven Effekt auf die Gesundheit von Verbrauchern und Umwelt haben und könnte zusätzlich zu einer Reduktion der Produktionskosten beitragen. Wie bereits erwähnt, ist für diese natürlichen Resistenzen nicht nur die Zusammensetzung der in den Trichomen produzierten Stoffe, sondern auch die Produktions- und Lagerkapazität der Trichome entscheidend. Deshalb ist neben der zum Teil bereits erfolgten

Charakterisierung der Biosynthesewege der in den glandulären Trichomen produzierten Sekundärstoffe auch ein detailliertes Verständnis über den Aufbau und die Entwicklung dieser Sekundärmetabolit-Fabriken notwendig.

1.4. Trichomentwicklung

Die Entwicklung von glandulären Trichomen wurde bereits an einigen wenigen Pflanzen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Trichomentwicklung zumeist in einem sehr frühen Stadium der Blattentwicklung beginnt (Unzelman und Healey 1974; Dell und McComb 1977; Werker und Fahn 1981; Ascensão und Pais 1987; Aschenbrenner *et al.* 2015). Die Entwicklung der glandulären Trichome kann dabei von Art zu Art sehr unterschiedlich ablaufen (zur Übersicht siehe Werker 2000). Grundsätzlich lassen sich jedoch drei Stadien der Entwicklung unterscheiden, die präsekretorische Phase, die sekretorische Phase und die postsekretorische Phase. In der präsekretorischen Phase entsteht zunächst durch Wachstum und eine Reihe von Zellteilungen der Grundkörper des Trichoms. Dieser Prozess beginnt zumeist mit der Auswölbung einer einzelnen Zelle aus der Epidermis (Abbildung 3 A). Diese Trichomvorläuferzelle durchläuft im Anschluss mehrere Zellteilungen, wodurch sich die für die glandulären Trichome typische Struktur aus Basalteil, Stiel und dem sekretorischen Köpfchen herausbildet (Abb. 3 B-F). Die Anzahl der Zellen des sekretorischen Köpfchens ist hierbei von Art zu Art verschieden. So bestehen etwa die Köpfchen der glandulären Typ VI Trichome der Tomaten aus vier Zellen (Channarayappa *et al.* 1992), während die Trichome der Pfefferminze acht sekretorische Zellen besitzen (Turner *et al.* 2000a). Nach Abschluss der grundlegenden Entwicklungsprozesse beginnt mit der sekretorischen Phase das zweite Stadium der Trichomentwicklung (Abb. 3 G, H). In dieser Phase beginnen die glandulären Trichome mit der Produktion, Lagerung und Freisetzung von spezifischen Sekundärmetaboliten. Grundsätzlich unterscheidet man hierbei zwischen kapitaten und peltaten Trichomen (Werker 1993). Bei den kapitaten Trichomen werden die produzierten Sekundärmetabolite direkt nach der Biosynthese sekretiert. Die peltaten Trichome dagegen lagern die produzierten Stoffe zunächst in einem speziellen Hohlraum ein und setzen sie erst zu einem späteren Zeitpunkt frei. Als Lagerort dient hierbei meist ein subkutikulärer Hohlraum, in dem die Sekundärmetabolite bis zu ihrer Freisetzung verbleiben. Nachdem die Lagerkapazität der Trichome erschöpft ist, gehen sie in die letzte Phase ihrer Entwicklung, die postsekretorische Phase, über (Abb. 3 I). In dieser Phase degenerieren die sekretorischen Zellen und stellen die

Einleitung

Biosynthese von Sekundärstoffen ein. Die Trichome dienen nun lediglich als Speicher für die produzierten Metabolite bis zu deren Freisetzung.

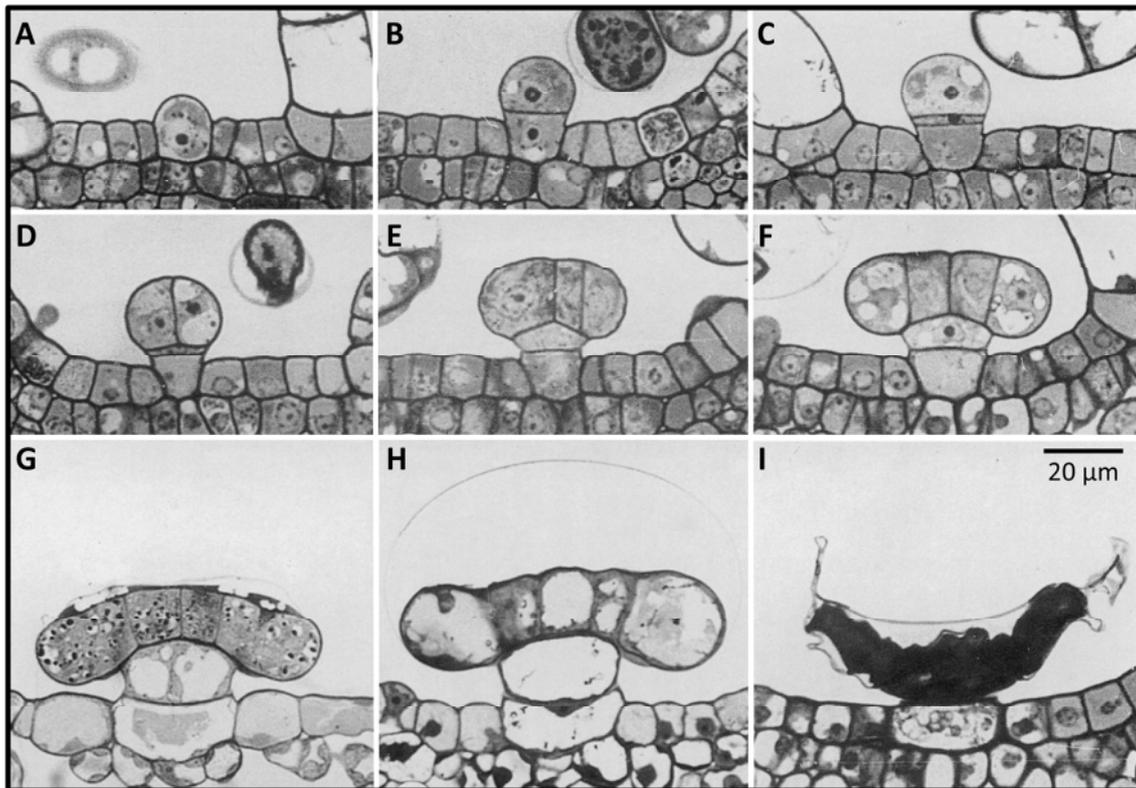


Abbildung 3: Entwicklung eines peltaten Trichoms: Initiation (A), presekretorische (B-F), sekretorische (G, H) und postsekretorische Phase (I) der Entwicklung eines glandulären Trichoms von *Origanum x intercedens* nach Bosabalidis und Exarchou 1995.

Diese Untersuchungen der sich entwickelnden Trichome von *Pharbitis*, *Eremophila*, *Inula*, *Artemisia*, *Mentha* und *Helianthus* liefern bereits einen ersten Überblick über den Prozess der Trichomentwicklung auf morphologischer Ebene. Über den Metabolismus und die Genexpression der glandulären Trichome im Laufe ihrer Entwicklung ist dagegen bisher nur wenig bekannt. So wurde bislang hauptsächlich die Initiation und Entwicklung von nicht-glandulären Trichomen wie etwa von *A. thaliana* auf Genebene ausführlich untersucht (Hülskamp *et al.* 1994; Hülskamp *et al.* 1999; Hülskamp 2004; Balkunde *et al.* 2010), wobei sich zeigte, dass die Initiation und Entwicklung der Trichome durch ein komplexes Zusammenspiel von verschiedenen Genen gesteuert wird. Ein erster Einblick in die Entwicklung von glandulären Trichomen auf Genebene konnte dagegen erst in jüngster Zeit am Beispiel von *S. lycopersicum* erhalten werden (Kang *et al.* 2016). Hierbei zeigte sich, dass die Störung des Aktin-Netzwerks zu einer gestörten Entwicklung der Typ I Trichome führt, die mit einer Veränderung der Zusammensetzung der produzierten Sekundärmetabolite einhergeht. Der molekulare Mechanismus, der dieser Beobachtung

zugrunde liegt, sowie der genaue Einfluss auf die Entwicklung der verschiedenen Trichomtypen bleiben dabei jedoch noch unklar. Des Weiteren konnten bisher keine Hinweise darüber gewonnen werden, weshalb sich die Trichome einiger Kulturpflanzen, wie etwa der Tomate, morphologisch so stark von den korrespondierenden Wildformen unterscheiden. Gerade diese Analysen könnten jedoch einen entscheidenden Beitrag bei der Wiedereinführung natürlicher Resistenzen in unsere Kulturpflanzen leisten.

1.5. Funktion und Aufbau der Zellwand

1.5.1. Entstehung des sekretorischen Hohlraumes innerhalb der Zellwand

Wie bereits unter 1.3. beschrieben wurde, ist die durch die Trichome vermittelte Resistenz der Tomatenpflanzen gegenüber verschiedenen Pflanzenschädlingen maßgeblich vom Umfang der Produktion und Lagerung von Sekundärmetaboliten abhängig. Die Lagerkapazität der Typ VI Trichome wird dabei entscheidend durch das Ausmaß der Entwicklung des sekretorischen Hohlraumes bestimmt. Aus diesem Grund ist die Untersuchung der Struktur und der Entstehung des sekretorischen Hohlraumes von großer Bedeutung.

Für die Herausbildung des Lagerortes der Sekundärmetabolite der Typ VI Trichome sind dabei verschiedene Prozesse der Auflösung und Remodellierung der Zellwände notwendig. Die Auflösung der entsprechenden Zellwandbereiche konnte dabei bereits bei den peltaten Trichomen der Pfefferminze beobachtet werden (Turner *et al.* 2000a). Hierbei zeigte sich, dass der subkutikuläre Hohlraum durch eine zielgerichtete Auflösung von Verbindungen in der äußeren Zellwand der glandulären Zellen entsteht. Ein Teil der Zellwand bleibt dabei mit der Kutikula verbunden und bildet weiterhin den äußeren Abschluss des Trichoms, wohingegen der Hauptteil der Zellwand als äußere Begrenzung an den sekretorischen Zellen verbleibt. Die Lagerung der gebildeten Sekundärmetabolite erfolgt somit quasi innerhalb der äußeren Zellwand der Trichome. Wie genau diese zielgerichtete Auflösung bestimmter Zellwandbereiche abläuft und welche Zellwandstrukturen und Enzyme an diesem Prozess beteiligt sind, ist bisher jedoch noch völlig unbekannt.

1.5.2. Aufbau pflanzlicher Zellwände

Ein besseres Verständnis über diesen Prozess der gezielten Auflösung eines bestimmten Zellwandbereiches erfordert neben der Identifikation der hierbei beteiligten Gene auch einen Einblick in die Struktur der entsprechenden Zellwände der glandulären Trichome. Pflanzliche Zellwände sind aus verschiedenen Polysacchariden aufgebaut. Die Zusammensetzung aus den unterschiedlichen Polysacchariden kann dabei sowohl zwischen verschiedenen Pflanzen als auch zwischen verschiedenen Zellen einer Pflanze sehr unterschiedlich sein. Grundsätzlich sind pflanzliche Zellwände immer aus einem Netzwerk aus Zellulose, Hemizellulose und Pektin aufgebaut (Abbildung 4). Der Hauptanteil pflanzlicher Zellwände wird dabei durch Zellulose gebildet. Zellulose ist ein Homopolymer aus D-Glucose-Einheiten, die durch 1,4-glykosidische Bindung miteinander verknüpft sind. In der Zellwand kommt Zellulose in Form von Mikrofibrillen vor, die wiederum Aggregate von langen Zelluloseketten darstellen. Im Gegensatz zu Zellulose ist Hemizellulose aus einer Reihe verschiedener Zucker aufgebaut, die an unterschiedlichen Positionen miteinander verknüpft sind. Je nach Zusammensetzung und Aufbau unterscheidet man dabei verschiedene Formen der Hemizellulose, wobei Xyloglukan, Xylan und Mannan die Hauptformen darstellen. Die Hauptfunktion der Hemizellulose liegt dabei in der Herstellung von Verbindungen zwischen Zellulose und Pektin, durch die das komplexe Geflecht der Zellwand entsteht. Diese Verbindungsstellen der Hemizellulosen mit anderen Zellwandpolymeren stellen wichtige Angriffspunkte für Proteine wie Expansine und Endoglukanasen dar, die bei der Auflockerung bzw. Auflösung von Zellwandmaterial wirken (siehe 1.5.3.). Die dritte Hauptkomponente der pflanzlichen Zellwände stellt die Gruppe der Pektine dar. Sie sind aus einer Vielzahl verschiedener Zucker und Zuckersäuren aufgebaut, die an unterschiedlichen Positionen miteinander verknüpft sein können. Aufgrund ihrer Zusammensetzung stellen sie die komplexeste Form von Polysacchariden in der Natur dar und können eine Vielzahl unterschiedlicher biologischer Funktionen haben. So sind sie unter anderem an Wachstums- und Entwicklungsprozessen, Zell-Zell-Adhäsion, Signalübertragung und Abszissionsprozessen beteiligt. Aufgrund ihres Aufbaus lassen sich verschiedene Klassen von Pektinen unterscheiden, von denen Homogalakturonan und Rhamnogalakturonan I die Hauptformen darstellen (Brett und Waldron 1990; Heredia *et al.* 1995; Ochoa-Villarreal *et al.* 2012). Homogalakturonan ist dabei aus 1,4-verknüpften Galakturonsäureeinheiten aufgebaut, welche lange lineare Ketten bilden und ca. 60% des Pektins in pflanzlichen Zellwänden ausmachen. Die einzelnen Galakturonsäuremonomere können an den Karboxylgruppen

methyliert, oder an der 2`-bzw. 3`-Position acetyliert sein, wobei der Methylierungs- und Acetylierungsstatus stark von der jeweiligen Pflanze, sowie dem Entwicklungsstadium der Zelle abhängig ist, was wiederum einen Einfluss auf die Festigkeit der Zellwand haben kann (siehe 1.5.3.). Die zweite Hauptform des Pektins wird mit einem Anteil von 20-35% durch Rhamnogalakturonan I gebildet. Rhamnogalakturonan I hat einen deutlich komplexeren Aufbau als Homogalakturonan. So besteht das Rückgrat aus 1,2- und 1,4-verknüpften Einheiten von Galakturonsäure und Rhamnose, an die verschieden lange und verzweigte Seitenketten aus Galaktose, Arabinose und anderen Zuckern angehängt sein können. Zusätzlich zu den Seitenketten kann das Rückgrat ebenfalls Acetylierungen aufweisen. Über die genaue Funktion der Acetylierungen, sowie der verschiedenen Seitenketten, ist bisher nur sehr wenig bekannt. Jedoch wurde bereits beobachtet, dass die Komposition der Seitenketten sehr entwicklungs- und gewebespezifisch ist, was eine Beteiligung bei der funktionellen Spezialisierung der Zellwände vermuten lässt (Brett und Waldron 1990; Ralet *et al.* 2005; Ochoa-Villarreal *et al.* 2012; Daher und Braybrook 2015; Levesque-Tremblay *et al.* 2015).

Die verschiedenen Polysaccharide sind in den pflanzlichen Zellwänden in verschiedenen Schichten organisiert, deren Zusammensetzung sich stark voneinander unterscheiden kann (Abbildung 4; Brett und Waldron 1990; Heredia *et al.* 1995). Die erste Zellwandschicht, die nach der Zellteilung entsteht, ist die Mittellamelle. Sie ist sehr dünn, hat eine gelartige Konsistenz und besteht hauptsächlich aus Pektinen. Auf die Mittellamelle wird anschließend die Primärwand aufgelagert. Sie ist deutlich dicker als die Mittellamelle und ist aus einem eher lockeren Netzwerk aus Zellulosefasern, Hemizellulose, Pektinen und verschiedenen Proteinen aufgebaut. Die Primärwand ist durch eine hohe Elastizität gekennzeichnet und erweitert sich während des Wachstums der Zelle durch eine von Proteinen katalysierte Auflockerung ihrer Struktur und dem Einbau von neuem Zellwandmaterial. Die meisten pflanzlichen Zellwände sind nur aus diesen beiden Zellwandschichten aufgebaut. Bei einigen spezialisierten Zellen wird jedoch eine weitere Schicht, die Sekundärwand, gebildet, sobald die Zelle ihr Wachstum beendet hat (Heredia *et al.* 1995). Sekundärwände bestehen zum überwiegenden Teil aus dicht gepackten Zellulose- und Hemizellulosefibrillen, in die Lignin und Mineralsubstanzen eingelagert sind. In Abhängigkeit von ihrer Funktion können in ihnen zahlreiche weitere Verbindungen, wie etwa Suberin und Kutin, eingelagert sein, die ihre mechanischen Eigenschaften beeinflussen. Im Gegensatz zu den Primärwänden sind die Sekundärwände sehr starr und können in ihrer Struktur nicht aufgelockert werden.

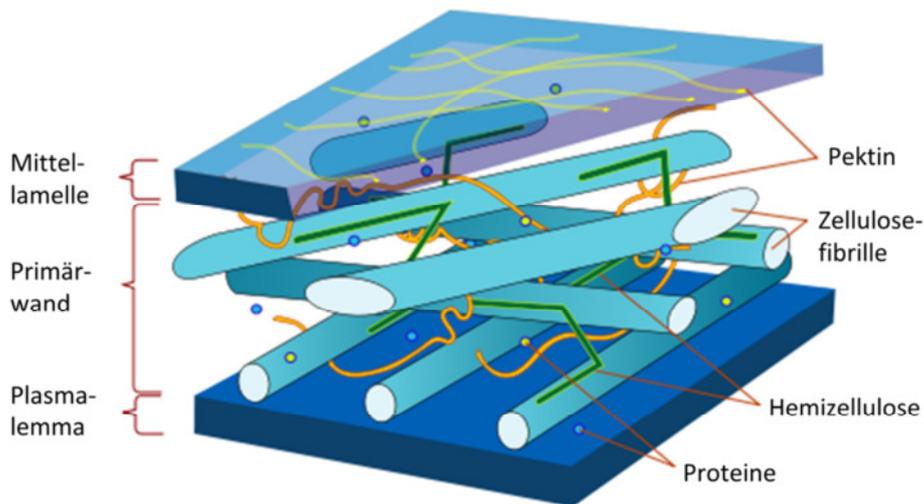


Abbildung 4: Grundaufbau der pflanzlichen Zellwand: Zusammensetzung der pflanzlichen Primärzellwand aus Zellulose, Pektin, Hemizellulose und Proteinen. Quelle Bild: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/87/Plant_cell_wall_diagram-en.svg/2000px-Plant_cell_wall_diagram-en.svg.png

1.5.3. Auflockerung pflanzlicher Zellwandstrukturen

Aufgrund der Eigenschaften der einzelnen Zellwandschichten ist es am wahrscheinlichsten, dass der subkutikuläre Hohlraum der glandulären Trichome durch eine Auflockerung bzw. Auflösung bestimmter Verbindungen innerhalb der Primärwand entsteht. Aktuelle Untersuchungen zeigten, dass Proteine verschiedener Klassen an der Auflockerung bzw. Auflösung von Zellwänden beteiligt sein können (Cosgrove 2016). Die zuerst entdeckte Klasse von Proteinen mit dieser Funktion wird dabei durch die Expansine dargestellt (McQueen-Mason *et al.* 1992). Expansine haben ein pH-Optimum im sauren Milieu und binden an den Übergängen zwischen Zellulosefibrillen und Matrixpolysacchariden. Sie weisen keine enzymatische Aktivität auf. Stattdessen scheinen sie die Auflockerung der Zellwandstrukturen durch die reversible Auflösung von nicht-kovalenten Wechselwirkungen zu katalysieren (McQueen-Mason und Cosgrove 1994; McQueen-Mason und Cosgrove 1995). Neben den Expansinen könnten auch verschiedene Endoglukanasen eine Funktion bei der Auflockerung von Zellwandstrukturen spielen. Im Gegensatz zu den Expansinen stellen die Endoglukanasen dabei Enzyme dar, die Zellulose- und Hemizellulosefibrillen verdauen können (Ohmiya *et al.* 1995; Yoshida und Komae 2006; Urbanowicz *et al.* 2007). Aufgrund dieser enzymatischen Aktivität ist eine Beteiligung dieser Enzyme bei der Auflockerung bzw. Auflösung von Zellwandstrukturen wahrscheinlich, obgleich bisher kein direkter Nachweis hierfür erbracht wurde (Cosgrove 2016). Darüber hinaus können auch Pektatlyasen, Peroxidasen, Arabinofuranosidasen und

Xylosidasen direkt oder indirekt an der Remodellierung und Auflockerung von Zellwandstrukturen beteiligt sein (Marín-Rodríguez *et al.* 2002; Passardi *et al.* 2004; Tateishi *et al.* 2005; Arsovski *et al.* 2009; Sampedro *et al.* 2010; Günl und Pauly 2011). Des Weiteren wird auch über die Beteiligung von verschiedenen Pektin-modifizierenden Enzymen an diesem Prozess spekuliert. So wurde gezeigt, dass die Demethylierung von Pektin für eine Auflockerung von Zellwandstrukturen etwa im Bereich der Meristeme verantwortlich sein kann (Peaucelle *et al.* 2011; Braybrook und Peaucelle 2013) und eine wichtige Rolle beim Auseinanderlösen von Pollentetraden bei *A. thaliana* spielt (Francis *et al.* 2006). Andererseits zeigten Untersuchungen am Hypokotyl von Mungbohne und Gurke, dass die Pektin-Demethylierung und Deacetylierung auch zu einer Verfestigung der Zellwandstrukturen führen kann (Goldberg *et al.* 1986; Zhao *et al.* 2008; Orfila *et al.* 2012).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass das bisherige Wissen über die Bildung und Auflockerung von Zellwandstrukturen sehr begrenzt ist. Da diesem Prozess jedoch eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der glandulären Trichome zukommt, ist eine genauere Untersuchung der beteiligten Gene und Enzyme von großer Bedeutung.

1.6. Ernte von glandulären Trichomen

Als Voraussetzung für die im Rahmen dieser Arbeit durchzuführenden Analysen der Genexpression und des Metabolismus der Typ VI Trichome im Verlauf ihrer Entwicklung muss zunächst eine geeignete Methode für die selektive Ernte von Typ VI Trichomen verschiedener Entwicklungsstadien etabliert werden. Eine mögliche Variante hierfür stellt die Mikrodissektion dar, die bereits für die Ernte von unterschiedlichen Trichomtypen verwendet wurde (McDowell *et al.* 2011). Mit dieser Methode kann jedoch nur eine sehr begrenzte Menge an Material gesammelt werden, wodurch Analysen der Genexpression und des Metabolismus erschwert werden. Zwar wurden bereits Genexpressions- (Qiu *et al.* 2012; Ramsköld *et al.* 2012; Angermüller *et al.* 2016) bzw. Metabolituntersuchungen (Nemes *et al.* 2011; Walker *et al.* 2013; Li *et al.* 2013; Nakashima *et al.* 2016) an sehr wenigen oder sogar einzelnen Zellen durchgeführt. Die Durchführung dieser Analysen birgt jedoch zahlreiche Schwierigkeiten und setzt verschiedene Kriterien voraus. So ist für die Analyse der Genexpression einzelner Zellen eine Amplifikation der isolierten RNA notwendig, was sowohl zu einer geringeren Sensitivität, als auch zu einer niedrigeren Reproduzierbarkeit der Genexpressionsstudien führt (Shanker *et al.* 2015). Die Analyse des Metabolismus einzelner Zellen ist zudem auf wenige, hoch abundante Metabolite

Einleitung

beschränkt und bedarf des Weiteren einer extrem sensitiven Messmethode, sowie eines extrem sensitiven Massenanalysators (Zenobi 2013; Misra *et al.* 2014). Mit der Etablierung einer geeigneten Methode zur Ernte größerer Mengen an Typ VI Trichomen verschiedener Entwicklungsstadien in hoher Reinheit und Qualität könnten diese Probleme umgangen werden. Auch für die Ernte entsprechender Mengen an Typ VI Trichome wurden bereits verschiedene Methoden beschrieben (Schillmiller *et al.* 2010; Balcke *et al.* 2014). Die etablierten Methoden erlauben jedoch keine separate Ernte von Typ VI Trichomen verschiedener Entwicklungsstadien. Darüber hinaus weisen die so gesammelten Typ VI Trichomfraktionen eine niedrige Reinheit (Balcke *et al.* 2014) auf, oder sind nicht für die Isolation und Analyse von RNA geeignet (Schillmiller *et al.* 2010). Die Glaskugelmethode (Schillmiller *et al.* 2010), die ursprünglich für die Isolation von Salbeitrichomen entwickelt wurde (Gershenzon *et al.* 1992), könnte zwar als Ausgangspunkt für die Entwicklung eines geeigneten Verfahrens für die Ernte von Typ VI Trichomen verschiedener Entwicklungsstadien in größeren Mengen dienen. Hierfür müsste zunächst aber eine Möglichkeit für die Trennung der Typ VI Trichome in verschiedene Entwicklungsstadien gefunden werden. Als Grundlage hierfür könnte etwa die Dichtegradientenzentrifugation dienen, die bereits für die separate Ernte von verschiedenen Trichomtypen des Tabaks verwendet wurde (Sallet *et al.* 2014). Weiterhin müsste die Methode so modifiziert werden, dass sie neben der Extraktion von Metaboliten auch die Extraktion von intakter mRNA erlaubt. Die Erfüllung dieser zahlreichen Kriterien würde den Weg für die Durchführung verschiedener Metabolit- und Transkriptuntersuchungen von jungen und reifen Trichomen ebnen, wobei die hierdurch erhaltenen Daten wiederum zur Aufdeckung grundlegender Prozesse der Trichomentwicklung beitragen können.

1.7. Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit soll ein grundlegender Einblick in die Entwicklung der glandulären Typ VI Trichome von Wild- und Kulturtomate am Beispiel von *S. habrochaites* LA1777 und *S. lycopersicum* LA4024 gewonnen werden. Im Fokus dieser Untersuchungen sollen insbesondere zwei zentrale Fragestellungen stehen, die sich aus den bereits erfolgten Untersuchungen der Tomatentrichome ergeben.

1. Was befähigt die Typ VI Trichome von *S. habrochaites* zur Produktion und Lagerung großer Mengen an pflanzlichen Sekundärstoffen und unter welchen Umständen erfolgt die Freisetzung der eingelagerten Substanzen?

2. Aus welchem Grund sind die Trichome von *S. lycopersicum* in einem wesentlich geringeren Umfang zur Produktion, Lagerung und Freisetzung von Sekundärmetaboliten in der Lage?

Zur Untersuchung dieser Fragestellungen soll zunächst mit Hilfe verschiedener Mikroskopieverfahren und Färbungen ein Überblick über die Struktur der reifen Typ VI Trichome der beiden Tomatenlinien gewonnen werden. Parallel hierzu sollen die verschiedenen Entwicklungsstadien der Typ VI Trichome identifiziert und analysiert werden. Die dabei gewonnenen Einblicke in die Entwicklung der Trichome sollen Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den beiden Tomatenlinien aufzeigen. Nach dieser ersten Charakterisierung der Trichomentwicklung soll durch elektronenmikroskopische Untersuchungen ein detaillierterer Einblick in den subzellulären Aufbau der jungen und reifen Trichome, sowie über den Lagerort der großen Mengen an pflanzlichen Sekundärstoffen in den Trichomen von *S. habrochaites* gewonnen werden.

Des Weiteren soll mit Hilfe verschiedener Zellwandfärbungen ein Überblick über den Aufbau und die Dicke der Zellwände junger und reifer Typ VI Trichome von *S. lycopersicum* und *S. habrochaites* erhalten werden. Anschließend sollen Immunmarkierungsexperimente mit verschiedenen Pektin-bindenden Antikörpern eine Übersicht über die Struktur des Pektins im Laufe der Trichomentwicklung geben. Parallel hierzu soll eine Methode für die massenspektrometrische Analyse der Zellwandbestandteile etabliert werden. Die Methode soll dabei den molekularen Aufbau sowie das Verhältnis zwischen den beiden Hauptbestandteilen des Pektins, dem Homogalakturonan und dem Rhamnogalakturonan I, erfassen und zur Analyse der Typ VI Trichome der beiden untersuchten Tomatenlinien genutzt werden. Die so erhaltenen Daten sollen Anhaltspunkte geben, weshalb die Form der Typ VI Trichome von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* so unterschiedlich ist und weshalb die Trichome von *S. habrochaites* einen wesentlich größeren sekretorischen Hohlraum ausbilden.

Neben diesen histologischen Untersuchungen soll durch Analysen des Metabolismus und der Genexpression verschiedener Entwicklungsstadien der Typ VI Trichome von *S. habrochaites* ein erster Einblick über spezifische Prozesse der Trichomentwicklung gewonnen werden. Hierfür muss zunächst eine geeignete Methode für die Ernte von Typ VI Trichomen verschiedener Entwicklungsstadien etabliert werden. Die Methode soll dabei die Ernte von jungen sowie reifen Trichomen in hoher Qualität und Quantität erlauben und eine massenspektrometrische Analyse der Sekundärmetabolitgehalte ermöglichen. Darüber hinaus soll eine auf RNA-seq-basierte Transkriptomanalyse

Einleitung

Einblicke in molekulare Prozesse der Trichomentwicklung liefern und zur Identifikation von entwicklungsspezifischen Genen beitragen.

Alle im Umfang dieser Arbeit gewonnenen Information über die Entwicklung der Typ VI Trichome stellen eine wesentliche Grundlage für die weitere Erforschung der Trichom-induzierten Resistenz der Wildtomaten gegen Pflanzenschädlinge dar und können im Zusammenspiel mit gezielten Kreuzungen und Züchtungen zur Wiedereinführung der natürlichen Resistenzen in die kommerziell genutzten Tomatenlinien beitragen.

2. Material und Methoden

2.1. Anzucht der Pflanzen

Die Samen der verwendeten Tomatenlinien LA1049, LA1777, LA3189 und LA4024 stammen vom *Tomato Genetics Resource Center* (Universität von Kalifornien, Davis, Kalifornien). Die Anzucht der Pflanzen erfolgte auf Erde im Gewächshaus bei 25 °C und 55% Luftfeuchtigkeit während des Tages und 20 °C und 75% Luftfeuchtigkeit in der Nacht. Die Beleuchtungsintensität war dabei abhängig von den Witterungsbedingungen und schwankte zwischen 5 und 25 kLux bei einer Beleuchtungsdauer von 16 Stunden pro Tag. Die Pflanzen wurden täglich gegossen und einmal in der Woche mit 0.1% Kamasol Brilliant Blau (Compo Expert GmbH, Krefeld, Deutschland) gedüngt. Da von *S. habrochaites* LA1777 kein Saatgut gewonnen werden konnte, erfolgte die Vermehrung dieser Linie mittels Kopfstecklingen, die zunächst 4 Wochen auf Legaton wuchsen, bevor sie in Erde umgesetzt wurden. Die Ernte des Pflanzenmaterials für alle Experimente erfolgte an Pflanzen eines Alters von 2 bis 4 Monaten.

2.2. Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM)

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Trichomform wurde an frischen Apizes mit einem ESEM XL-30 FEG (FEI/Philips, Eindhoven, Niederlande) im *wet* modus durchgeführt. Der Gasdruck in der ESEM Kammer betrug dabei 1,5 mBar und wurde durch Wasserdampf reguliert. Für die Erstellung der Bilder wurde ein *Gaseous-secondary-electron-detector* (ElectroScan, Frankfurt, Deutschland) verwendet.

2.3. Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Die mikroskopischen Untersuchungen wurden sowohl an isolierten Trichomen, als auch an Trichomen, die sich noch am Blatt befanden, durchgeführt. Für die Bestimmung der Dichte an glandulären Trichomen auf der Blattoberfläche wurden dabei zunächst von je 5 jungen Fiederblättchen (Länge ca. 2 cm) Hellfeldaufnahmen an einem AZ 100 Mikroskop (Nikon Instruments Europe, Amsterdam, Niederlande) erstellt. Anschließend wurde die Anzahl an Trichomen auf der Blattoberseite und Unterseite durch manuelles Auszählen bestimmt und die Blattfläche mittels ImageJ (Fiji 64-bit, *public domain*) ermittelt. Für die Ermittlung der Größe der Typ VI Trichome wurden ebenfalls Hellfeldaufnahmen von Trichomen auf

Material und Methoden

jungen Blättern an einem AZ 100 Mikroskop (Nikon Instruments Europe, Amsterdam, Niederlande) erstellt und mittels ImageJ (Fiji 64-bit, *public domain*) analysiert.

Die Betrachtung der Entwicklungsstadien isolierter Trichome erfolgte im Hellfeld- und Fluoreszenzmodus an einem AxioImager Z1 (Zeiss, Jena, Deutschland), wobei für die Erstellung der Fluoreszenzbilder das Filterset 9 (Anregung 450-490 nm, Emission 515 nm Langpass) verwendet wurde.

Alle konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurden an einem LSM 780 (Zeiss, Jena, Deutschland) erstellt. Die Autofluoreszenz wurde dabei bei 405 nm angeregt und bei 420-545 nm (Zellwand) und 645-735 nm (Chlorophyll) aufgenommen. Die Dicke der optischen Schnitte betrug ca. 1,5 μm . Die Fluoreszenzspektren der jungen Trichome, sowie von wässrigen Riboflavin-, FMN- und FAD-Lösungen (0,1 mg/ml, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurden bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm und einem Scanbereich von 415-715 nm mit einer Schrittweite von 9-10 nm aufgenommen.

2.4. Anfärbung des sekretorischen Hohlraumes

Um Hinweise über den Lagerort, der in den Typ VI Trichomen produzierten Sekundärstoffe, zu erhalten, wurden intakte Typ VI Trichome von *S. habrochaites* mit NADI-Reagenz (David und Carde 1964) und Nilrot angefärbt. Für die Anfärbung mittels NADI-Reagenz wurde zunächst unmittelbar vor der Verwendung die hierzu benötigte Färbelösung, bestehend aus 50 mM 1-Naphthol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in 50%igem Ethanol und 50 mM N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiamin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in PBS, hergestellt. Die Färbung der Terpene wurde anschließend an jungen Blättern mittels Vakuuminfiltration 5-mal jeweils für 3 min durchgeführt. Nach anschließendem 5-maligen Waschen mit 20% Ethanol, wurden die angefärbten Trichome im Hellfeld an einem AZ 100 Mikroskop (Nikon Instruments Europe, Amsterdam, Niederlande) analysiert. Für die Anfärbung mittels Nilrot (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurde zunächst eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml in Ethylacetat hergestellt. Die Anfärbung der Trichome erfolgte durch Vakuuminfiltration (5-mal jeweils 3 min) an jungen Blättern mit einer 1:100-Verdünnung der Stammlösung in Wasser. Die Analyse der angefärbten Trichome erfolgte an einem LSM 780 Konfokalmikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland). Als Anregungswellenlängen wurden dabei 405 und 488 nm verwendet, die Fluoreszenz wurde bei 410-520 nm (Zellwand), 553-642 nm (Nilrot) und 645-735 nm (Chlorophyll) aufgenommen. Die Dicke der optischen Schnitte betrug ca. 1,5 μm .

2.5. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Für die TEM-Untersuchungen wurde zunächst Blattmaterial der beiden Tomatenlinien in Spurr's Harz (Spurr 1969) eingebettet. Hierfür wurden junge Blätter in Natriumkakodylat Puffer (pH 7,2) mit 3% (v/v) Glutaraldehyd (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) geerntet und für 4 Stunden bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Blätter in Natriumkakodylat Puffer (pH 7,2) gewaschen und mit 1% (w/v) Osmiumtetroxid (Roth, Karlsruhe, Deutschland) nachfixiert. Danach erfolgten die Dehydrierung durch Ethanol mit aufsteigenden Konzentrationen und die finale Einbettung in Spurr's Harz. Nach der vollständigen Polymerisation wurden Ultradünnschnitte (80 nm) mit einem Ultramicrotome S (Leica, Wetzlar, Deutschland) angefertigt und auf Formvar beschichtete Kupfergitter transferiert. Vor der Betrachtung der Schnitte mit einem Libra 120 Transmission Electron Microscope (TEM; Zeiss, Oberkochen, Deutschland) erfolgte eine Nachfärbung für 60 min mit Uranylacetat und 10 min mit Bleicitrat bei 25 °C. Die Bilder wurden mit einer Dual-Speed on axis SSCCD Kamera (BM-2k-120; TRS, Moorenweis, Deutschland) aufgenommen.

Für die Immunogoldmarkierung von Callose wurden die Ultradünnschnitte auf Formvar beschichtete Nickelgitter transferiert und zunächst für 30 min in *Blockingreagenz*, bestehend aus 1% (w/v) acetyliertem BSA (Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland) und 0,1% Tween (v/v) in PBS, inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit dem primären anti-1-3- β -Glukan Antikörper aus Maus (Biosupplies, Parkville, Australien) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Danach erfolgten ein 4-maliges Waschen mit Blockierungsreagenz und die Inkubation (90 min bei RT) mit dem sekundären, mit 10 nm Goldpartikeln konjugierten, Antikörper aus Ziege (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland). Nach 4-maligem Waschen mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte schließlich wie oben beschrieben gewaschen und analysiert.

2.6. Einbettung in PEG 1500

Die Einbettung von jungen Blättern in PEG erfolgte nach der Prozedur von Hause *et al.* (1996). Hierfür wurden von 4-6 Wochen alten Pflanzen Apizes und junge Blätter mit einer Größe von etwa 5 mm in 4% (w/v) Para-Formaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) / 0,1% (v/v) Triton X-100 (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in PBS geerntet und 3-mal für je 5 min vakuumfiltriert. Anschließend wurde das Material für 2 Stunden unter Schütteln fixiert. Danach wurde das Material 2-mal mit PBS gewaschen und in aufsteigenden

Material und Methoden

Ethanolkonzentrationen wie folgt entwässert: 30 min 10% Ethanol, 60 min 30% Ethanol, 60 min 50% Ethanol, über Nacht 70% Ethanol, 30 min 90% Ethanol, 30 min 100% Ethanol. Die anschließende Infiltration mit PEG 1500 (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde bei 50 °C wie folgt durchgeführt: 30 min 100% Ethanol, 60 min 25% PEG in Ethanol, 60 min 50% PEG in Ethanol, 60 min 75% PEG in Ethanol, 60 min 100% PEG in Ethanol. Die Einbettung und die Aushärtung des infiltrierte Materials erfolgten bei Raumtemperatur.

2.7. Anfärbung von Lignin und Suberin

Die Anfärbung der Zellwandpolymere Lignin und Suberin wurde an in PEG 1500 eingebetteten *S. habrochaites* Apizes durchgeführt (siehe 2.6.). Hierfür wurden zunächst 3 µm Schnitte der eingebetteten Apizes hergestellt und auf poly-Lysin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) beschichtete Objektträger transferiert. Für die Anfärbung des Suberins wurde zunächst eine 1%ige (w/v) Stammlösung Fluorol Yellow 088 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) in Dimethylsulfoxid hergestellt. Anschließend erfolgte die Färbung der Schnitte mit einer 1:20 Verdünnung der Stammlösung in Wasser, für 60 Minuten bei 50 °C. Nach mehrmaligem Waschen mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte im Fluoreszenzlicht an einem AxioImager Z1 (Zeiss, Jena, Deutschland) untersucht, wobei das Filterset 9 (Anregung: 450-490 nm, Emission: 515 nm Langpass) verwendet wurde. Die Anfärbung des Lignins erfolgte mit einer 1%igen (w/v) Phloroglucinollösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in 20%iger Salzsäure für 60 Minuten. Nach mehrfachem Waschen mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte im Hellfeld an einem AxioImager Z1 (Zeiss, Jena, Deutschland) untersucht.

2.8. Immunmarkierungen

Die Immunmarkierungsexperimente wurden an in PEG 1500 eingebetteten jungen Blättern von *S. habrochaites* (siehe 2.6.) nach einem modifizierten Protokoll von Verhertbruggen *et al.* (2009) durchgeführt. Hierfür wurden zunächst 3 µm Schnitte hergestellt und auf poly-Lysin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) beschichtete Objektträger transferiert. Im Anschluss wurden die Schnitte 2-mal mit PBS gewaschen und für 5 min in 0,1 M Ammoniumchlorid inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die freien Bindungsstellen 30 min lang mit 5% BSA (w/v) in PBS blockiert. Die Inkubation mit den primären Antikörpern LM6, LM13, LM19 und JIM7 (monoklonale Antikörper aus Ratte

von PlantProbes, Leeds, Vereinigtes Königreich) erfolgte in einer 1:10 Verdünnung in 5% (w/v) BSA in PBS über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurden die Schnitte 3-mal mit 0,1% BSA (w/v) in PBS und einmal mit 1% BSA (w/v) in PBS gewaschen, bevor die Inkubation mit dem sekundären Antikörper durchgeführt wurde. Hierzu wurden die Schnitte für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem FITC-gekoppelten sekundären Antikörper (aus Ziege von Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:100 in 5% BSA (w/v) in PBS inkubiert. Schlussendlich wurden die Objektträger erneut in PBS gewaschen, mit 60 µl anti-Ausbleichlösung (Citifluor; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania) beschichtet und mit einem Deckgläschen versiegelt. Die Betrachtung der Schnitte erfolgte an einem LSM 780 (Zeiss, Jena, Deutschland), bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm und einer Emissionswellenlänge von 505-570 nm.

2.9. Bestimmung des Rutingehaltes

Die Ermittlung des Gehaltes an Rutin erfolge an isolierten Trichomen, die durch Abbürsten der Blattoberseite, mit Hilfe eines in flüssigem Stickstoff getränkten Pinsels, nach Balcke *et al.* (2014) geerntet wurden. Nach dem Abbürsten wurden die isolierten Trichome durch ein 63 µm Stahlsieb (A-technik, Leinburg, Deutschland) von den Blattfragmenten getrennt und über Nacht gefriergetrocknet. Die Extraktion der Sekundärmetabolite erfolgte aus 3,7 mg der getrockneten Trichome durch 1 ml 75%iges Methanol. Der Aufschluss der Trichome erfolgte dabei mit Hilfe von fünf 3 mm Stahlkugeln durch den Einsatz (3-mal je 30 s bei 5 m/s) einer Fastprep24 (MP Biomedicals GmbH, Eschwege, Deutschland). Vor der Bestimmung der Rutinkonzentrationen wurden die Extrakte 1:100 mit 75%igem Methanol verdünnt. Die Analyse des Rutins erfolgte an einem LC-MS-System, bestehend aus einer Aquity UPLC (Waters, Eschborn, Deutschland) und einem TripleTOF 5600 Massenspektrometer (SCIEX, Toronto, Kanada). Für die Auftrennung der Metabolite wurden 0,5 µl der Probe auf eine Nucleoshell RP 18 2,7 µm Säule (150 x 2 mm, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) injiziert und in einem Lösungsmittelsystem aus A: 0,3 mM Ammoniumformiat und B: Acetonitril mit folgendem Gradienten getrennt: 0-2 min isokratisch bei 95% A, 2-19 min linear von 95% zu 5% A, 19-22 min isokratisch bei 5% A, 22-22,01 min linear von 5% A zu 95% A, 22,01-24 min isokratisch bei 95% A. Die Flussgeschwindigkeit betrug dabei 400 µl/min, die Säulentemperatur lag bei 40 °C. Die Analyse des Rutins erfolgte mittels ESI im negativen Modus, wobei die CID-Spektren im SWATH-Modus (siehe Hopfgartner *et al.* 2012) erfasst wurden. Die Integration der Peakflächen erfolgte mittels MultiQuant (Version 2.0.2.; SCIEX, Toronto, Kanada). Die

Material und Methoden

Ermittlung der Rutinkonzentration wurde mit Hilfe einer Eichgeraden eines authentischen Standards (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) durchgeführt.

2.10. Extraktion und Analyse der autofluoreszierenden Substanzen

Zunächst sollte die unbekannte fluoreszierende Substanz aus den jungen Trichomen von *S. habrochaites* mit Hilfe verschiedener Lösungsmittel extrahiert und anschließend mittels LC-MS analysiert werden. Für die Extraktion wurden dabei zunächst Typ VI Trichomköpfe mit Hilfe der Glaskugelmethode in Sorbitolpuffer geerntet (siehe 2.14.) und durch ein 45 µm Stahlsieb (A-technik, Leinburg, Deutschland) gefiltert, um eine Anreicherung der jungen Trichome zu erhalten. Zur Extraktion der Substanz wurden die Trichome anschließend für 10 min mit Gemischen aus 50% Methanol/ 50% Wasser, 75% Methanol/ 25% Wasser, 75% Methanol/ 25% Ammoniaklösung (25%ig; Merck, Darmstadt, Deutschland) und 75% Methanol/ Ameisensäure (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) sowie mit reinem Methanol, Acetonitril, (beide von Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) Tetrahydrofuran und Dichlormethan (beide von Roth, Karlsruhe, Deutschland) bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Zusätzlich wurden junge Trichome für 3 Stunden mit 1 M Salzsäure (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 1 M Natronlauge (Merck, Darmstadt, Deutschland) bei 80 °C unter Schütteln extrahiert.

Da die fluoreszierende Substanz aus den Trichomen von *S. habrochaites* nicht mit LC-MS kompatiblen Lösungsmitteln extrahiert werden konnte, wurde für diese Analysen auf Typ VI Trichomköpfe der Mutante LA1049 zurückgegriffen. Hierfür wurden zunächst ebenfalls Trichome mit Hilfe der Glaskugelmethode in Sorbitolpuffer geerntet (siehe 2.14.) und durch ein 45 µm Stahlsieb (A-technik, Leinburg, Deutschland) gefiltert, um eine mit jungen Trichomen angereicherte Fraktion zu erhalten. Nach der Zentrifugation und der Abnahme des Überstandes erfolgte die Extraktion der fluoreszierenden Substanz mit Hilfe von 100 µl 75%igem Methanol durch mehrfaches Vortexen. Anschließend wurden die extrahierten Trichome abzentrifugiert (5 min, 15.000g), der Überstand wurde abgenommen und filtriert (PVDF 96 well Filter 0,2 µm, Corning). Die Analyse der Extrakte erfolgte an einer Aquity UPLC (Waters, Eschborn, Deutschland) mit einem integrierten Fluoreszenzdetektor. Für die Auftrennung der extrahierten Metabolite wurde eine Nucleoshell RP 18 plus Säule (2,7 µm, 2 mm x 150 mm; Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) und ein Lösungsmittelsystem aus 0,3 mM Ammoniumformiat (Lösungsmittel A; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und Acetonitril (Lösungsmittel B) mit folgendem Gradienten verwendet: 0-2 min isokratisch bei 95% A,

2-49 min linear von 95% zu 55% A, 49-53 min linear von 55% zu 5% A, 53-55 min isokratisch bei 5% A, 55-55,1 min linear von 5% zu 95% A, 55,1-60 min isokratisch bei 95% A. Die Flussgeschwindigkeit betrug dabei 400 $\mu\text{l}/\text{min}$, die Temperatur der analytischen Säule lag bei 40 °C. Das Injektionsvolumen betrug 5 μl . Die Analyse der Fluoreszenzsignale erfolgte im 3D Modus, bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm und einem Scanbereich von 420-750 nm, wodurch zu jedem Peak ein Fluoreszenzspektrum gewonnen werden konnte. Parallel, zur Analyse der Fluoreszenz, wurde die Probe an einem QTRAP 6500 Massenspektrometer (SCIEX, Toronto, Kanada) analysiert. Die chromatographische Trennung der Probe erfolgte dabei an einer baugleichen Aquity UPLC unter den gleichen Bedingungen wie an der Fluoreszenz-gekoppelten UPLC. Die Ionisation der Analyten erfolgte im negativen und im positiven Modus, wobei sowohl ein *Enhanced Mass Scan* (EMS) als auch ein *Enhanced Product Ion Scan* (EPI) für die Ionen 375,1 im negativen Modus und 377,1 im positiven Modus aufgenommen wurde. Die Scanbereiche von EMS und EPI lagen bei 65-1000 Da und 65-380 Da. Die Kollisionsenergie des EPIs lag bei – 45 V mit einem *Collision Energy Spread* (CES) von ± 35 V. Die Analyse des Riboflavinstandards (0,1 mg/ml, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurde an der gleichen Aquity UPLC in Kombination mit einem TripleTOF 5600 Massenspektrometer (SCIEX, Toronto, Kanada) unter den gleichen chromatografischen Bedingungen wie für die Analyse der Trichomextrakte durchgeführt. Die Erfassung der massenspektrometrischen Daten erfolgte dabei im negativen und positiven Modus, wobei die CID-Spektren im SWATH-Modus bei einer Kollisionsenergie von – 45 V mit einem CES von ± 35 V (siehe Hopfgartner *et al.* 2012) erfasst wurden.

2.11. Extraktion von Zellwandmaterial

Die Extraktion des Zellwandmaterials wurde nach dem Verfahren von Lunn *et al.* (2013) durchgeführt. Hierfür wurden zunächst Trichomköpfe und trichomfreie Blätter von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* mit Hilfe der Glaskugelmethode (siehe 2.14.) in Sorbitolpuffer geerntet. Von dem so erhaltenen Trichom- und Blattmaterial wurden 2 g in flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend 5-mal mit 10 ml 70%igem Ethanol bei Raumtemperatur extrahiert. Anschließend erfolgte eine 3-malige Extraktion mit 10 ml 85%igem Ethanol bei 80 °C. Zum Schluss wurde das Zellwandmaterial nochmals mit jeweils 10 ml Chloroform/Methanol (1:1) und Aceton bei Raumtemperatur extrahiert. Der Extraktionsrückstand wurde anschließend über Nacht unter einer Abzugshaube getrocknet.

2.12. Massenspektrometrische Untersuchung der Pektinstruktur

Von dem getrockneten Zellwandmaterial wurden 5 mg für die Analyse der Pektinstruktur verwendet. Vor der massenspektrometrischen Untersuchung erfolgte zunächst ein Verdau des Pektins mit Hilfe von 10 Units Pektolyase (Duchefa, Haarlem, Niederlande) und 40 Units Pektinase (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in 200 µl eines 20 mM Ammoniumacetatpuffers (pH 4,5; mit Essigsäure eingestellt) bei 37 ° C für zwei Stunden. Im Anschluss hieran wurde der Verdau durch ein kurzes Einfrieren der Reaktionsansätze in flüssigem Stickstoff gestoppt. Nach dem Auftauen der Proben wurden die verbleibenden Zellwandbestandteile durch Zentrifugation (5 min, 15.000 g, RT) abgetrennt. Vor der Analyse der Pektinoligomere erfolgte eine Filtration der Proben (PVDF 96 well Filter 0,2 µm, Corning). Die massenspektrometrische Analyse der Proben erfolgte im Anschluss an einer Aquity UPLC (Waters, Eschborn, Deutschland) in Kombination mit einem TripleTOF 5600 Massenspektrometer (SCIEX, Toronto, Kanada) durch Ionenpaarchromatographie nach einer von Balcke *et al.* (2011) modifizierten Methode. Die chromatographische Trennung der Pektinoligomere wurde hierbei auf einer Nucleoshell RP 18 plus Säule (2,7 µm, 2 mm x 150 mm; Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) mit einem Lösungsmittelsystem aus 10 mM Tributylamin (pH 6,2; mit Essigsäure eingestellt) in Wasser (Lösungsmittel A; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und Acetonitril (Lösungsmittel B) mit einer Flussgeschwindigkeit von 400 µl/min und folgendem Gradienten durchgeführt: 0-2 min isokratisch bei 98% A, 2-18 min linear von 98% zu 64% A, 18-21 min linear von 64% zu 5% A, 21-22,5 min isokratisch bei 5% A, 22,5-22,52 min linear von 5% zu 98% A, 22,52-24 min isokratisch bei 98% A. Die Temperatur der analytischen Säule lag hierbei bei 40 °C. Die Ionisation der Pektinoligomere erfolgte mittels ESI im negativen Modus, wobei die CID-Spektren im SWATH-Modus (siehe Hopfgartner *et al.* 2012) erfasst wurden. Die Identifizierung der Pektinoligomere erfolgte anhand der exakten Masse (< 5 ppm), sowie des MS² Fragmentspektrums im Vergleich mit den Spektren von Galakturonsäure und Digalakturonsäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), nach MetlinScripps (<https://metlin.scripps.edu>), Leijdekkers *et al.* (2011) und Remoroza *et al.* (2012). Für die Integration der Peakflächen wurde die Software MarkerView (Version 3.0, SCIEX, Toronto, Kanada) verwendet. Die Signifikanz der Unterschiede in den Gehalten der einzelnen Oligomere zwischen den Proben wurde mit Hilfe eines studentschen t-Tests (Matrix1; Matrix2; 2; 2) ermittelt.

2.13. Analyse verschiedener Flavonoid-Konjugate aus sortierten Trichomen

Für die Analyse verschiedener Flavonoid-Konjugate wurden zunächst 4 biologische Replikate aus jeweils 10.000 jungen bzw. reifen Trichomen in 1,5 ml *Lobind tubes* (Eppendorf, Köln, Deutschland), gesammelt. Die Extraktion der polaren und semi-polaren Metabolite erfolgte durch 400 µl Methanol/Wasser 3:1 unter Schütteln für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben für 3 min bei 15.000 g zentrifugiert. Vor der hierauf folgenden Analyse der Metabolitgehalte wurde der Überstand abgenommen und auf einen finalen Methanolanteil von 30% in einem Gesamtvolumen von 1,3 ml verdünnt. Die Online-SPE LC-MS Analyse wurde an einer Symbiosis Pico UHPLC (SPARK, Emmen, Holland) in Kombination mit einem QTrap 6500 Massenspektrometer (SCIEX, Toronto, Kanada) durchgeführt. Für die Anreicherung der Metabolite mittels SPE wurden dabei Resin GP Kartuschen (SPARK, Emmen, Holland) verwendet. Die Konditionierung und Equilibrierung der Kartuschen erfolgte mit 1 ml Acetonitril, 2 ml saurem Wasser (1% Essigsäure) und 2 ml Wasser. Im Anschluss daran wurde 1 ml des Extraktes mit einem Fluss von 500 µl/min auf die Kartusche geladen und mit 100 µl Wasser gewaschen. Danach wurde die Kartusche in eine Reihe mit der analytischen Säule (Nucleoshell RP 18 plus 2,7 µm, 2 mm x 150 mm; Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) geschaltet und über einen Zeitraum von 6 min durch die LC Gradientenpumpe mit einem Fluss von 50 µl bestehend aus 70% Acetonitril (Lösungsmittel B) und 30% 0,3 mM Ammoniumformiat pH 6,2 (mit Ameisensäure eingestellt; Lösungsmittel A) eluiert. Gleichzeitig wurde auf der analytischen Säule eine Peakfokussierung durchgeführt, indem durch einen *High Pressure Dispenser* (HPD) saures Wasser (pH 3; mit Essigsäure eingestellt) mit einer Flussrate von 250 µl/min zugegeben wurde. In den danach folgenden 2 min wurden die Startbedingungen für die chromatographische Trennung der Metabolite eingestellt, indem die Gradientenpumpe auf 95% Lösungsmittel A gesetzt wurde. Währenddessen wurde durch den HPD weiterhin saures Wasser mit einem Fluss von 250 µl/min gepumpt. Um *carry-over* Effekte zu minimieren wurde jede Probe auf eine neue Kartusche geladen. Die Trennung der Analyten mittels *Reversed Phase*-Chromatographie erfolgte bei einer Säulentemperatur von 40 °C durch einen Gradienten aus 0,3 mM Ammoniumformiat pH 6,2 (Lösungsmittel A; pH mit Ameisensäure eingestellt) und Acetonitril (Lösungsmittel B). Die Laufzeit des Gradienten lag bei 30 min und hatte folgendes Profil: 0-6 min isokratisch 30% A bei 50 µl/min Fluss, 6-6,1 min linear von 30% A nach 95% A bei 50 µl/min Fluss, 6,1-8 min isokratisch bei 95% A und 50 µl/min Fluss. Nach der Elution der SPE Kartusche und der Peakfokussierung wurde der

Material und Methoden

Fluss auf 400 $\mu\text{l}/\text{min}$ erhöht. Die anschließende chromatographische Trennung der Metabolite erfolgte mit folgendem Gradientenprogramm: 8-8,1 min isokratisch bei 95% A und Erhöhung des Flusses von 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ auf 400 $\mu\text{l}/\text{min}$, 8,1-19 min linear von 95% nach 5%, 19-21 min isokratisch bei 5% A, 21-22 min linear von 95% zu 30%, 22-30 min isokratisch bei 30% A und 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ Flussrate. Die massenspektrometrische Analyse der Metabolite wurde mittels ESI im negativen Modus durchgeführt. Die Detektion der Metabolite erfolgte dabei durch *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) mit den in Tabelle 1 dargestellten Massenübergängen. Die Haltezeit (*dwell time*) betrug hierbei jeweils 20 Millisekunden. Die Identifizierung der gemessenen Metabolite erfolgte durch die exakte Masse (< 5 ppm) und das MS^2 Fragmentspektrum einer separaten Probe von unsortierten Trichomen, die unter den gleichen chromatographischen Bedingungen an einem TripleTOF 5600 Massenspektrometer (SCIEX, Toronto, Kanada) analysiert wurde. Die Signifikanz der Unterschiede in den Gehalten der verschiedenen Flavonoid-Konjugate zwischen den Proben wurde mit Hilfe eines studentschen t-Tests (Matrix1; Matrix2; 2; 2) ermittelt.

Tabelle 1: MRM Übergänge der detektierten Flavonoid-Konjugate: $[\text{M}-\text{H}]^-$ Masse der Vorläufer- (MS^1) und der Fragment-Ionen (MS^2) sowie die für die Fragmentierung verwendete Kollisionsenergie der analysierten Flavonoid-Konjugate.

Name	MS^1	MS^2	Kollisionsenergie in V
Tetramethylmyricetin	373,09	358,069	-33
Trimethylmyricetin	359,08	344,05	-33
Trimethylquercetin	343,082	328,059	-33
Dimethylquercetin	329,066	314,043	-33
Kämpferoldiglukosid	609,145	284,04	-46
Quercetindiglukosid	625,14	300,027	-46
Quercetinrutinosid	609,145	300,027	-46

2.14. Trichomernte

Die Ernte der Typ VI Trichome erfolgte mit Hilfe der Glaskugelschüttelmethode nach Schillmiller *et al.* (2010) mit einigen Modifizierungen.

Für die mikroskopischen Untersuchungen, sowie für die massenspektrometrischen Analysen der Flavonoid-Konjugate und der Zellwände wurden die Typ VI Trichome auf Eis in gekühltem Sorbitolpuffer (200 mM Sorbitol, 50 mM Tris-Cl, 20 mM Sucrose, 10 mM Kaliumchlorid, 5 mM Magnesiumchlorid, 5 mM Bernsteinsäure, 1 mM Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure, 0,5 mM Dikalium-

hydrogenphosphat und 0,015% (v/v) Triton X-100; alle von Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland; Roth, Karlsruhe, Deutschland oder Merck, Darmstadt, Deutschland) geerntet. Hierzu wurden in 250 ml Glasflaschen jeweils ca. 200 Apizes von ausgewachsenen Tomatenpflanzen geerntet. Nach der Ernte wurden in jede Flasche ca. 15 g Glaskugeln (\varnothing 0,75-1 mm; Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben. Anschließend wurden die Flaschen per Hand für 2 Minuten geschüttelt. Die abgetrennten Köpfchen der Typ VI Trichome wurden durch Sieben über ein 150 μm und ein 63 μm Stahlsieb (A-technik, Leinburg, Deutschland) von den Glaskugeln und Blattfragmenten getrennt und auf einem 45 μm (reife Trichome) bzw. 25 μm Sieb (Fraktion mit jungen Trichomen) aufgefangen. Danach wurden die Trichomköpfchen von den im Puffer stehenden Sieben abpipettiert. Die Quantifizierung der geernteten Trichome erfolgte durch manuelles Auszählen der in 2,25 μl enthaltenen Trichome mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer an einem AxioImager Z1 Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland). Vor der weiteren Verwendung der geernteten Trichome wurden diese durch Zentrifugation bei (750 g, 5 min, 4 °C) aufkonzentriert.

Für die Extraktion von RNA wurde die gesamte Trichomernte in 70%igem Ethanol auf Eis durchgeführt.

2.15. Dichtegradientenzentrifugation

Die weitere Anreicherung der jungen Typ VI Trichome für RNA und Metabolit-Extraktionen wurde mit Hilfe eines Dichtegradienten nach Sallets *et al.* (2014) durchgeführt. Hierfür wurde ein vierstufiger Percoll®-Gradient, bestehend aus Percoll®/Sorbitolpuffer (für die Isolation von Sekundärmetaboliten) bzw. Percoll®/Ethanol (für die Isolation von RNA), vorbereitet. Die 4 Schichten des Gradienten bestanden dabei aus je 3 ml Percoll®/Sorbitolpuffer (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland; Roth, Karlsruhe, Deutschland) bzw. Percoll®/Ethanol mit einem Percoll®-Anteil von 20%, 45%, 55% und 80% (v/v). Nach der Herstellung des Gradienten wurde die Trichomfraktion <45 μm und >25 μm vorsichtig auf den Gradienten geladen. Im Anschluss daran wurde der Gradient für 15 min bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert (Avanti J-30I, Rotor JS24.15; Beckmann-Coulter, Krefeld, Deutschland). Nach der Zentrifugation wurde die Fraktion der jungen Trichome (zwischen 55% und 45% Percoll®) und die Fraktion der reifen Trichome (zwischen 80% und 55% Percoll®) abgenommen und mit 10 ml Sorbitolpuffer bzw. 10 ml 70% Ethanol gewaschen und bis zur weiteren Analyse auf Eis gelagert. Die Quantifizierung der geernteten Trichome erfolgte durch manuelles

Material und Methoden

Auszählen der in 2,25 µl enthaltenen Trichome mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer an einem AxioImager Z1 Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland).

2.16. Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrische Sortierung der Trichome zum Zwecke der Isolation von RNA wurden die Trichome zunächst in RNAlater® Solution (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) überführt. Um dabei ein Verklumpen der Trichome zu verhindern, wurden die Trichome zunächst in PBS gewaschen und über einen 50 µm Nylonfilter filtriert. Die weitere Sortierung der Trichome erfolgte an einem FACS cell sorter Aria II (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland). Für die Sortierung wurde eine 100 µm Düse und die blaue Laserlinie (350 nm) verwendet. Der Schwellwert für die Sortierung wurde auf den Alexafluor 488 Kanal gesetzt. Die Unterscheidung von einzelnen Trichomen und Aggregaten erfolgte in der Darstellung eines Punktediagramms in dem *Forward Scatter Area* (FSC-A) gegen *Forward Scatter Hight* (FSC-H) aufgetragen wurden. Die Trennung von jungen und reifen Trichomen erfolgte dann im Punktediagramm der Fluoreszenzkanäle für Alexafluor 488 gegen PerCP. Die sortierten Trichome wurden auf Objektträgern (für mikroskopische Aufnahmen), in *LoBind tubes* (Eppendorf, Köln, Deutschland) mit RNA-Extraktionspuffer (für die Extraktion von RNA) oder in leeren *LoBind tubes* (für die Extraktion von Metaboliten) gesammelt. Die genaue Anzahl der erhaltenen Trichome wurde vom *cell sorter* ermittelt.

2.17. RNA-Isolation

Für die Isolation von RNA, aus den mittels Dichtegradientenzentrifugation sortierten Trichomen, wurden etwa 10 mg Frischgewicht eingesetzt. Die RNA-Isolation erfolgte dabei mit Hilfe des RNeasy Plant Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben. Vor der Präparation der *RNA-libraries* wurde die erhaltene RNA mit Hilfe des RNA NucleoSpin XS Kits (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben aufkonzentriert und in 10 µl Wasser eluiert. Die Ermittlung der RNA-Konzentrationen wurde an einem Nanodrop™ (Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Überprüfung der RNA-Qualität wurde mit Hilfe eines Bioanalyzer Nanochips (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) an einem Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) durchgeführt. Die Analyse erfolgte dabei nach Herstellerangaben mit 50 ng Gesamt-RNA.

Die RNA-Isolation der mittels Durchflusszytometrie sortierten Trichome wurde mit Hilfe des RNA NucleoSpin XS Kits (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Anstatt der im Kit enthaltenen polyA-RNA wurden 20 µg lineares Polyacrylamid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) als *Carrier*-Partikel eingesetzt. Die RNA wurde in 5 µl Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Überprüfung der RNA-Qualität und -Quantität wurde mit Hilfe eines Bioanalyzer Picochips (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) an einem Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) durchgeführt. Die Analyse erfolgte dabei nach Herstellerangaben mit etwa 1 ng Gesamt-RNA.

2.18. Transkriptanalyse mittels RNA-Seq

Für die RNA-Seq-Analyse wurden zunächst Trichome in Sorbitolpuffer geerntet und mittels Sieben vorsortiert (siehe 2.14.). Vor der im Anschluss erfolgenden Sortierung mittels Dichtegradientenzentrifugation (siehe 2.15.) wurden die Trichome in 70% Ethanol überführt. Die Erstellung der *libraries* erfolgte anhand der mittels Dichtegradientenzentrifugation sortierten Trichome. Hierfür wurden 3 biologische Replikate angefertigt, die jeweils eine Mischung aus den Trichomen von 300 Tomatenpflanzen darstellten. Aus den so erhaltenen Proben wurde RNA isoliert und mittels NanodropTM (Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland) quantifiziert. Da aus den Fraktionen der jungen Trichome nur 750 – 1100 ng RNA isoliert werden konnte, wurden für die Herstellung der 3'-*Fragment-libraries* von jedem Replikat 750 ng Gesamt-RNA verwendet. Die Erstellung der 3'-*Fragment-libraries* und die Sequenzierung mittels Illumina HiSeq 2000 (100 Basenpaare-Zyklen, *Single-End-Reads*) erfolgte durch MWG-Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland). Vor der Analyse der Sequenzierungsdaten erfolgte ein Qualitätscheck mit Hilfe von FASTQC (Babraham Institut, Cambridge, Vereinigtes Königreich). Für das *Mapping* der ausgelesenen Fragmente (*Reads*) wurde das Programm RNA-Star (Version 2.4; Dobni *et al.* 2013) und die Annotation ITAG2.4 (solgenomics) verwendet. Die Auszählung der *Reads* erfolgte durch das Bioconductor Package "Genomic Alignments" mit Hilfe der Funktion "summarizeOverlaps". Die Ermittlung der unterschiedlich exprimierten Gene wurde durch edgeR (Robinson *et al.* 2010) mit den Parametern: Expressionsdifferenz >2 und False discovery rate < 0,05 durchgeführt. Der Vergleich der Proteinsequenzen von einigen ausgewählten Genen mit den Proteinsequenzen von *Arabidopsis* (Dataset - TAIR 10 Proteins) wurde mit Hilfe von BLASTP (TAIR, Phoenix Bioinformatics, Redwood City, Kalifornien) durchgeführt.

2.19. Genexpressionsanalyse mittels qPCR

Für die Validierung der RNA-Seq-Daten, sowie für die Analyse der Genexpression in jungen und reifen Trichomen von *S. lycopersicum*, wurden zunächst Typ VI Trichome in 70% Ethanol geerntet. Die anschließende Trennung der geernteten Fraktion in junge und reife Trichome mittels Siebens (siehe 2.14.) und Dichtegradientenzentrifugation (siehe 2.15.) erfolgte ebenfalls in 70%igem Ethanol. Auf diese Weise wurden 4 biologische Replikate geerntet, die jeweils eine Mischung der Trichome von 300 Pflanzen (*S. habrochaites*) bzw. 500 Pflanzen (*S. lycopersicum*) darstellten. Von der aus den sortierten Trichomen isolierten RNA (siehe 2.17.) wurden jeweils 600 ng (*S. habrochaites*) bzw. 300 ng (*S. lycopersicum*) für die cDNA Synthese eingesetzt. Die Synthese der cDNA erfolgte dabei mit dem ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB, Frankfurt am Main Deutschland) nach Herstellerangaben. Vor der Analyse der Expression von 52 Genen mittels qPCR, wurde die erhaltene cDNA (20 µl) 1:10 verdünnt. Die qPCR erfolgte in einem Ansatz von 10 µl bestehend aus 2 µl EvaGreen Q-PCR Mix (Bio&Sell, Feucht, Deutschland), 1 µl cDNA, 0,1 µl je Primer (forward und reverse je 10 µM) und 6,8 µl destilliertem Wasser in einem CFX Connect Real-Time PCR System (Biorad, Hercules, Kalifornien). Das Temperaturprogramm bestand dabei aus Initialisierung (15 min, 95 °C) und 50 Zyklen Denaturierung (15 s, 95 °C) und Elongation (30 s, 60 °C). Für jedes biologische Replikate wurden dabei 2 technische Replikate erstellt, woraus sich insgesamt 8 Replikate für jedes Entwicklungsstadium ergeben. Die für die qPCR verwendeten Primer wurden mit Geneious (Version 6.0, Biomatters, Auckland, Neuseeland) anhand der Gensequenzen von *S. habrochaites* LA1777 erstellt und von MWG-Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die Normalisierung der Daten erfolgte anhand der Expression der Referenzgene Aktin (Solyc03g078400.2.1 für *S. habrochaites*) bzw. Transkriptionsinitiationsfaktor IIB (Solyc01g088720.2.1 für *S. lycopersicum*). Die Signifikanz der Expressionsunterschiede zwischen den Proben wurde mit Hilfe eines studentischen t-Tests (Matrix1; Matrix2; 2; 2) ermittelt. Eine Liste der verwendeten Primer ist in der nachfolgenden Tabelle zu finden.

Tabelle 2: Sequenzen der bei der Datenvalidierung mittels qPCR verwendeten Primer

<u>Referenzgene</u>			
	Genidentifikationsnummer	Richtung	Primersequenz
1	Solyc06g063370.2.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	GCAGCCGCCTTCTTTTGAA GTCCGGTCAAGTTTAGCGGT
2	Solyc11g068430.1.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	ACGGATCTTTCTGGACGACA CCCTCCTGTGAGTGTGGAT
3	Solyc02g080540.1.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	GGAGACCACATCGAACAGGG CGCTCTGCTGTCAGCTCTT
4	Solyc04g081400.2.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	GCGCAAACCTGGAAGAGGAG TGTCGTTATATCTGCCGTCCG
5	Solyc10g085020.1.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	TTTGACCTTTGACTTCCCG CCGCGCACATCATGTTCTTG
6	Solyc04g064700.2.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	TTGCGCATATGAGACCTCCA CGTCCACCTCTATGTCTGCC
7	Solyc01g088720.2.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	AGGTTTTGGGCTGCTAGTCC CGCCACTAGACCCACCAGAT
8	Solyc03g078400.2.1.	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	TTGTTGCACCACCTGAGAGGAAGT TGTGGACAATGGAAGGACCAGACT
<u>Kandidatengene</u>			
	Genidentifikationsnummer	Richtung	Primersequenz
1	Solyc11g072890.1.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	TCACTCAAATTCCTTGTCTTCCC AATGCCTACACGAAATACTATCCA
2	Solyc05g046290.2.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	CTATCTCCCTTGCTTGTGC GTGGGGTCAGCTCATGATGA
3	Solyc12g089380.1.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	GCAGGTTGAGCCATGTCAA TTACAGCCACTAATTTTTGTCCACC
4	Solyc07g042390.1.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	ATGGAAAACATTTACGTTTGAGGT AACAGTTTCGTCACACTTTGAGG
5	Solyc02g083610.2.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	GAGGGTGGAAGTGGTGAAG TGC GTTCATTGAGGAATACTGG
6	Solyc01g068380.2.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	TGCCTACTAAAGATGCAAGTGA TGGTCCAAGTTAAACCCAGCC
7	Solyc03g083900.2.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	TCACTTTCTTGTAGGATGATGAGCT AATAGACGGGACACTGTGCA
8	Solyc09g008250.2.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	CCCAGCTTTTTGTGGAAGAGC GAAAGGGCCATGGTACCAG
9	Solyc05g014120.1.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	CGATGACGATGAAACACTAATTTCT TCCATTTTTCCCGATAGAGAGCA
10	Solyc06g065630.2.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	AAGCCACGGGCAGTGGGAGT GAGGGCTCCAATTGCACCAGA
11	Solyc09g008810.2.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	TGACAACCTTTTCTTGTCCA TGCAATGCAAACACAACATGG

Material und Methoden

<u>Kandidatengene</u>			
	Genidentifikationsnummer	Richtung	Primersequenz
12	Solyc01g111830.2.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	TTGCATGTGATGTTGTTAGCTGT GTCATGATCGAGTAGTATGTGATGC
13	Solyc03g019890.2.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	CGTTAATAATCAACGAGCGTCGA ACGGAATGTCGTCGTCGTT
14	Solyc03g006150.2.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	GGATCAACCTTGGTAGGAGGC AAAGCAAGTACTTAGGAGATCTCAC
15	Solyc12g006430.1.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	CGATCGCGGGTGATCAGTTT CCTCCTCCAAATCTTCACTCC
16	Solyc01g079570.2.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	AGTAGATAGAGCTGGTGTTCGA TCCAAGAACTGATGCTTGAAGTG
17	Solyc08g082250.2.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	AACCAAATCAATCCCCTAGCTT CGAAGCTCAGAGATCTGGGT
18	Solyc04g050570.2.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	TGCACCCTCTATTACTACTCTT CCACCTAGTTCATTCTTTGAC
19	Solyc10g008120.2.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	AATAATTGATCCTCATGAGTGTGC ACATCAATCTAACACATAACCCCTC
20	Solyc09g010860.2.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	ATGAGCACTCTGCCATGCTC TGTGGCCTTCTGTGTTGCTT
21	Solyc10g079860.1.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	TCCTGTTTGTGCTCCTGTGA TGCCATGGCTTGTACCAAAC
22	Solyc03g121600.2.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	GTCTCCGGCGACCGAAAACCG GTGATAATGCTCCAACGTCGAGTACC
23	Solyc03g111550.2.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	GGCTAGCATGTTTCTACACGG TGAGACCATACTGACTCGAG
24	Solyc04g063230.2.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	AGGTCAGTAAAATGGAAAGTGAAGA CTATCTGTTCTTGATTTGGACGCC
25	Solyc05g053790.1.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	TGGGTAAACACGAAGGTACCT TGAGCAATTTCTTACCAGGC
26	Solyc11g010460.1.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	ACCCCTTAATCAAAATCCAGTCT GGGATTTTGATTAAAGGGTGTGGT
27	Solyc04g071890.2.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	ACCTTTAGTTAAAGCAGGCCTTT AGCTATAGCCATGGTGTCAACT
28	Solyc02g088190.2.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	TGAAGTCCAGCTTTGGTAGGT AAGGACCTTGGACACCTGAAG
29	Solyc11g008630.1.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	CGAGCTTGAAGAAGGGCCTT ACCCAATCAATTGCACTTCT
30	Solyc09g014350.2.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	TCAATATGGGGATGAGCACCC ACAAACACACAATCTCTAGCTCA
31	Solyc10g081490.1.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	TGGAGGAGTTAGCAATGATGATGT TGGAGGAGGACTTGTCTTTTCA
32	Solyc03g025320.2.1	<i>forward Primer</i> <i>reverse Primer</i>	GAGGTGGCCCCACTACAAAG GGCTGGCAATGGGATTAGCA

<u>Kandidatengene</u>			
	Genidentifikationsnummer	Richtung	Primersequenz
33	Solyc02g089440.2.1	forward Primer reverse Primer	TCAGCAACAATGAGGTAACAGAA ACAGCCTTAGTTTGCTCTGGA
34	Solyc05g007830.2.1	forward Primer reverse Primer	TTCCAGAAGCATCACCACCC GTTGGTCTTCTTGCAATGGTGT
35	Solyc05g005080.2.1	forward Primer reverse Primer	ACCAACTTTGCTGCGTTTCA GCAACAGACTCAGCAACTGA
36	Solyc05g005080.2.1	forward Primer reverse Primer	TGTGTGGGGTGCATCCTGGC AGCACCAGCGTGTGGCGA
37	Solyc09g091430.2.1	forward Primer reverse Primer	TTTCAGAGCTCAGCAACTGC TTGTTGCTTCTCGTCGGAGT
38	Solyc01g104950.2.1	forward Primer reverse Primer	ACCGCGATCCCAGATGGGGAA TCGCGTGCTGCAGACCTTT
39	Solyc01g008530.2.1	forward Primer reverse Primer	CACCCACCCTACCCTCTT AACAAATTTCAACCTCATCTGATCG
40	Solyc06g076920.2.1	forward Primer reverse Primer	TCTCCTCCATTACAGCAAGAGC TTGGATGAGTGGACAAGGGA
41	Solyc09g074530.2.1	forward Primer reverse Primer	TGACATGAAAGCGGTGGTGG ATCAACACTAACAACTTCTTCTTGC
42	Solyc02g038740.2.1	forward Primer reverse Primer	AAGATGTCACCAAGGCGTCC GAGGCTACTTGCGGGATCAC
43	Solyc04g082200.2.1	forward Primer reverse Primer	ACAACCTCAGATGAAATTGCCTCT GTGGAAGCTACTGACCGTGG
44	Solyc08g006310.2.1	forward Primer reverse Primer	TACTCTTAACGGCGTCAGCT TCAAGACCAACGAGGAGGAA

Für die Überprüfung der Expression des *Bli1* Transkriptionsfaktors (Solyc09g008250.2.1) in den RNAi-Pflanzen wurde zunächst von den Blättern von jeweils 6 Wildtyp bzw. RNAi-Pflanzen eine separate RNA Isolation durchgeführt. Hierfür wurde das RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Die Synthese der cDNA und die Durchführung der qPCR erfolgten wie zuvor beschrieben, wobei die identischen Primerpaare wie für die Genexpressionsanalysen verwendet wurden.

3. Ergebnisse

3.1. Morphologische Charakterisierung der Entwicklung von Typ VI glandulären Trichomen

Für die detaillierte Charakterisierung der Entwicklung der glandulären Typ VI Trichome von Wild- und Kulturtomate war zunächst ein grundlegendes Verständnis des Aufbaus der Typ VI Trichome sowie die Identifizierung der verschiedenen Entwicklungsstadien erforderlich. Ein erster Einblick hierüber sollte durch die Analyse von intakten und isolierten Trichomen mit Hilfe verschiedener lichtmikroskopischer Verfahren erhalten werden. Die Identifikation der verschiedenen Entwicklungsstadien der Typ VI Trichome sollte dabei als Grundlage für die weitere subzelluläre Analyse der Trichome im Laufe der Entwicklung mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen dienen.

3.1.1. Mikroskopische Betrachtung glandulärer Typ VI Trichome

Ein Vergleich der Wildtomate *Solanum habrochaites* LA1777 und der Kulturtomate *Solanum lycopersicum* LA4024 zeigte, dass der Anteil der verschiedenen Trichomtypen zwischen den beiden Linien variiert (Abbildung 5 A, B, C, D). So sind bei beiden Tomatenlinien Typ I, III, VI und VII Trichome vorzufinden, wohingegen Typ IV Trichome nur bei *S. habrochaites* und Typ V und VIII nur bei *S. lycopersicum* vorzufinden sind (siehe Einleitung Abbildung 2). Zusätzlich fiel auf, dass *S. habrochaites* deutlich mehr glanduläre Trichome als *S. lycopersicum* besitzt (LA1777: 2573 Trichome/cm² ± 183 Trichome/cm²; LA4024: 714 Trichome/cm² ± 192 Trichome/cm², n=5). Weiterhin war erkennbar, dass auch die Form der einzelnen Trichomtypen zwischen *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* sehr unterschiedlich sein kann. Auf die Typ VI Trichome trifft dies in besonderem Maße zu (Abb. 5 E und F). So weisen die Typ VI Trichome von *S. lycopersicum* einen deutlich kürzeren Stiel als die Trichome von *S. habrochaites* auf. Darüber hinaus ist auch die Form des glandulären Köpfchens sehr unterschiedlich. Während das Trichomköpfchen bei *S. lycopersicum* einem vierblättrigen Kleeblatt ähnelt, weist das Köpfchen bei *S. habrochaites* eine runde, ballähnliche Form auf, die mit einem größeren Durchmesser des Köpfchens (LA1777 69,5 µm ± 5,9 µm; LA4024: 56,9 µm ± 4,6 µm, n=50) einhergeht. Schlussendlich zeigte ein optischer Schnitt durch die Trichome, dass sich im Inneren des Trichomköpfchens ein extrazellulärer Hohlraum befindet, dessen

Größe sich wiederum stark zwischen *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* unterscheidet. Der Hohlraum der Trichome von *S. habrochaites* LA1777 nimmt dabei mit ca. 65% des Gesamtvolumens des Trichomköpfchens etwa den siebenfachen Anteil im Vergleich zum Hohlraum der Trichome von *S. lycopersicum* LA4024 ein. Da der Hohlraum als Lagerplatz für die in den Drüsenzellen produzierten Sekundärmetabolite zu dienen scheint, wie Anfärbungen mit den Farbstoffen NADI (David und Carde 1964) und Nilrot indizieren (siehe Anhang Abbildung A1), liefert dies zudem eine Erklärung für die höhere Akkumulation dieser Substanzen in den Trichomen von *S. habrochaites* (McDowell *et al.* 2011). Da die Menge der produzierten Sekundärmetabolite für die Resistenz der Pflanzen gegen Pflanzenschädlinge von entscheidender Bedeutung ist (Frelichowski und Juvik 2001), ist die genauere Erforschung der Entstehung dieses Hohlraumes für die Wiedereinführung der natürlichen Resistenz der Wildtomaten in die Kulturpflanzen somit von großem Interesse.

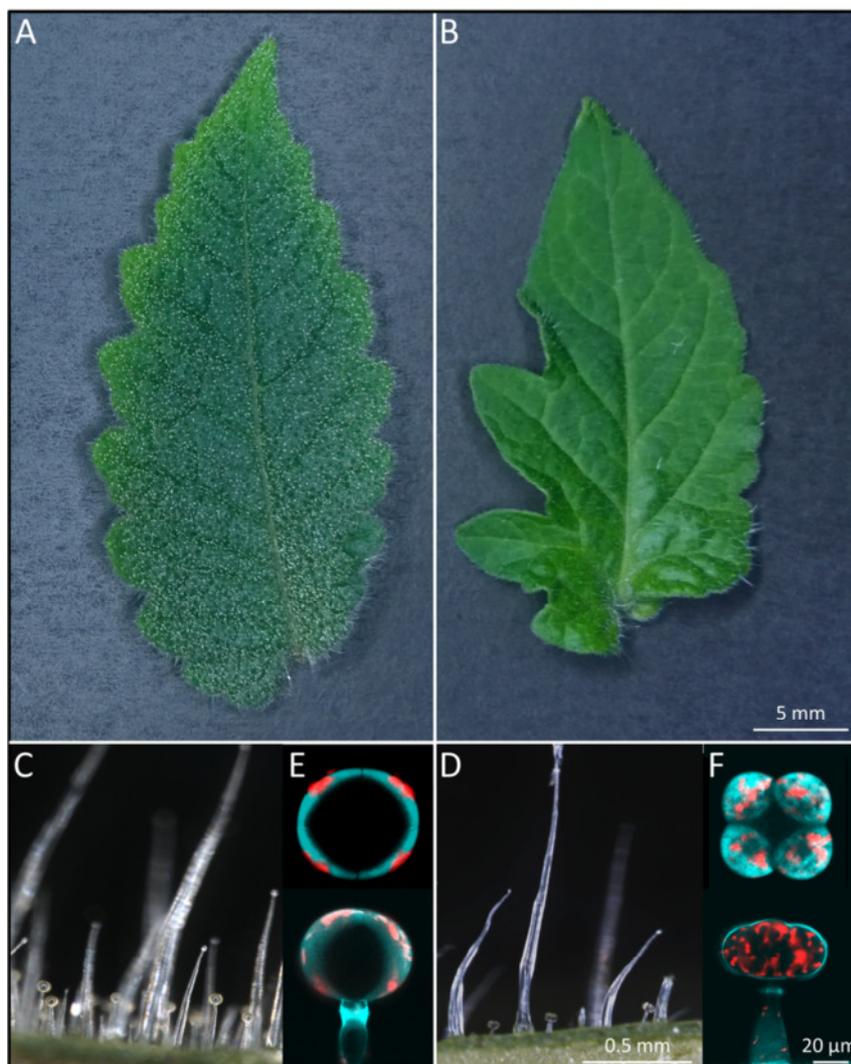


Abbildung 5: Überblick über die Trichomdichte und die Struktur der Typ VI Trichome von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum*: Blattoberseite von *S. habrochaites* LA1777 (A, C) mit hoher Trichomdichte und *S. lycopersicum* LA4024 (B, D) mit niedriger Trichomdichte. Konfokalmikroskopischer Überblick des Aufbaus der Typ VI Trichome von *S. habrochaites* (E) und *S. lycopersicum* (F), Ex.: 405 nm, Em.: 420-545 nm (cyan) bzw. 645-735 nm (rot).

3.1.2. Identifizierung junger Typ VI Trichome

Für die genauere Charakterisierung der Entwicklung der Typ VI Trichome, war zunächst die Identifikation der einzelnen Entwicklungsstadien notwendig. Erste Anhaltspunkte hierfür konnten durch *Environmental Scanning Electron Microscopy* (ESEM) eines Apex von *S. habrochaites* gewonnen werden. Hierbei zeigte sich, dass sich auf den jungen Blättern in der Region des Apex zahlreiche glanduläre Trichome befinden, die noch nicht vollständig entwickelt sind (Abbildung 6). Auch wenn bei vielen Trichomvorläufern nicht genau festzustellen ist, welcher Typ von glandulären Trichomen sich später aus ihnen entwickeln wird, so lässt sich in einigen Fällen bereits mit hoher Sicherheit davon ausgehen, dass es sich um junge Typ VI Trichome handelt.

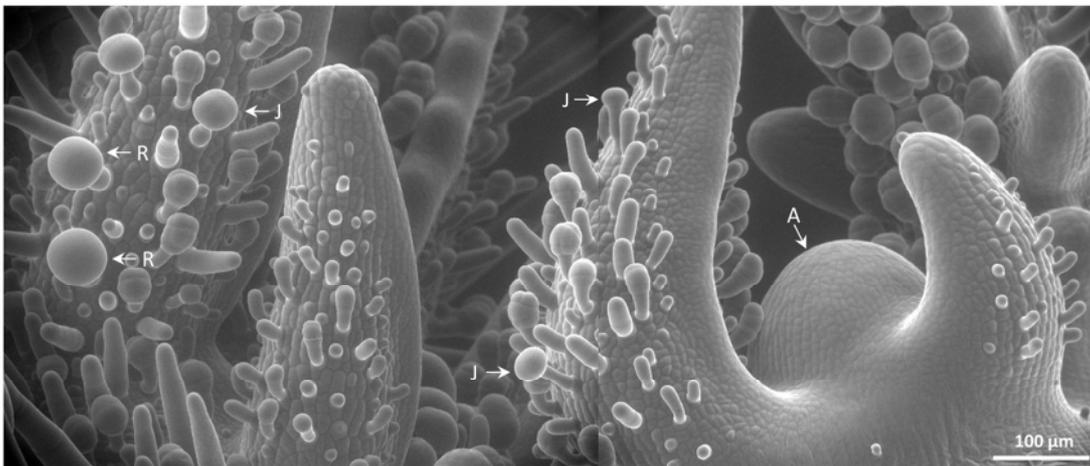


Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Apex von *S. habrochaites*: Montage aus zwei ESEM Aufnahmen eines intakten *S. habrochaites* LA1777 Apex (A) mit jungen Blättern, auf denen junge (J) und reife (R) Typ VI Trichome vorzufinden sind. Foto: Frank Syrowatka

Aufschlussreichere Bilder dieser Trichomvorläufer konnten mit Hilfe von mikroskopischen Untersuchungen an isolierten Trichomen gewonnen werden. Hierzu wurden zunächst Typ VI Trichomköpfchen mit einer Methode nach Schilmiller *et al.* 2010 geerntet (siehe 2.14.) und anschließend im Hellfeld sowie im Fluoreszenzlicht mikroskopiert (Abbildung 7).

Bei der Untersuchung der isolierten Trichome zeigte sich dabei für *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* ein ähnliches Bild. In beiden Fällen bestehen die Köpfchen des jüngsten Entwicklungsstadiums, welches beobachtet werden konnte, aus einer einzelnen Zelle (Abb. 7 A, G, M, S), die eine rote sowie eine gelb-grüne Autofluoreszenz aufweist (A, M). Die rote Autofluoreszenz kann dabei anhand der Form und des Fluoreszenzspektrums auf die Anwesenheit von Chlorophyll zurückgeführt werden. Dies zeigt, dass bereits in den

jungen Typ VI Trichomen Chloroplasten zu finden sind. Der Ursprung der gelb-grünen Fluoreszenz ist dagegen unklar, auch wenn das Fluoreszenzspektrum auf die Anwesenheit von Flavonoid-Konjugaten hindeutet (siehe Anhang Abbildung 2 A). In der darauffolgenden Entwicklungsphase finden mehrere Zellteilungen statt, sodass die Trichomköpfchen nun aus zwei Kopfzellen und einer Zwischenzelle, die die Verbindung zum Stiel herstellt, bestehen (Abb. 7 B, H, N, T). Im Anschluss findet eine weitere Zellteilung der Kopfzellen statt, sodass die Trichomköpfchen nun aus der Zwischenzelle und vier Kopfzellen bestehen (Abb. 7 C, I, O, U). In diesen ersten Entwicklungsphasen steigt die Zahl der Zellen aus denen das Trichomköpfchen aufgebaut ist von eins auf fünf an, die Größe des Trichomköpfchens erhöht sich in dieser Phase jedoch nur geringfügig von 20 μm auf etwa 30 μm . Nach dem Erreichen dieses Fünf-Zell-Stadiums wächst das Trichomköpfchen dann auf die finale Größe von etwa 60 μm (Abb. 7 D, J, P, V). Bis zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung bleibt die gelb-grünliche Autofluoreszenz der Trichome erhalten. In einem letzten Entwicklungsschritt verschwindet dann die gelb-grünliche Autofluoreszenz bei den Trichomen beider Tomatenlinien (Abb. 7 E, K, Q, W, Anhang Abbildung 2 B). Erst jetzt wird der sekretorische Hohlraum ausgebildet (Abb. 7 F, L, R, X) und mit Sekundärmetaboliten gefüllt (siehe 3.1.1. und Anhang Abbildung A1).

Des Weiteren fiel auf, dass alle reifen oder fast reifen Trichomköpfchen nach der Ernte, im Gegensatz zu den jungen Entwicklungsstadien, nicht mehr mit der Zwischenzelle verbunden waren. Dies lässt vermuten, dass am Ende der Trichomentwicklung eine Sollbruchstelle zwischen den sekretorischen Kopfzellen und der Zwischenzelle entsteht. Einen weiteren Hinweis hierfür findet man, wenn man die Form der Trichomköpfchen von isolierten und intakten Typ VI Trichomen von *S. habrochaites* vergleicht (Abbildung 8). So haben die Köpfchen intakter Trichome eine runde kugelähnliche Form (Abb. 8 A). Nach der Ernte der Köpfchen, bei der die Zwischenzelle mit der Stielzelle verbunden bleibt (Abb. 8 C), scheinen die Trichomköpfchen hingegen zu kollabieren (Abb. 8 B), wie an der flacheren Form der geernteten Köpfchen und der welligen Struktur der inneren Zellwände zu erkennen ist. Bei den geernteten Typ VI Trichomen ist zudem eine sehr starke bläuliche Autofluoreszenz im Bereich der Zwischenzelle erkennbar, die auf die Anwesenheit von phenolischen Zellwandbestandteilen wie etwa Lignin hindeutet, die bei Tomaten bereits im Bereich von Abszissionszonen beobachtet wurden (Iwai *et al.* 2003).

Ergebnisse

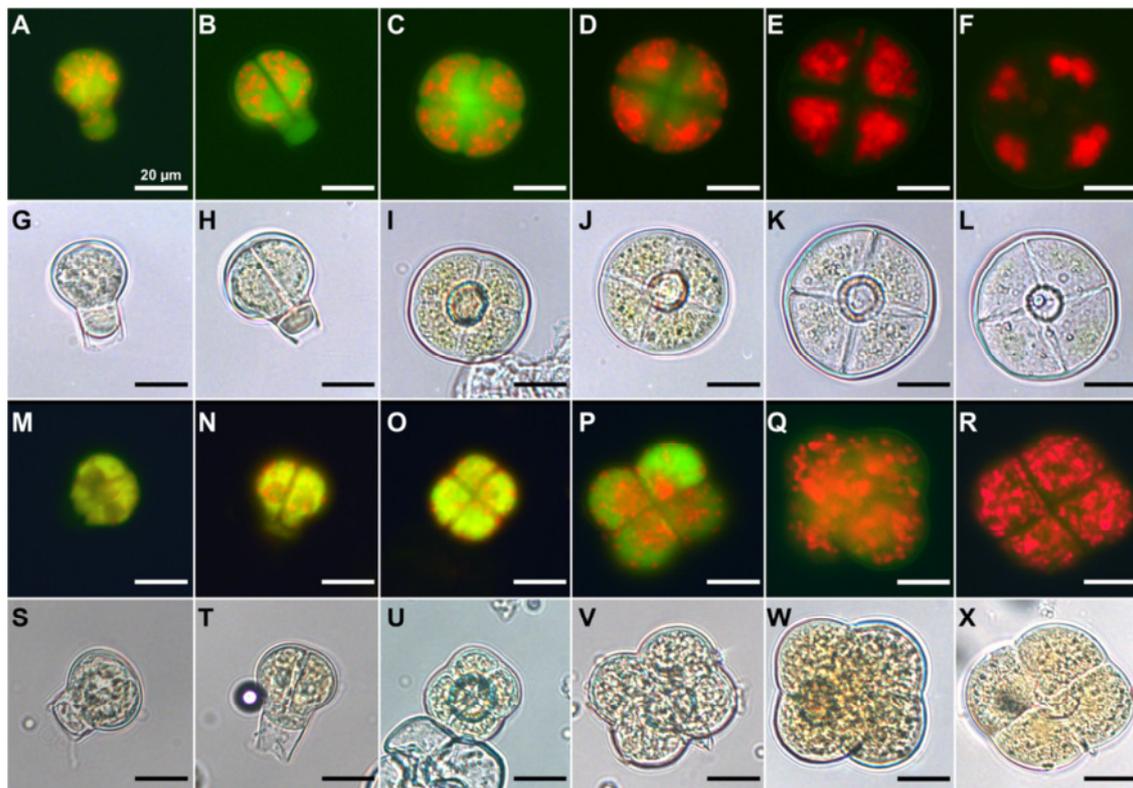


Abbildung 7: Übersicht der Entwicklungsstadien glandulärer Typ VI Trichome: Autofluoreszenz- (A-F, M-R) und Hellfeld- (G-L, S-X) mikroskopische Aufnahmen in der Entwicklung befindlicher Typ VI Trichome von *S. habrochaites* LA1777 (A-L) und *S. lycopersicum* LA4024 (M-X) von Trichomköpfchen, die mittels Glaskugelmethode geerntet wurden.

Die durchgeführten mikroskopischen Untersuchungen lassen vermuten, dass der grundlegende Prozess der Trichomentwicklung bei den Trichomen von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* ähnlich abläuft. Jedoch gibt es auch einige Unterschiede. So verändert sich die äußere Form der Typ VI Trichomköpfchen bei *S. lycopersicum* im Laufe der Entwicklung von rund zu kleeblattförmig, wohingegen die Trichomköpfchen von *S. habrochaites* stets eine runde Form beibehalten. Ein weiterer auffälliger Unterschied liegt darin, dass sich in den Trichomen von *S. habrochaites* im letzten Schritt die Zellen aus dem inneren Bereich des Köpfchens zurückziehen bzw. durch das Anschwellen des großen Hohlraumes im Inneren des Trichoms nach außen gedrängt werden. Besonders gut ist dieser Prozess anhand der Lokalisation der Chloroplasten nachvollziehbar (Abb. 7 E, F). Bei den Trichomen von *S. lycopersicum* findet dieser Prozess dagegen nicht bzw. nur in sehr eingeschränktem Maße statt (Abb. 7 Q, R).

Parallel zur Untersuchung der Entwicklungsstadien an isolierten Trichomen, wurde auch die Entwicklung der Typ VI Trichome an intakten Blättern untersucht. Die hierbei gewonnenen konfokalmikroskopischen Aufnahmen von jungen Trichomen auf der Blattoberfläche (siehe Anhang Abbildung A3) bestätigten die anhand von isolierten

Trichomen gewonnen Erkenntnisse und zeigen zudem auch das Wachstum der Stielzelle. Dabei ist erkennbar, dass die jüngsten beobachteten Trichome (mit einem einzelligen Köpfchen) einen sehr kurzen Stiel von 20-40 μm Länge besitzen. Während der Entwicklung des sekretorischen Köpfchens gewinnt der Stiel zunächst nur wenig an Länge, bis mit der Bildung des sekretorischen Hohlraumes der finale Schritt der Trichomentwicklung beginnt. In diesem letzten Entwicklungsschritt vervielfältigt sich die Länge der Stielzelle so, dass sich das Trichomköpfchen schließlich etwa 150 μm (*S. lycopersicum*) bzw. 300 μm (*S. habrochaites*) über der Blattoberfläche befindet.

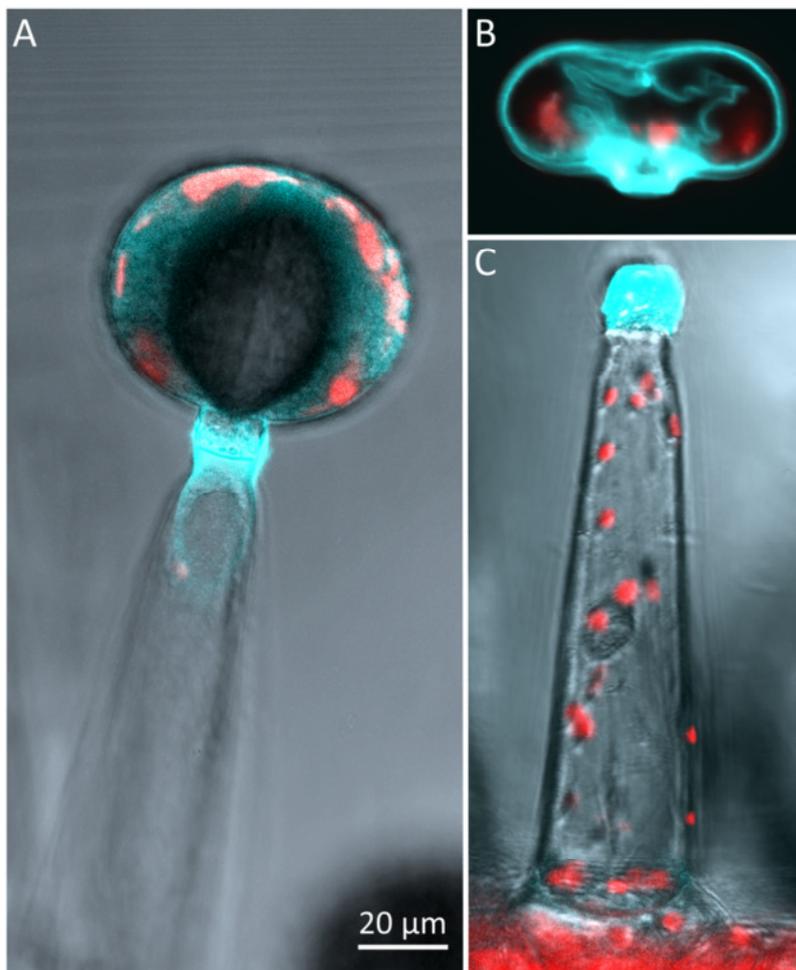


Abbildung 8: Typ VI Trichome von *S. habrochaites* LA1777 vor und nach der Ernte: konfokalmikroskopische Aufnahmen eines Typ VI Trichoms von *S. habrochaites* am Blatt (A) und nach der Ernte mittels der Glaskugelmethode (B), Stiel eines Typ Trichoms nach Abbrechen des Köpfchens (C), Ex.: 405 nm, Em.: 420-545 nm (cyan) bzw. 645-735 nm (rot).

3.1.3. Akkumulation gelb-grün fluoreszierender Substanzen in jungen Typ VI Trichomen

3.1.3.1. Untersuchung bereits bestehender Flavonoid-Mutantenlinien

Eine besondere Auffälligkeit in der Entwicklung der Typ VI Trichome von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* stellt die Akkumulation einer gelb-grün fluoreszierenden Substanz in den jungen Trichomen dar, die mit voranschreitender Reifung der Trichome wieder

Ergebnisse

verschwindet. Die Betrachtung der Anregungswellenlänge sowie des Fluoreszenzspektrums (siehe Anhang Abbildung A2) legt dabei nahe, dass es sich bei der fluoreszierenden Substanz um eine Verbindung aus der Gruppe der Flavonoid-Konjugate handeln könnte. Um dieser Vermutung weiter nachzugehen, wurde die Entwicklung der Typ VI Trichome an verschiedenen Flavonoid-Mutantenlinien untersucht. Bei den hierfür verwendeten Tomatenlinien ist zum einen eine Isoform der Chalconisomerase (Solyc05g010320) ausgeschaltet (LA1049). Zum anderen ist ein MYB-Transkriptionsfaktor (Solyc01g079620), der den Flavonoidstoffwechsel in den Früchten steuert, herunterreguliert (LA3189). Auch wenn die beiden Linien in den letzten Jahren bereits ausführlich charakterisiert wurden (siehe Kang *et al.* 2014 für LA1049 und Adato *et al.* 2009 für LA3189), so wurde die Entwicklung der glandulären Trichome bisher nicht betrachtet. Für diese Untersuchung wurden Trichome beider Linien isoliert und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Des Weiteren wurde auch der Rutingehalt der Trichome analysiert.

Für die untersuchten Linien zeigte sich dabei ein unterschiedliches Bild. So weist die untersuchte *myb*-Mutante LA3189 weder bei der Entwicklung der Typ VI Trichome (Abbildung 9 A-E) noch bei den Gehalten an Rutin in den Trichomen (siehe Anhang Abbildung A4) einen wesentlichen Unterschied zum Wildtyp auf. Der in der Mutantenlinie herunterregulierte MYB-Transkriptionsfaktor scheint somit keinen Einfluss auf die Entwicklung der Typ VI Trichome zu haben.

In der Chalconisomerase-Mutante LA1049 dagegen ist eine veränderte Entwicklung der Typ VI Trichome (Abb. 9 F-J) festzustellen, die mit einer starken Reduktion des Gehaltes an Rutin in den Trichomen einhergeht (siehe Anhang Abbildung A4). Die gelb-grüne Autofluoreszenz der jungen Typ VI Trichome bleibt dabei in der Mutante, anders als im Wildtyp, weitestgehend auf kleine rundliche Bereiche beschränkt. Weitere Untersuchungen im Hellfeld und mit Hilfe eines Konfokalmikroskops (siehe Anhang Abbildung A5) legten dabei nahe, dass die fluoreszierende Substanz in kleinen vesikelförmigen Strukturen akkumuliert. Die fluoreszierende Substanz besitzt dabei ein ähnliches Fluoreszenzspektrum wie die fluoreszierende Substanz im Wildtyp (Abbildung 10 C), bleibt jedoch im Gegensatz zu den Trichomen der Wildtypen in allen Entwicklungsstadien erhalten. Weiterhin scheinen sich die Typ VI Trichome der Mutante nicht korrekt zu entwickeln, da sie auch im reifen Zustand mit ca. 40 µm Durchmesser deutlich kleiner sind als bei *S. lycopersicum* LA4024 und zudem auch keinerlei sekretorischen Hohlraum ausbilden, was mit der stark verringerten Akkumulation von Terpenen (Kang *et al.* 2014) in Verbindung

stehen könnte. Diese Beobachtung zeigt, dass die Akkumulation dieser Substanz eine entscheidende Rolle bei der Reifung der Typ VI Trichome spielen könnte.

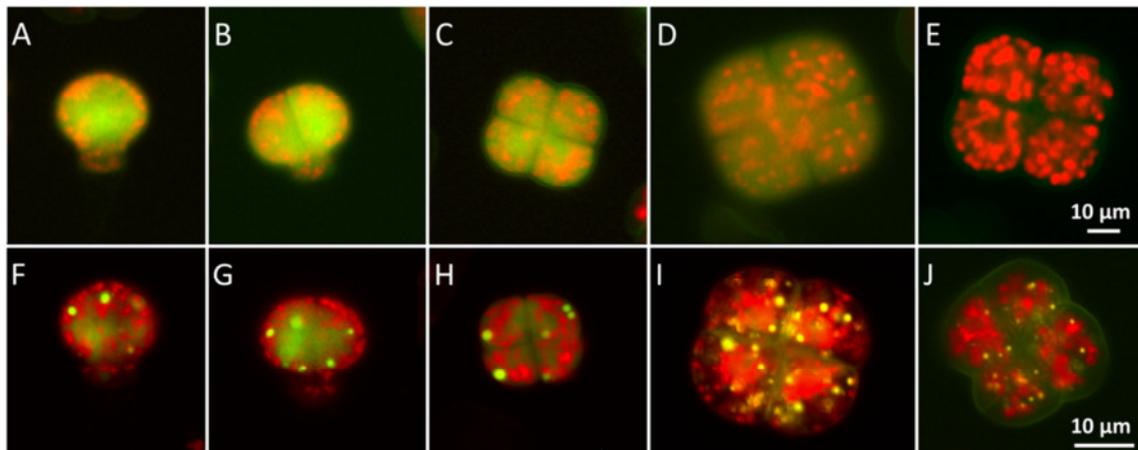


Abbildung 9: Akkumulation autofluoreszierender Substanzen in den Flavonoid-Mutantenlinien LA3189 und LA1049: Autofluoreszenzmikroskopie in der Entwicklung befindlicher Typ VI Trichome der Mutantenlinien LA3189 (A-E) und LA1049 (F-J).

3.1.3.2. Analyse der fluoreszierenden Substanzen

Die Identifikation der fluoreszierenden Substanzen aus den jungen Typ VI Trichomen von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* mittels LC-MS erforderte zunächst eine geeignete Methode für die Isolierung dieser Substanzen aus den Trichomköpfchen. Leider konnten jedoch unter keiner Extraktionsbedingung, die mit der massenspektrometrischen Analyse kompatibel ist (wässrige und organische Lösungsmittel mit saurem, neutralem und basischem pH), die fluoreszierenden Substanzen extrahiert werden, wie mikroskopische Aufnahmen der extrahierten Trichome zeigten (Daten nicht gezeigt). Lediglich unter Einsatz von 1 M Natronlauge konnte bei 80 °C nach einer Inkubationszeit von mehreren Stunden die fluoreszierende Substanz vollständig aus den Trichomen gelöst bzw. durch alkalische Hydrolyse freigesetzt werden (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Substanzen in den untersuchten Tomatenlinien nicht in freier Form vorkommen, sondern an feste Strukturen gebunden sind. Da die fluoreszierenden Substanzen aus den Trichomen von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* nicht mit LC-MS kompatiblen Lösungsmitteln extrahiert werden konnten und bei der aggressiven Behandlung mit Natronlauge vermutlich degradiert werden, wurde für die weitere Analyse der Substanzen auf die Chalconisomerase-Mutantenlinie LA1049 zurückgegriffen.

Wie bereits beschrieben wurde (siehe 3.1.3.1.), akkumuliert die fluoreszierende Substanz bei der Linie LA1049 in kleinen vesikelförmigen Strukturen. Aus diesen Strukturen konnte die fluoreszierende Substanz mit organischem Lösungsmittel (75% Methanol) extrahiert

Ergebnisse

werden. Die Extrakte wurden anschließend an einer UPLC-Anlage in Kombination mit einem Fluoreszenzdetektor und einem Massenspektrometer analysiert.

Bei dieser Analyse zeigte sich in der Fluoreszenzspur ein scharfer Peak bei einer Retentionszeit von 8,6 min (Abbildung 10 A). Das Fluoreszenzspektrum dieses Peaks (B) stimmte dabei weitestgehend mit dem bei der konfokalmikroskopischen Untersuchung erhaltenem Spektrum der fluoreszierenden Vesikel sowie den Spektren der jungen Trichome von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* überein (C), obwohl eine leichte Verschiebung des Fluoreszenzmaximums zu beobachten ist. Der Unterschied in den Fluoreszenzmaxima von wenigen Nanometern könnte jedoch zum einen auf die geringe Auflösung des Spektrums, das mit dem LSM erstellt wurde, zurückzuführen sein (siehe 2.3.). Zum anderen kann das jeweilige Milieu einen großen Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften haben (Zirak *et al.* 2009; Homocianu *et al.* 2011), weshalb das Spektrum der Substanz unter physiologischen Bedingungen ein Maximum bei einer höheren Wellenlänge als bei der UPLC-Analyse haben könnte.

Die parallel zur Fluoreszenzspur aufgenommenen massenspektrometrischen Daten zeigten die Elution eines Ions mit einer Masse von 375,1 Da im negativen (siehe Anhang Abbildung A6 A) bzw. 377,1 Da im positiven Modus zur gleichen Retentionszeit wie der Fluoreszenzpeak. Durch einen Abgleich der Masse, der Retentionszeit (siehe Anhang Abbildung A6 A, B) sowie der Fragmentierung der Substanz im negativen (siehe Anhang Abb. A6 C, D) und positiven Modus (Daten nicht gezeigt) mit einem authentischen Standard konnte die Substanz letztendlich als Riboflavin identifiziert werden.

Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich auch bei der fluoreszierenden Substanz in den jungen Typ VI Trichome von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* um ein Derivat des Riboflavins handelt. So könnte in den Typ VI Trichomen der beiden Tomatenlinien etwa Riboflavin in Form von FMN oder FAD an verschiedene Flavoproteine gebunden sein, wodurch sich die Lokalisation und die schlechte Extrahierbarkeit der Substanz bei den Wildtypen erklären ließen. Allein anhand der Analyse der fluoreszenzierenden Substanz der Trichome der Mutantenlinie LA1049 kann jedoch nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob es sich auch bei der fluoreszierenden Substanz in den Trichomen von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* um ein Derivat des Riboflavins handelt. Ein Vergleich der Fluoreszenzspektren der jungen Trichome von *S. habrochaites* mit Standards von Riboflavin, FMN und FAD im wässrigen Milieu zeigt jedoch eine Übereinstimmung der Spektren (Abb. 10 D), was auf die Anwesenheit von Riboflavinderivaten bzw. Flavoproteinen in den jungen Trichomen hindeutet.

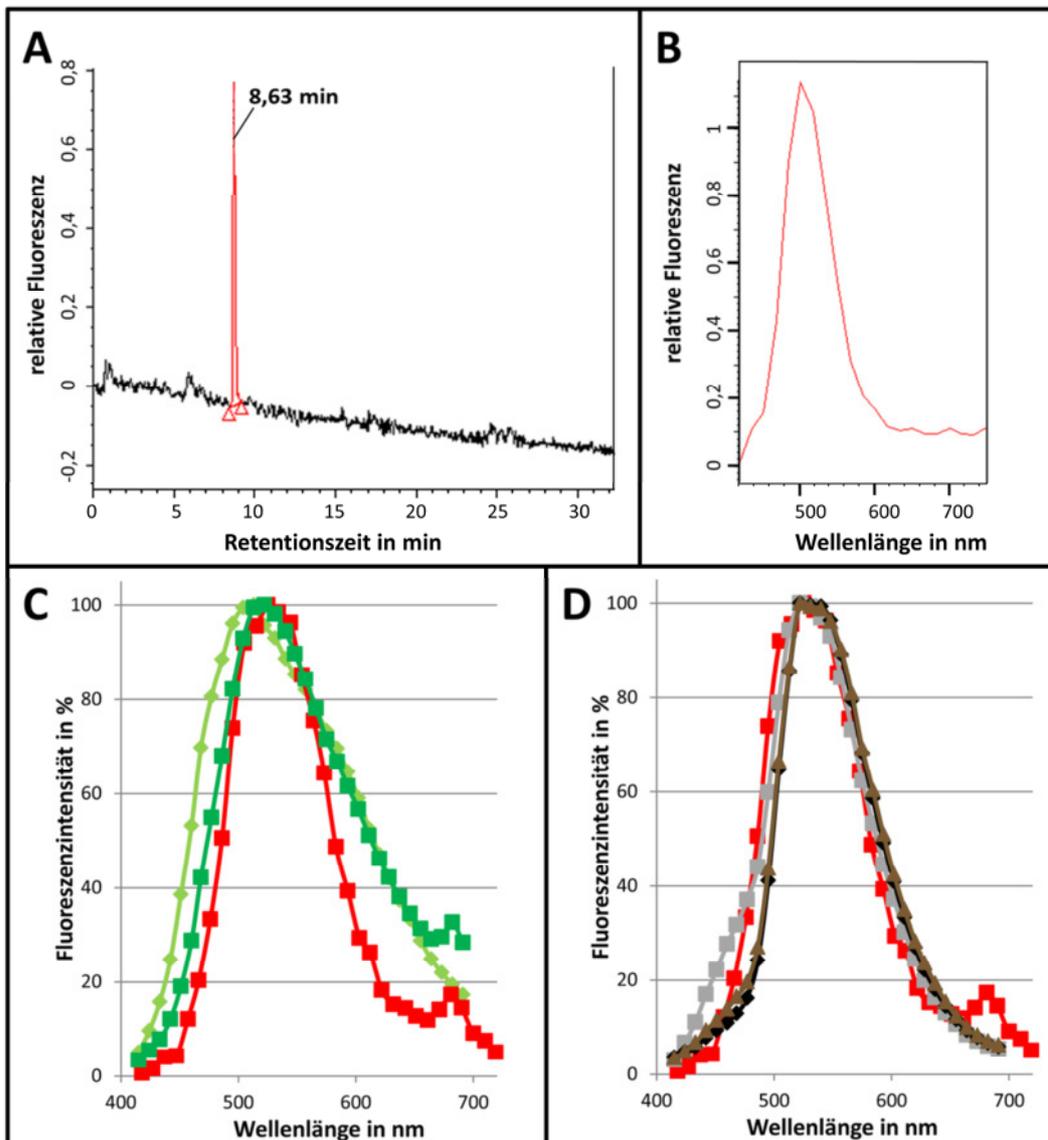


Abbildung 10: Analyse der fluoreszierenden Substanz von *S. lycopersicum* LA1049, LA4024 und *S. habrochaites* LA1777 Trichomen: Fluoreszenzchromatogramm (A) eines methanolischen Extraktes junger Trichome der Chalconisomerase-Mutante LA1049 bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm und einer Emissionswellenlänge von 510 nm sowie Fluoreszenzspektrum des markierten Peaks (B). Fluoreszenzspektrum der gelb-grün fluoreszierenden Substanz aus LA1049 (hellgrün), LA4024 (dunkelgrün) und LA1777 (rot) Trichomen (C) sowie Überlagerung der Fluoreszenzspektren einer wässrigen Lösung von Riboflavin (grau), FAD (schwarz), FMN (braun) sowie eines jungen LA1777 Trichoms (rot; D). Die Aufnahme der Spektren in C und D erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm an einem LSM 780.

3.1.4. Ultrastruktur junger und reifer Typ VI Trichome

3.1.4.1. Frühe Entwicklungsstadien

Nach der ersten Untersuchung der Trichomentwicklung mittels Fluoreszenz- und Hellfeldmikroskopie sollte durch die Analyse von Ultradünnschnitten mittels

Ergebnisse

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ein tieferer Einblick in die Entwicklung der Typ VI Trichome auf subzellulärer Ebene erhalten werden. Die Untersuchung der Schnitte der eingebetteten jungen Blätter zeigte dabei sehr junge Trichome, bei denen noch keine Differenzierung in Stiel und Köpfchen vorlag. Die frühesten Entwicklungsstadien, die dabei beobachtet werden konnten, werden durch einzelne Trichomvorläuferzellen (VT) repräsentiert, die aus dem Zellverbund der Epidermis herausragen (siehe Anhang Abbildung A7 A). In diesem Stadium ist noch nicht erkennbar, welcher Typ von Trichom sich später daraus entwickeln wird. Bei der Entwicklung der Typ VI Trichome durchlaufen diese Trichomvorläuferzellen anschließend eine asymmetrische Zellteilung, so dass eine Stielzelle (S) und eine Vorläuferzelle des glandulären Köpfchens (VG) gebildet werden (siehe Anhang Abb. A7 B). Die Vorläuferzelle des glandulären Köpfchens beschreitet im Anschluss weitere Zellteilungen, so dass vierzellige Trichome, bestehend aus einer Stielzelle, einer Zwischenzelle (Z) und zwei glandulären Zellen (G), entstehen (siehe Anhang Abb. A7 C). Dieses Entwicklungsstadium konnte bereits in der Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden und wird, wie bereits beschrieben, von weiteren Zellteilungen der glandulären Zellen gefolgt. Dieser grundlegende Entwicklungsprozess konnte bei den Trichomen beider Linien beobachtet werden (Daten für *S. lycopersicum* nicht gezeigt), woraus auf einen ähnlichen Prozess der frühen Trichomentwicklung in den beiden Tomatenlinien geschlussfolgert werden kann.

3.1.4.2. Subzelluläre Struktur von jungen und reifen Trichomen

Der subzelluläre Aufbau der jungen Trichome ist bei beiden Linien ähnlich, wobei sich der Aufbau der Zellen stark zwischen der Stielzelle und der Zwischenzelle bzw. den Kopfzellen unterscheidet (Abbildung 11 A, C). Die Stielzelle wird dabei zum größten Teil durch eine Vakuole ausgefüllt, der Zellkern befindet sich an der Seite und nur in einem kleinen Bereich entlang der Zellwand ist Zellplasma mit einigen Organellen zu erkennen. In der Zwischenzelle und den Kopfzellen dagegen liegen die Zellkerne zentral und weisen eine intakte runde Struktur mit einem zentralem Nucleolus auf (Abb. 11 E, I). Über die gesamte Zelle verteilt ist Zellplasma zu erkennen, in dem eine Vielzahl von Organellen darunter Chloroplasten, Mitochondrien, glattes und rauhes endoplasmatisches Retikulum, und der Golgi-Apparat zu sehen sind (Abb. 11 G, K; Detailaufnahme siehe Anhang Abbildung A8 A, E). Des Weiteren ist, anstatt einer großen Vakuole, eine Vielzahl kleinerer Vakuolen sichtbar, die gleichmäßig über die ganze Zelle verteilt sind.

Die reifen Trichome der beiden Tomatenlinien weisen dagegen einen stark veränderten Aufbau im Vergleich zu den jungen Trichomen auf (Abb. 11 B, D) und unterscheiden sich

anhand einiger Merkmale deutlich von einander. So sind in beiden Fällen die Zwischenzelle und die Kopfzellen zum überwiegenden Teil mit kleinen Vakuolen gefüllt, wobei die Vakuolen im Falle der Trichome von *S. lycopersicum* größer zu sein scheinen. Dieser Eindruck wird jedoch auch dadurch begünstigt, dass sich, wie bereits unter 3.1.2. beschrieben wurde, die Zellen der Trichome von *S. habrochaites* im Verlaufe der Entwicklung stärker zusammenziehen, wodurch die Entstehung des vergrößerten sekretorischen Hohlraumes ermöglicht wird. Wie bereits beschrieben, nimmt der sekretorische Hohlraum bei den Typ VI Trichomen von *S. habrochaites* LA1777 dabei einen weit größeren Anteil als bei *S. lycopersicum* LA4024 ein. Bei beiden Tomatenlinien sind in diesem Hohlraum keine Strukturen erkennbar. Ob die dort gelagerten Metabolite während der Einbettung verloren gehen oder sehr elektronendurchlässig sind, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Jedoch kann die Anwesenheit von Polymeren ausgeschlossen werden. In den Randbereichen des Hohlraumes lassen sich Reste der inneren Zellwände erkennen (Anhang Abb. A8 C). Besonders deutlich ist dies in den Bereichen zu sehen, an denen sich die Kopfzellen berühren. Hier ist deutlich sichtbar, wie die innere Zellwand eine wellenförmige Struktur bildet, die sich an den Enden aufzulösen scheint (Anhang Abb. A8 D). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass der sekretorische Hohlraum durch die Auflösung der inneren Zellwände gebildet wird.

Des Weiteren fällt auf, dass die Zellkerne der reifen Trichome eine andere Struktur als die der jungen Trichome aufweisen (Abb. 11 F, J). So ist in den Zellkernen der reifen Trichome kein Nucleolus mehr zu sehen. Dafür sind jedoch viele kleinere kondensierte Chromatinbereiche erkennbar. Dies deutet auf eine umfangreiche Remodellierung der DNA während der Trichomentwicklung hin. Des Weiteren weisen die wenigen Zellplasma-Bereiche in den reifen Trichomen eine weniger geordnete Struktur auf, in denen zudem nahezu keine Organellen mehr zu sehen sind (Abb. 11 H, L; Detailaufnahme siehe Anhang Abb. A8 B, F). Die wenigen Chloroplasten, die in den reifen Trichomen noch zu finden sind, weisen zudem eine stark veränderte Struktur auf. So sind zwar zum Teil noch Stärkeinschlüsse zu erkennen, Thylakoidmembranen oder Vesikel sind jedoch nicht mehr vorhanden. In den Plastiden der Trichome von *S. lycopersicum* ist zudem die Einlagerung von Proteinaggregaten erkennbar (Abb. 11 L; Detailaufnahme Abb. A8 F), die sowohl in den Plastiden der Typ VI Trichome als auch in den Plastiden der Epidermiszellen von *S. lycopersicum* vorzufinden sind (Thipyapong *et al.* 2004). Insgesamt wirken die Zellen der reifen Trichome stark degeneriert, ob dies wirklich der Fall ist, oder ob es sich um eine spezielle Anpassung der Zellen an die Produktion der

Ergebnisse

großen Mengen an Sekundärmetaboliten handelt, ist jedoch allein anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht feststellbar.

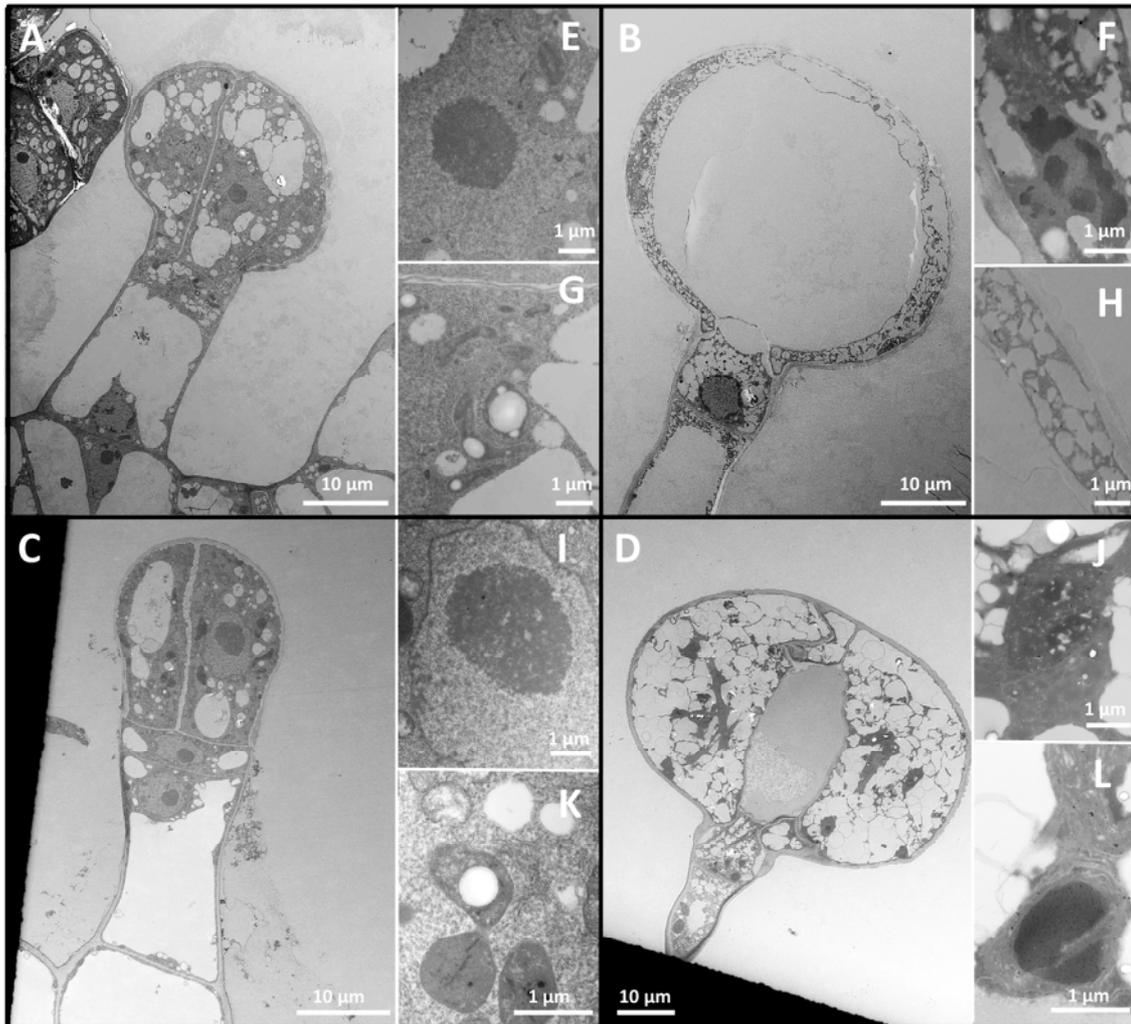


Abbildung 11: Subzelluläre Struktur junger und reifer Typ VI Trichome: TEM Aufnahmen eines jungen (A, C) und eines reifen (B, D) Typ VI Trichoms von *S. habrochaites* LA1777 (A, B) und *S. lycopersicum* LA4024 (C, D). Detailaufnahme der Zellkerne (E, F, I, J) und der Zellorganellen (G, H, K, L) von den dargestellten Trichomen bzw. von Trichomen des gleichen Entwicklungsstadiums.

3.1.4.3. Die Zwischenzelle: Die Entstehung einer Sollbruchstelle

Eine weitere Besonderheit fällt bei der Betrachtung der Zwischenzelle von jungen und reifen Trichomen auf. So ist bereits in den jungen Trichomen beider Linien ein großer Unterschied hinsichtlich der Stärke der äußeren Zellwände von Zwischenzelle und Kopfzelle festzustellen. Die Zellwände der Kopfzellen sind dabei bei den Trichomen beider Tomatenlinien mit etwa $0,7\ \mu\text{m}$ deutlich dicker als die Zellwände der Zwischenzelle mit $0,1\text{-}0,2\ \mu\text{m}$ (Abbildung 12 A, E). Dieser Unterschied hinsichtlich der Zellwanddicken von Stiel- und Kopfzelle bleibt auch in den reifen Trichomen bestehen (Abb. 12 C, G). Interessanterweise bleibt die Dicke der Zellwand der Kopfzellen im Verlaufe der

Trichomentwicklung konstant. So hat die äußere Zellwand sowohl in den jungen als auch in den reifen Trichomen eine Dicke von 0,6 bis 0,8 μm und zeigte bei den elektronenmikroskopischen Analysen eine elektronendichte Schicht auf der äußeren Seite (Abb. 12 D, H), die auf eine wachsartigen Auflagerung auf den Trichomköpfchen schließen lässt. Dies lässt vermuten, dass beim Wachstum der Trichome zur finalen Größe ein ständiger Einbau von Zellwandmaterial für den Erhalt der Zellwanddicke und Struktur erfolgt.

Weiterhin ist bei den reifen Trichomen eine klare Grenze zwischen den Zellwänden von Kopf- und Zwischenzelle zu erkennen die eine Sollbruchstelle für das Abbrechen des Köpfchens darstellt (Abb. 12 B, C, F, G). Am äußeren Ende dieses Bereiches ist eine Auflagerung von Zellwandmaterial zu erkennen, die der Struktur von Abszissionszonen ähnelt (Stenvik *et al.* 2006). Auch wenn sich die Menge und die Elektronendichte der aufgelagerten Substanz zwischen den beiden untersuchten Tomatenlinien unterscheidet, deutet die Lokalisation an der Sollbruchstelle in beiden Fällen auf eine Funktion in der Stabilisierung der Verbindung von Zwischenzelle und Trichomköpfchen hin.

Des Weiteren sind bei beiden Tomatenlinien in der Zellwand des Kontaktbereichs von Stielzelle und Zwischenzelle in den jungen sowie in den reifen Trichomen zahlreiche Plasmodesmata zu erkennen (Abb. 12 A, B, F; Detailaufnahme siehe Anhang Abb. A8 G). In den Zellwänden des Übergangs von Zwischenzelle und Kopfzelle sind in den jungen Trichomen auch viele Plasmodesmata zu erkennen (Abb. 12 E). Bei den reifen Trichomen sind jedoch die Kontaktflächen so klein, dass nur sehr vereinzelt noch Plasmodesmata zu sehen sind (Anhang Abb. A8 H). Besonders klein ist diese Kontaktfläche dabei bei *S. habrochaites*, da hier am oberen Ende der Zwischenzelle, der im Kontakt mit dem sekretorischen Hohlraum und den Kopfzellen steht, eine nicht genau definierbare Einlagerung von Material zu erkennen ist (Abb. 12 B). Der beteiligte Bereich erscheint dabei sehr elektronendurchlässig, was oft bei einer Einlagerung von Callose beobachtet werden kann (Santi *et al.* 2013). Immunogoldmarkierungsexperimente konnten jedoch keinen Nachweis für die Akkumulation von Callose erbringen (Daten nicht gezeigt), wodurch weiter unklar bleibt, welche Art von Substanz in diesem Bereich eingelagert wird. Weiterhin kann auch nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob die Substanz intra- oder extrazellulär eingelagert wird, obwohl die Abwesenheit von Zellplasma an der Zellwand des betreffenden Bereiches auf eine extrazelluläre Lokalisation hinweist. Bei *S. lycopersicum* lässt sich dagegen an der gleichen Stelle keine Einlagerung von Material erkennen.

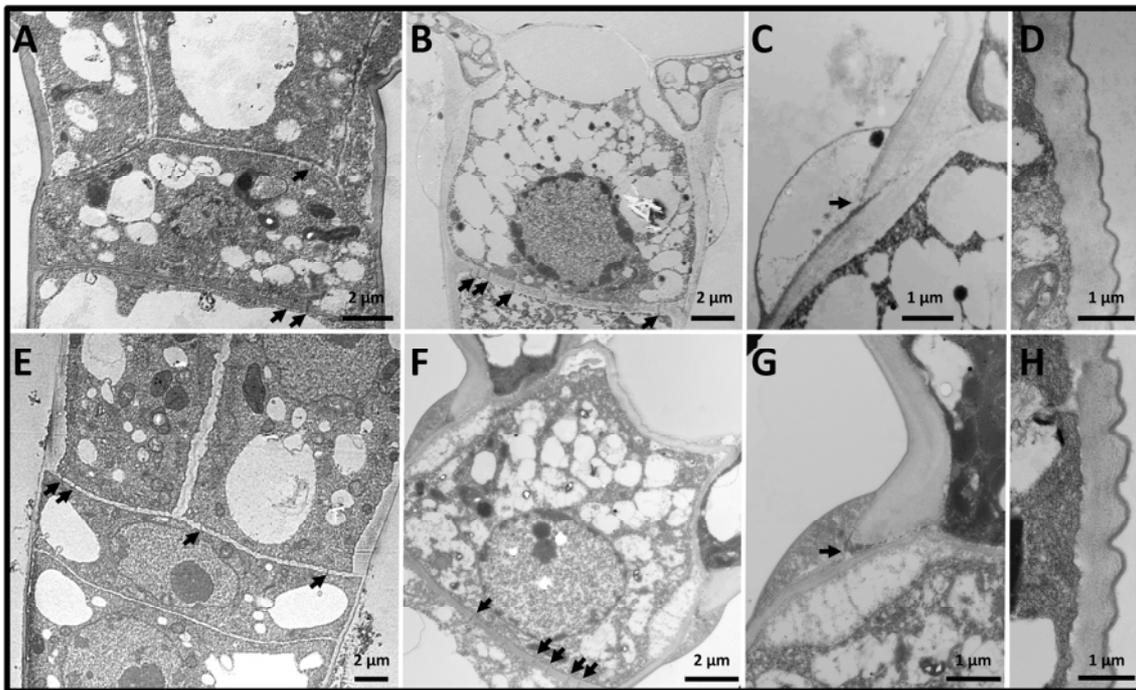


Abbildung 12: Detailaufnahmen der Struktur junger und reifer Typ VI Trichome: TEM Aufnahmen der Zwischenzelle von jungen (A, E) und reifen (B, F) Typ VI Trichomen von *S. habrochaites* LA1777 (A-D) und *S. lycopersicum* LA4024 (E-H) mit Plasmodesmata (Pfeil), Detailvergrößerung des Überganges von Zwischenzelle und glandulärem Köpfchen (C, G) mit Sollbruchstelle (Pfeil) sowie der äußeren Zellwand der sekretorischen Zellen (D, H).

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Differenzierung der Stielzelle und der glandulären Zellen bei *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* ähnlich ablaufen. Die geringere Auflagerung von Material am äußeren Ende der Kontaktzone von Zwischenzelle und Kopfzelle sowie die fehlende Einlagerung von Zellwandmaterial am oberen Ende der Zwischenzelle weist bei *S. lycopersicum* jedoch auf eine veränderte Beschaffenheit der Sollbruchstelle hin.

3.2. Zellwandanalysen

Neben der Charakterisierung der Trichomentwicklung durch unterschiedliche Mikroskopieverfahren wurde auch eine genauere Analyse der Zellwandstrukturen der Typ VI Trichome durchgeführt. Hierbei sollte neben detaillierteren Kenntnissen über den Aufbau der Zellwände der Typ VI Trichome von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* vor allem ein besseres Verständnis über die Entwicklung des sekretorischen Hohlraumes gewonnen werden. Die so erhaltenen Einblicke sollten dabei vor allem Anhaltspunkte liefern, wie sich der sekretorische Hohlraum der Trichome von *S. habrochaites* entwickelt und zur Beantwortung der Frage beitragen, weshalb sich die Typ VI Trichome von

S. habrochaites und *S. lycopersicum* sowohl in ihrer Form als auch in der Größe des sekretorischen Hohlraumes essentiell voneinander unterscheiden.

3.2.1. Histologische Färbung verschiedener Zellwandpolymere

Bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Typ VI Trichome konnte eine starke Fluoreszenz der Zellwände im Bereich der Sollbruchstelle (siehe 3.1.2.) beobachtet werden. Die Lokalisation und die Emissionswellenlänge der Fluoreszenz legten dabei nahe, dass es sich dabei um eine Einlagerung von polyphenolischen Verbindungen, wie Lignin, handeln könnte. Um weitere Hinweise über die Einlagerung von speziellen Zellwandpolymeren in den Typ VI Trichomen zu erhalten, wurden Anfärbungen verschiedener Zellwandpolymere an Schnitten von eingebetteten Trichomen von *S. habrochaites* durchgeführt.

Bei der durchgeführten Anfärbung des Lignins mit Phloroglucinol war jedoch keine entsprechende Rosa- bzw. Rotfärbung in den Zellwänden der Typ VI Trichome zu beobachten (siehe Anhang Abbildung A9 A). Lignin scheint demnach kein Bestandteil der Zellwänden der Typ VI Trichome zu sein.

Bei der Anfärbung von Suberin mit Fluorol yellow 088 (siehe Anhang Abb. A9 C) konnte dagegen eine Färbung im Bereich der Zwischenzelle der Typ VI Trichome beobachtet werden. In der äußeren Zellwand der Typ VI Trichome konnte andererseits, im Gegensatz zu der äußeren Zellwand der Typ VII Trichome, keine Anfärbung beobachtet werden. Die spezifische Anfärbung der Zwischenzelle der Typ VI Trichome deutet damit auf eine Einlagerung von Suberin in diesem Bereich hin und stellt, gemeinsam mit der starken Autofluoreszenz in diesem Bereich (siehe 3.1.2. und Abbildung 8), einen Hinweis auf eine spezialisierte Struktur der Zellwände der Zwischenzelle dar.

3.2.2. Immunmarkierungen

Wie bereits unter 3.1.1. beschrieben wurde, ist die erhöhte Resistenz von *S. habrochaites* gegenüber verschiedener Pflanzenschädlinge maßgeblich von der Entwicklung eines vergrößerten sekretorischen Hohlraumes abhängig. Aus diesem Grund sollte ein erster Einblick in die Entstehung und Remodellierung der Zellwände der Typ VI Trichome von *S. habrochaites* im Laufe der Entwicklung mit Hilfe von Immunmarkierungsexperimenten gewonnen werden. Hierbei wurde die Bindung verschiedener kommerziell erhältlicher Antikörper an unterschiedliche Epitope der Zellwand mittels Fluoreszenzmikroskopie

Ergebnisse

analysiert. Die Dünnschnitte von intakten jungen und reifen Trichomen für diese Analysen wurden dabei aus eingebetteten jungen Blättern erstellt.

Bei den durchgeführten Analysen zeigten sich starke Veränderungen der Zellwandstruktur im Laufe der Entwicklung der Typ VI Trichome. So kann für den Antikörper JIM7, der nur an methyliertes Homogalakturonan bindet, in allen Entwicklungsstadien eine Bindung an die äußeren Zellwände der Trichome beobachtet werden (Abbildung 13 A-C). An die inneren Zellwände bindet JIM 7 dagegen nur bei den jungen Trichomen (Abb. 13 A), bei denen die Bildung des sekretorischen Hohlraumes noch nicht begonnen hat. Der Antikörper LM 19, der auch an demethyliertes Homogalakturonan bindet, bindet dagegen an die inneren und äußeren Zellwände von Trichomen aller Entwicklungsstadien (Abb. 13 D-F). Die fehlende Bindung von JIM 7 an die inneren Zellwände der reifenden Trichome bei gleichzeitiger Bindung von LM19 weist dabei auf eine Demethylierung der Homogalakturonane in diesem Bereich hin. Der Methylierungsstatus der Pektine der inneren Zellwände könnte somit einen bedeutenden Einfluss auf die Bildung des sekretorischen Hohlraumes haben.

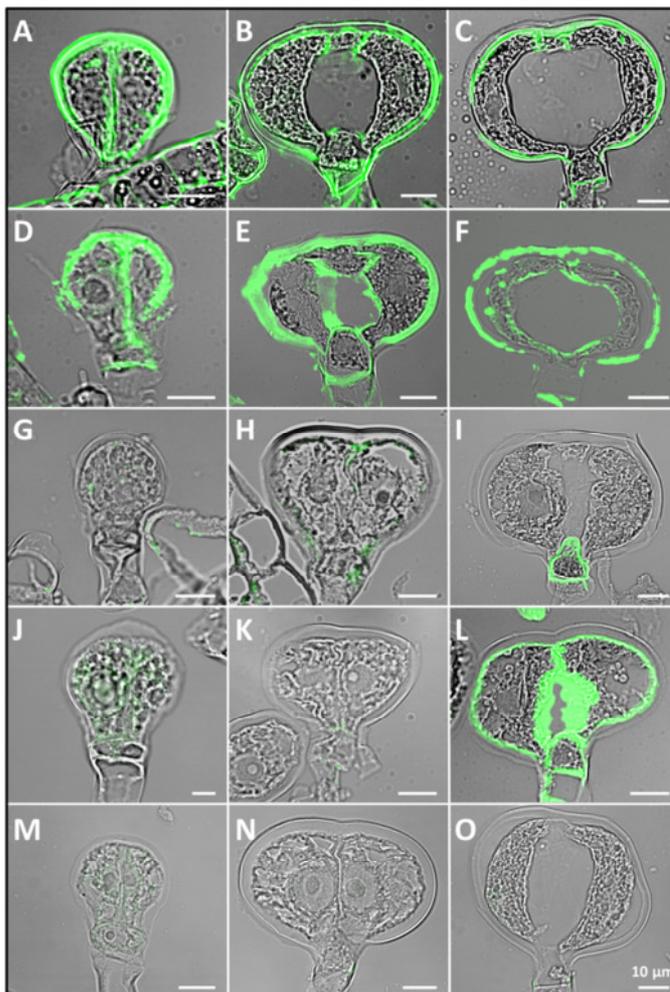


Abbildung 13: Immunmarkierung verschiedener Pektin-Epitope an den Typ VI Trichomen von *S. habrochaites*: Immunmarkierung verschiedener Pektin-Epitope an frühen (A, D, G, J, M), mittleren (B, E, H, K, N) und späten (C, F, I, L, O) Entwicklungsstadien der Typ VI Trichome von *S. habrochaites* LA1777. Markierung von methyliertem und demethyliertem Homogalakturonan mit den primären Antikörpern JIM7 (A-C) und LM19 (D-F). Markierung von linearem Arabinan mit dem primären Antikörper LM13 (G-I) und Arabinogalaktanproteinen mit LM6 (J-L). Die Visualisierung der primären Antikörper erfolgte durch einen FITC gekoppelten sekundären Antikörper bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm und einer Emissionswellenlänge von 505-570 nm. Als Kontrolle wurden Schnitte verwendet, die nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert wurden (M-O).

Des Weiteren wurde das Bindungsmuster der Antikörper LM13, der an Arabinan bindet, und LM6, der an Arabinan und Arabinogalaktanproteine bindet, untersucht. Hierbei zeigte sich, dass beide Antikörper nur an bestimmte Zellwandbereiche der reifen Typ VI Trichome binden. So bindet LM13 nur an die Zellwände der Zwischenzelle der reifen Trichome (Abb. 13 I), während LM6 besonders stark an die inneren Zellwände, aber auch an die äußeren Zellwände und die Zellwand der Zwischenzelle bindet (Abb. 13 L). Hieraus lässt sich vermuten, dass auch die Bildung von Arabinanen bzw. Arabinogalaktanproteinen einen Einfluss auf die Reifung der Typ VI Trichome hat.

3.2.3. Analyse der Pektinstruktur mittel LC-MS

Die Typ VI Trichome von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* unterschieden sich maßgeblich im Hinblick auf ihre Form und Struktur voneinander (siehe 3.1.1.). Da die Form einer pflanzlichen Zelle grundlegend durch den Aufbau und die Struktur ihrer Zellwände bestimmt wird, sollten durch massenspektrometrische Untersuchungen der Zellwände weitere Hinweise über die Ursache für die unterschiedliche Form der Typ VI Trichome der untersuchten Tomatenlinien gewonnen werden. Aufgrund der durch die Immunmarkierungen (siehe 3.2.2.) gewonnenen Hinweise über die Beteiligung bestimmter Pektinstrukturen bei der Entwicklung der Typ VI Trichome von *S. habrochaites*, konzentrierten sich die massenspektrometrischen Analysen dabei auf die Zusammensetzung des Pektins. Hierfür wurde zunächst Zellwandmaterial von Typ VI Trichomen isoliert und mittels Pektinase und Pektolyase verdaut. Die erhaltenen Pektinoligomere wurden anschließend mittels Ionenpaar-LC-MS nach Balcke *et al.* (2011) analysiert.

Die Betrachtung der Gehalte verschiedener unmodifizierter Oligomere des Homogalakturonans (Abbildung 14 A) zeigte dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Trichomen der beiden Tomatenlinien. Bei der Betrachtung verschiedener modifizierter Oligomere des Homogalakturonans (Abb. 14 A) zeigten sich dagegen für mehrere Oligomere signifikante Unterschiede. So können in den Trichomen von *S. habrochaites* für vier Oligomere mit einer einfachen Methylierung im Vergleich zu *S. lycopersicum* signifikant erhöhte Gehalte beobachtet werden. Besonders deutlich ist dieser Trend dabei bei zwei Oligomeren, die zusätzlich zur Methylierung eine Acetylierung aufweisen.

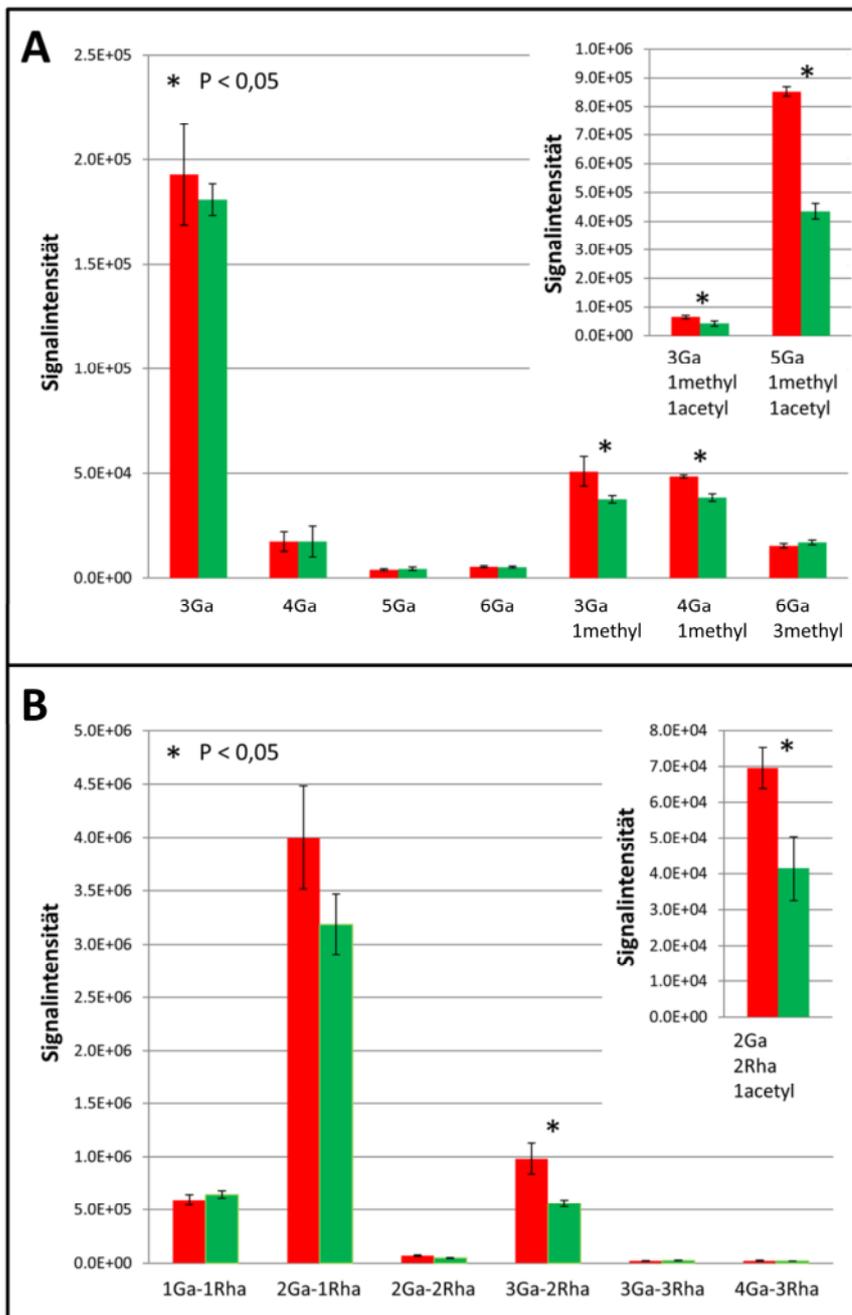


Abbildung 14: Massenspektrometrische Analyse der Pektinstruktur der Typ VI Trichome: Gehalte verschiedener unmodifizierter und methylierter bzw. acetylierter Oligomere des Homogalacturonans (A) und Rhamnogalacturonans I (B) aus dem Verdau von 5 mg isoliertem Zellwandmaterial von Typ VI Trichomen von *S. habrochaites* LA1777 (rot) und *S. lycopersicum* LA4024 (grün); Ga = Galakturonsäure, Rha = Rhamnose, methyl = Methylgruppe, acetyl = Acetylgruppe, n=3.

Auch bei der Betrachtung unmodifizierter Oligomere des Rhamnogalacturonans I kann der gleiche Trend beobachtet werden (Abb. 14 B), wobei jedoch nur in einem Fall signifikante Unterschiede zwischen den beiden Tomatenlinien vorliegen. Zusätzlich können auch hier deutlich erhöhte Gehalte für ein acetyliertes Oligomer des Rhamnogalacturonans I in den Typ VI Trichomen von *S. habrochaites* beobachtet werden.

Die durch massenspektrometrische Analysen erhaltenen Daten zeigen damit, dass sich die Pektinstruktur der Trichome der beiden Tomatenlinien insbesondere im Hinblick auf den Umfang der Acetylierung voneinander unterscheidet. Welche Funktion der erhöhte Acetylierungsgrad für die Trichome von *S. habrochaites* hat, bleibt jedoch bis auf weiteres unklar.

3.3. Genexpressions- und Sekundärmetabolitanalyse junger und reifer Typ VI

Trichome

Nachdem durch verschiedenste mikroskopische Verfahren ein erster Einblick in die Entwicklung der Typ VI Trichome gewonnen werden konnte, sollten weitere Analysen der Genexpression und der Metabolitgehalte von reifen und in der Entwicklung befindlichen Trichomen ein detaillierteres Bild über die Entwicklungsprozesse der Typ VI Trichome vermitteln. Voraussetzung für diese Analysen war zunächst die Isolierung einer möglichst reinen Fraktion von Typ VI Trichomen und die Trennung der Trichome in unterschiedliche Entwicklungsstadien. Für die Ernte glandulärer Trichome wurden dabei zwar bereits verschiedene Methoden beschrieben (Gershenzon *et al.* 1992; Schilmiller *et al.* 2010; McDowell *et al.* 2011; Balcke *et al.* 2014). Jedoch ist bei allen beschriebenen Methoden entweder die Reinheit, die Qualität oder die Menge der erhaltenen Trichomfraktion unzureichend. Des Weiteren wurde bisher auch noch kein Verfahren für die Trennung von jungen und reifen Trichomen entwickelt. Aus diesem Grund musste vor der Analyse der Genexpression und der Metabolitgehalte zunächst ein geeignetes Verfahren für die Ernte und die Sortierung der Typ VI Trichome etabliert werden.

3.3.1. Ernte und Sortierung von Typ VI Trichomen verschiedener Entwicklungsstadien

3.3.1.1. Trichomernte

Eine gute Variante für die Isolation einer reinen Fraktion von Typ VI Trichomen stellte die zuerst von Gershenzon *et al.* 1992 beschriebene Glaskugelmethode dar. Bei dieser Methode werden zunächst Blätter oder Stiele der jeweiligen Pflanze in Gefäße mit einem isoosmotischen Puffer geerntet. Nach der anschließenden Zugabe von Glaskugeln werden die Gefäße geschüttelt. Dabei schlagen die Glaskugeln gegen die Trichome, die sich auf der Oberfläche der Blätter bzw. Stiele befinden, so dass diese abbrechen. Da die Typ VI Trichome der untersuchten Tomatenlinien, wie bereits unter 3.1.4.3. beschrieben wurde, eine Sollbruchstelle besitzen, konnte mit dieser Erntemethode eine Trichomfraktion erhalten werden, die nahezu ausschließlich aus Typ VI Trichomköpfchen bestand (Abbildung 15). Bei der Trichomernte von jungen Blättern oder Apexen konnten mit dieser Methode auch junge Typ VI Trichome geerntet werden (Abb. 15). Da die Sollbruchstelle bei den jungen Typ VI Trichomen jedoch noch nicht ausgebildet ist und selbst auf jungen Blättern nur eine geringe Anzahl von jungen Typ VI Trichomen vorkommt (siehe

Ergebnisse

Abbildung 6), war der Anteil an jungen Trichomen in der so erhaltenen Trichomfraktion jedoch sehr gering (Abb. 15). Aus diesem Grund war vor der vergleichenden Analyse der Genexpression oder der Sekundärmetabolitgehalte von jungen und reifen Trichomen zunächst eine starke Anreicherung der jungen Trichome notwendig. Während dieses zeitintensiven Prozesses der Ernte und Sortierung der Trichome musste der Schutz der in den Trichomen enthaltenen RNA vor der Degradation durch RNAsen gewährleistet werden. Dies konnte durch den Austausch des isoosmotischen Puffers gegen 70%igen Ethanol bewerkstelligt werden (Clément-Ziza *et al.* 2008). Die Verwendung von Ethanol führte dabei jedoch auch zu einer leicht verminderten Reinheit der erhaltenen Trichomfraktion, da bei der Ernte in Ethanol ein verstärktes Abbrechen der Typ VII Trichome zu beobachten war. Für die Analyse von Sekundärmetaboliten hingegen konnte die Ernte nicht in Ethanol durchgeführt werden, da dies zu einer frühzeitigen Extraktion der Metabolite führen würde. Für diese Analyse stellte die Verwendung des durch Schillmiller *et al.* (2010) beschriebenen Sorbitolpuffers somit eine bessere Alternative dar (Schema Abbildung 16).

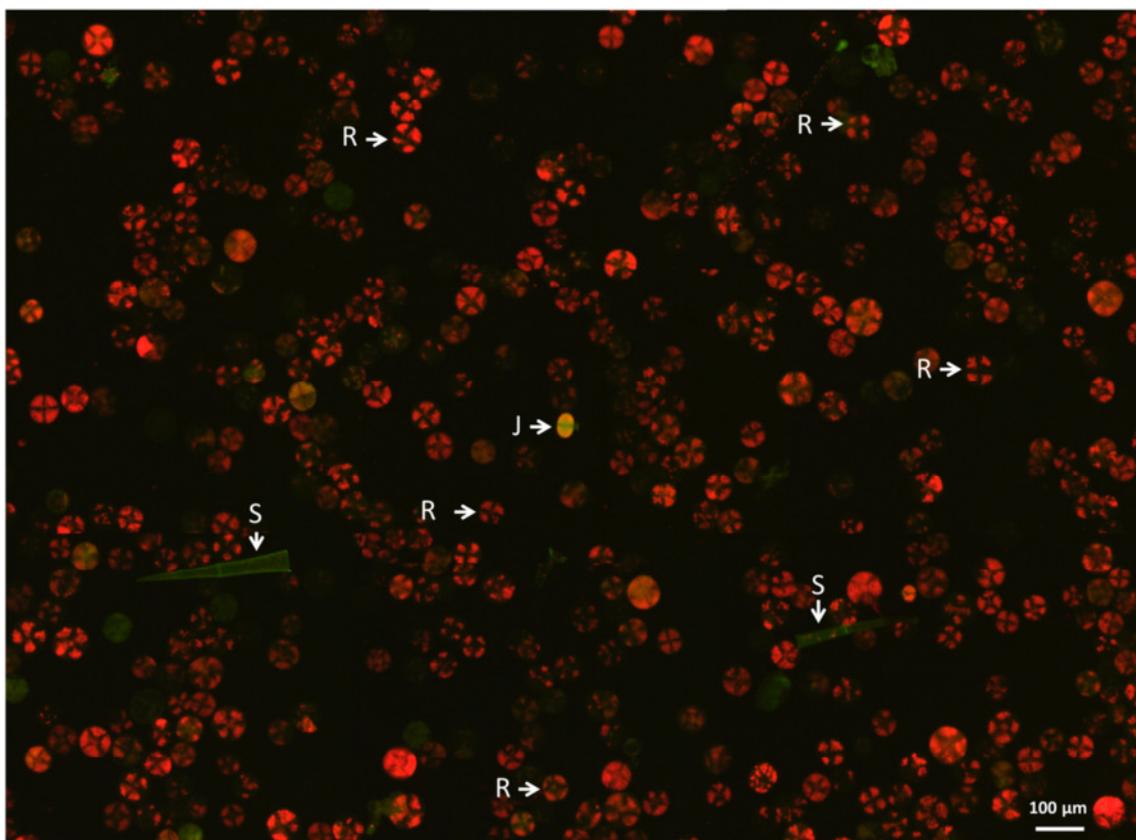


Abbildung 15: Trichomernte mittels Glaskugelmethode: Trichomfraktion von *S. habrochaites* die mit der Glaskugelmethode in Sorbitolpuffer geerntet wurden und die Quantität von reifen (R) Typ VI Trichomen, jungen (J) Typ VI Trichomen und Stielen (S) zeigt, Montage aus neun Autofluoreszenzbildern.

3.3.1.2. Trichomsortierung

Da bei der Ernte der Typ VI Trichome ein Gemisch aus jungen und reifen Trichomen erhalten wurde, war vor den weiteren Analysen eine Sortierung der Trichome in verschiedene Entwicklungsstadien notwendig. Für die Trennung der einzelnen Entwicklungsstadien der Trichome konnten dabei Unterschiede hinsichtlich der Größe, Dichte und Autofluoreszenz genutzt werden. Aufgrund der sehr geringen Anzahl von jungen Trichomen in der Probe war die Sortierung durch einen einzelnen Trennmechanismus jedoch schwierig und lieferte unzureichende Ergebnisse (geringe Ausbeute oder geringe Reinheit).

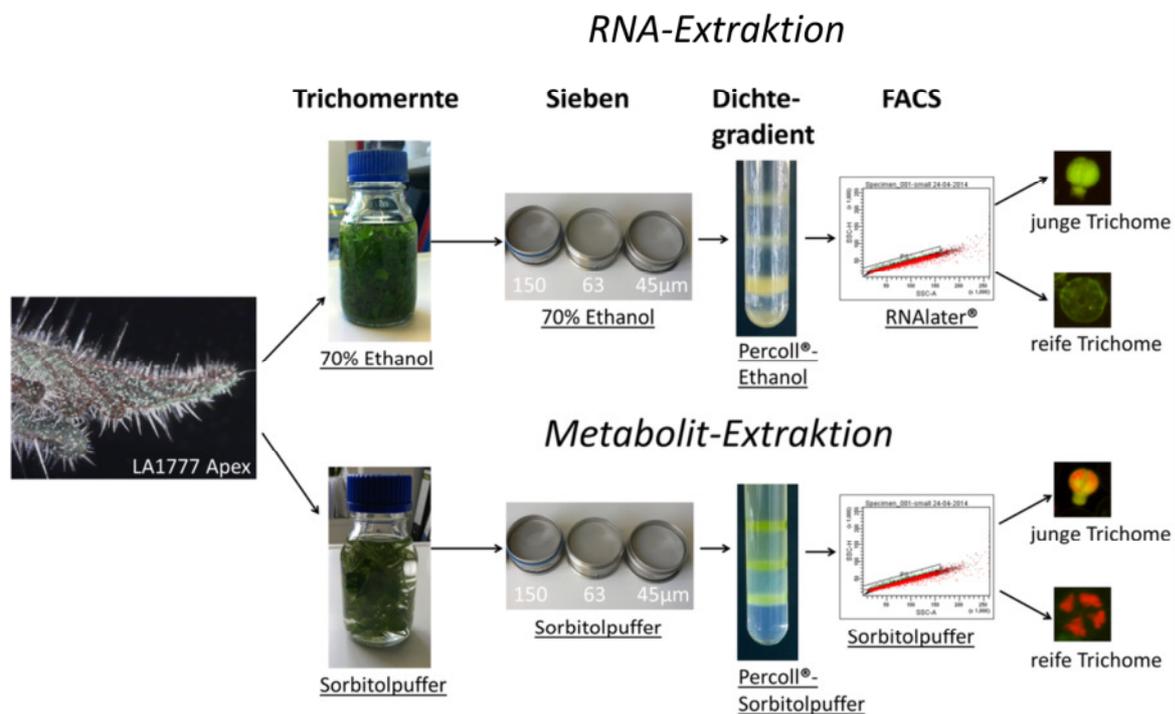


Abbildung 16: Übersicht der Arbeitsschritte zur Trennung von jungen und reifen Trichomen für die Analyse der Genexpression und der Sekundärmetabolitgehalte

Aus diesem Grund wurde für die Sortierung der Trichome eine Kombination aus Sieben, Dichtegradientenzentrifugation und Durchflusszytometrie angewendet (Schema Abb. 16). Zunächst wurde hierbei eine grobe Vorsortierung der Trichome vorgenommen, indem die geerntete Trichomfraktion über Stahlsiebe verschiedener Größen (150, 63, 45 und 25 μm) filtriert wurde. Hierbei wird ausgenutzt, dass die Trichomköpfchen in den frühen Entwicklungsstadien einen kleineren Durchmesser haben als die reifen Trichome (siehe Abbildung 7). Da die Größe der Trichome jedoch einer großen Varianz unterliegt (So kann der Durchmesser der Köpfchen der reifen Trichome zwischen 40 und 120 μm schwanken) und zudem auch die Maschenweite der kommerziell erhältlichen Siebe schwankt (so schwankt die Maschenweite eines 45 μm beispielsweise zwischen 35 und 55 μm), konnte

Ergebnisse

durch das Sieben jedoch nur eine Anreicherung der jungen Trichome auf 2,3-3,4% (Abbildung 17 A, D; Tabelle 3; Anhang Abbildung A11 A, D) erreicht werden. Dies machte eine weitere Anreicherung der jungen Trichome vor den Analysen der Genexpression und der Sekundärmetabolitgehalte erforderlich.

Für die weitere Trennung der jungen und reifen Trichome konnten Unterschiede bezüglich ihrer Dichte ausgenutzt werden. Bereits für die Trichome des Tabaks konnte gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Subtypen verschiedene Dichten haben, die für die Trennung der einzelnen Trichomfraktionen mittels Dichtegradientenzentrifugation genutzt werden kann (Sallets *et al.* 2014). Aufgrund der unterschiedlichen Menge an Vakuolen und Sekundärmetaboliten in den jungen bzw. reifen Typ VI Trichomen war anzunehmen, dass sich auch die Dichte der Typ VI Trichome zwischen den verschiedenen Entwicklungsstadien unterscheidet. Deshalb sollte auch in diesem Fall eine Trennung der verschiedenen Stadien mittels Dichtegradientenzentrifugation möglich sein. Um die Anwendbarkeit dieser Sortiermethode für die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Typ VI Trichome für die Analyse der Genexpression bzw. der Sekundärmetabolitgehalte zu überprüfen, wurde zunächst ein geeigneter Gradient aus Percoll®-Ethanol bzw. Percoll®-Sorbitolpuffer entwickelt.

Mit dem optimierten Dichtegradienten konnte schließlich eine Auftrennung der verschiedenen Entwicklungsstadien der Typ VI Trichome erzielt werden (Anhang Abbildung A10). Hierbei zeigte sich, dass die Trichome eines vierzelligen Zwischenstadiums, in dem der sekretorische Hohlraum noch nicht ausgebildet ist, die niedrigste Dichte haben und im Percoll®-Gradienten in der obersten Bande akkumulieren (Anhang Abb. A10 B). Die Trichome der frühesten Entwicklungsstadien, die mit der Glaskugelmethode geerntet werden konnten, zeigten eine etwas höhere Dichte und akkumulieren knapp darunter (Anhang Abb. A10 C), gefolgt von den reifen Trichomen mit der höchsten Dichte (Anhang Abb. A10 D). Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation konnte, je nach Zusammensetzung des Gradienten und der Menge an jungen Trichomen im Ausgangsmaterial, eine Anreicherung der jungen Trichome auf 22,6-39,7% erreicht werden (Abb. 17 B, E; Tabelle 3; Anhang Abb. A11 B, E). Der Rest der Fraktion setzte sich zum größten Teil aus reifen Trichomen und einigen wenigen Typ IV und Typ VII Trichomen zusammen. Da gleichzeitig eine nahezu 100% reine Fraktion an reifen Trichomen gewonnen werden konnte, sollte diese Reinheit jedoch bereits ausreichend sein, um Gene oder Sekundärmetabolite zu identifizieren, die in den jungen Trichomen stärker exprimiert/ vorhanden sind, als in den reifen Trichomen. Umgekehrt sollte aufgrund der hohen Kontamination mit reifen Trichomen in der Fraktion der jungen Trichome die

Identifikation von Genen und Sekundärmetaboliten, die in den reifen Trichomen höher exprimiert sind nur, sehr eingeschränkt möglich sein. Hierfür wird eine weitere Aufreinigung der Fraktion der jungen Trichome benötigt.

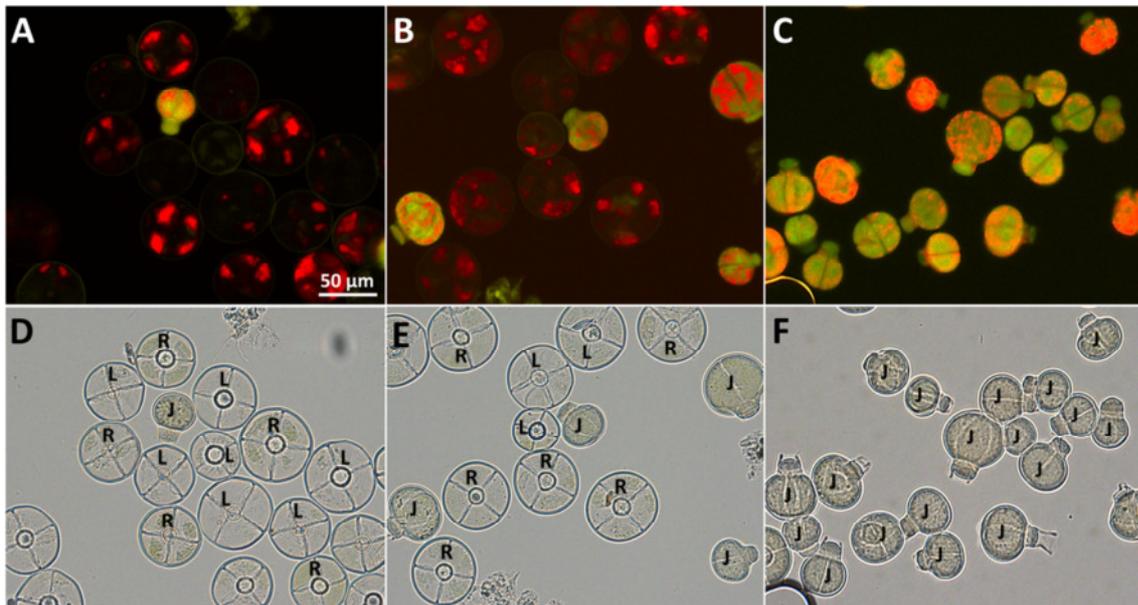


Abbildung 17: Anreicherung junger Typ VI Trichome von *S. habrochaites* in Sorbitolpuffer: Autofluoreszenz- (A-C) und Hellfeldmikroskopie (D-F) von jungen (J), reifen (R) und leeren (L) Typ VI Trichomen (D-F) von Trichomfraktionen nach Sieben (A, D), Dichtegradientenzentrifugation (B, E) und Durchflusszytometrie (C, F).

Aufgrund der ausgeprägten Unterschiede der Autofluoreszenz von jungen und reifen Trichomen, sowie der geringen Größe, konnte für die weitere Anreicherung der jungen Trichome die Durchflusszytometrie angewendet werden. Die Trichome für die Genexpressionsanalysen mussten dabei zunächst von Ethanol in eine wässrige Lösung zur Stabilisierung der RNA (z.B. RNAlater®) überführt werden, da das verwendete Durchflusszytometer nicht mit organischen Lösungsmitteln kompatibel war. Für die Analyse der Sekundärmetabolitgehalte konnten die Trichome dagegen im zuvor verwendeten Sorbitolpuffer verbleiben.

Ergebnisse

Tabelle 3: Quantifizierung der Anreicherung junger Trichome in Sorbitolpuffer und Ethanol:

Gesamtmenge an Trichomen, die nach der Ernte und den einzelnen Aufreinigungsschritten von 80 *S. habrochaites* Pflanzen erhalten wurde, sowie Anteil der jungen Typ VI Trichome in jeder Fraktion, n=3.

	Trichomanzahl	Anteil junger Typ VI Trichome
Ernte und Aufreinigung in Sorbitolpuffer:	geerntet	10.725.925 ± 637.252
	nach Sieben	2.629.629 ± 114.036
	nach Dichtegradient	225.185 ± 45.776
	nach FACS	3.120 ± 891
Ernte und Aufreinigung in Ethanol/ RNAlater®:	geerntet	7.577.778 ± 1.424.824
	nach Sieben	2.925.926 ± 768.623
	nach Dichtegradient	114.444 ± 26.200
	nach FACS	6.210 ± 1.368
		0,68%
		2,27%
		22,62%
		ca. 99%
		1,66%
		3,36%
		39,74%
		ca. 99%

Die Trennung der jungen und der reifen Trichome mittels Durchflusszytometrie wurde durch die Anregung der Autofluoreszenz der Trichome mit einem blauen Laser durchgeführt. Die Selektion der jungen Trichome erfolgte dabei in zwei Schritten. Zunächst erfolgte eine Abtrennung der einzelnen Trichome von Aggregaten und Dreckpartikeln durch die Selektion einer Region (Abbildung 18 A; Region P1) anhand der Streulichtsignale FSC-H (*Forward Scatter Height*) und FSC-A (*Forward Scatter Area*). Im Anschluss daran wurde die Autofluoreszenz der selektierten Trichome analysiert. Hierbei zeigten sich, wie bereits unter 3.1.2. vorgestellt wurde, zwei Hauptfluoreszenzen (Abb. 18 B). Die erste starke Autofluoreszenz wird dabei durch die fluoreszierende Substanz in den jungen Trichomen sowie den phenolischen Verbindungen in der Zellwand hervorgerufen und liegt im gelb-grünen Wellenlängenbereich. Die zweite Autofluoreszenz kommt durch die Anwesenheit von Chlorophyll zustande und liegt im roten Wellenlängenbereich. In der Auftragung der Intensitäten der gelb-grünen und der roten Fluoreszenz bilden sich hierbei zwei unterschiedliche Populationen heraus. Die jungen Trichome (Abb. 18 B; Region P2) sind dabei durch eine starke gelb-grüne und rote Fluoreszenz gekennzeichnet, wohingegen die reifen Trichome nur im roten Wellenlängenbereich stark fluoreszieren (Abb. 18 B; Region P3). Die Trichomfraktionen, die in 70% Ethanol bzw. in Sorbitolpuffer geerntet wurden, unterscheiden sich dabei hinsichtlich der Fluoreszenzintensitäten deutlich voneinander. So zeigen die in Ethanol geernteten Trichome durch die weitestgehende Extraktion des Chlorophylls während der Ernte eine deutlich schwächere Fluoreszenz im roten Wellenlängenbereich (Daten nicht gezeigt). Jedoch bilden sich auch hier Populationen von jungen und reifen Trichomen heraus, die isoliert werden konnten. Durch die durchflusszytometrische Trennung der Trichome anhand der Autofluoreszenzen konnte letztendlich eine Fraktion aus jungen Trichomen mit einer Reinheit von etwa 99% gewonnen werden (Abb. 17 C, F; Tabelle 3;

Anhang Abb. A11 C, F). Die sortierten Trichome wurden dabei direkt in einem für die weitere Analyse geeigneten Extraktionspuffer gesammelt. Für die anschließenden Analysen wurde weiterhin auch eine vergleichbare Fraktion von reifen Trichomen gesammelt.

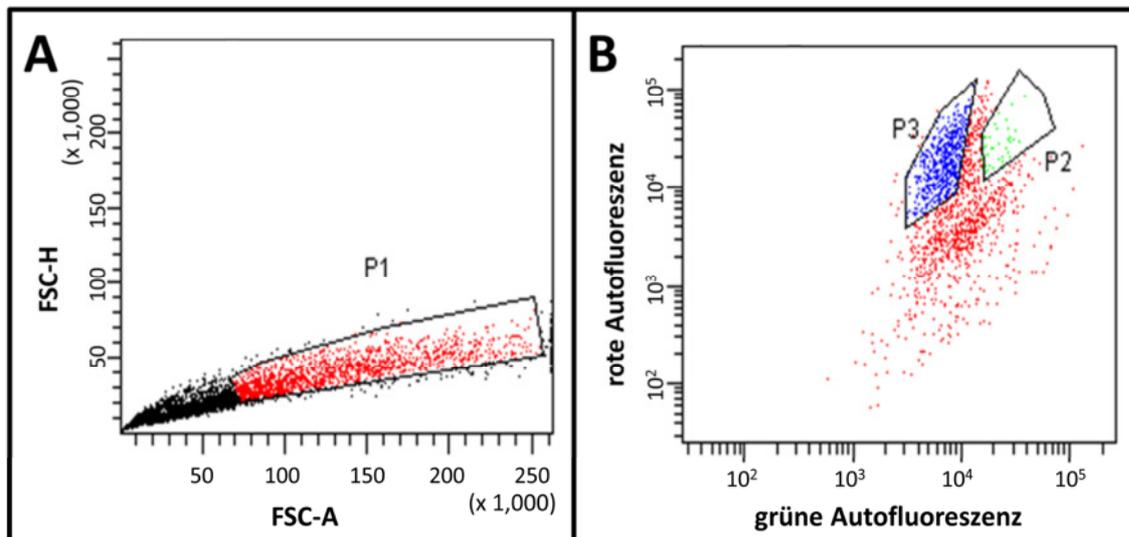


Abbildung 18: Histogramme einer Fraktion junger Trichome von *S. habrochaites*: Vorselektion einzelner junger Typ VI Trichome (Region P1) mittels FSC-H und FSC-A (A). Finale Auftrennung der reifen (Region P3) und der jungen Typ VI Trichome (Region P2) anhand der Intensität der grünen (AlexaFluor 488 Kanal) und roten (PerCP Kanal) Autofluoreszenz (B). Die Ernte und Vorsortierung der Trichome wurde in Sorbitolpuffer durchgeführt.

3.3.1.3. Analyse der sortierten Trichome

Die Sortierung von jungen und reifen Typ VI Trichomen eröffnet zahlreiche Möglichkeiten, um mehr über den Entwicklungsprozess der glandulären Trichome zu erfahren. So können mit den sortierten Trichomen Analysen der Genexpression, des Proteoms oder des Metabolismus durchgeführt werden. Aufgrund der späten Fertigstellung der Trichomsortierungsmethode konnten mit der finalen Methode jedoch nur wenige Experimente durchgeführt werden. Nichtsdestotrotz konnte hierbei gezeigt werden, dass die sortierten Trichome sowohl für die Extraktion von RNA als auch für die Analyse der Sekundärmetabolitgehalte verwendet werden können.

Hierfür wurden mit der zuvor beschriebenen Sortierungsmethode (Ethanol/ RNAlater®-Methode) zunächst mehrere Fraktionen von jeweils 10.000 jungen und reifen Trichomen in RNA-Extraktionspuffer gesammelt. Nach der Extraktion der Gesamt-RNA, bei der für beide Trichomfraktionen ähnliche Mengen an RNA extrahiert werden konnten (junge Trichome $13,8 \pm 7,9$ ng; reife Trichome $14,2 \pm 8,9$ ng, $n=3$), wurde die Qualität der RNA mittels Kapillarelektrophorese überprüft (Abbildung 19 A, B). Hierbei zeigten sich sowohl

Ergebnisse

für die RNA aus den jungen Trichomen als auch für die RNA aus den reifen Trichomen deutliche Banden der ribosomalen RNAs und nahezu keine Abbauprodukte. Dies zeigt, dass die RNA während des gesamten Sortierungsprozesses intakt bleibt und zur Analyse der Genexpression durch RNA-Seq oder Micro-Array-Hybridisierung eingesetzt werden kann.

Darüber hinaus konnten die sortierten Trichome (Sorbitolpuffer-Methode) auch für die Untersuchung der Sekundärmetabolitgehalte verwendet werden. Hierfür wurden Fraktionen von jeweils 10.000 jungen und reifen Trichomen in saurem Methanol gesammelt und extrahiert. Anschließend wurden die Gehalte an verschiedenen Flavonoid-Konjugaten in den Proben mittels LC-MS bestimmt. Da aufgrund der geringen Anzahl an Trichomen nur sehr geringe Mengen an Metaboliten isoliert werden konnten, wurde für die massenspektrometrische Analyse zunächst eine geeignete Methode mit einer sehr hohen Empfindlichkeit etabliert. Hierfür wurde eine Kopplung aus einer SPE basierten Anreicherung der Metabolite und einem sehr sensitivem Massenanalysators eingesetzt. Dabei wurde zunächst der gesamte Extrakt von 1 ml auf eine SPE-Kartusche geladen, gewaschen und im Anschluss eluiert. Die Elution erfolgte dabei durch die Gradientenpumpe der UPLC in Reihenschaltung mit der analytischen Säule. Hierdurch konnte der gesamte Extrakt auf die analytische Säule injiziert werden, was im Zusammenspiel mit dem verwendeten Massenanalysators zu einer sehr hohen Empfindlichkeit führte.

Mit Hilfe dieser Methode konnten in den Trichomproben verschiedene Flavonoid-Konjugate analysiert werden. Dabei zeigte sich, dass in den jungen Trichomen signifikant ($p < 0,05$) höhere Mengen an mehrfach methylierten Flavonoiden als in den reifen Trichomen vorhanden sind (Abbildung 19 C). Derselbe Trend liegt auch bei verschiedenen Flavonoid-Diglykosiden vor, wobei die Unterschiede aufgrund der hohen Abweichungen zwischen den vier biologischen Replikaten in diesem Fall keine Signifikanz zeigen.

Die erhöhten Gehalte an verschiedenen Flavonoid-Konjugaten in den jungen Trichomen stehen dabei im Einklang mit der Beobachtung der gestörten Trichomentwicklung bei der Chalconisomerase-Mutantenline LA1049 (siehe 3.1.3.1.) und deuten auf eine wichtige Rolle des Flavonoidstoffwechsels bei der Entwicklung der Typ VI Trichome hin.

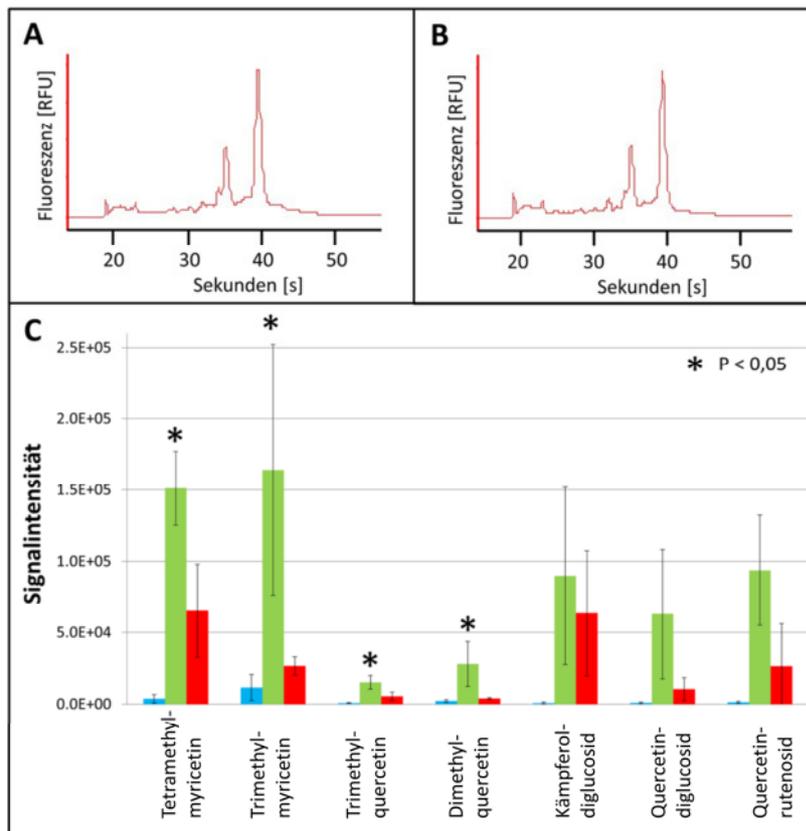


Abbildung 19: Extraktion von RNA und Sekundärmetaboliten aus sortierten jungen und reifen Trichomen von *S. habrochaites*: Kapillarelektrophoresechromatogramme von Gesamt-RNAs die aus jungen (A) und reifen (B) Typ VI Trichomen isoliert wurden. Gehalte an verschiedenen Flavonoid-Konjugaten (C) in 10.000 jungen (grün) und reifen (rot) Typ VI Trichomen, Wasser-Kontrolle in blau, n=4, RFU - *Relative Fluorescent Units*.

3.3.2. RNA-Seq-Analyse mittels 3'-library-Sequencing

Um einen detaillierteren Einblick in die Entwicklung der glandulären Typ VI Trichome von *S. habrochaites* zu gewinnen, wurde eine RNA-Seq-Analyse junger und reifer Trichome durchgeführt. Da mit der unter 3.3.1.2. beschriebenen Methode zur Ernte und Sortierung von reinen Fraktionen junger und reifer Trichome unter den gegebenen Umständen (begrenzte Gewächshausfläche, begrenzte Zeit) nur sehr geringe Mengen an Material gewonnen werden konnten, die eine hohe Amplifikation der isolierten mRNA für die Durchführung von Transkriptanalysen zur Folge gehabt hätte, wurde für das RNA-Seq-Experiment eine vereinfachte Sortierungsmethode verwendet.

Hierbei wurden zunächst Typ VI Trichome von *S. habrochaites* Pflanzen mit der Glaskugelmethode nach Schillmiller *et al.* (2010) in Sorbitolpuffer geerntet. Zur Anreicherung der jungen Trichome wurden die geernteten Trichomköpfchen dabei direkt durch ein 45 µm Stahlsieb gefiltert und im Anschluss daran in 70%igen Ethanol überführt, um eine Stabilisierung der RNA zu gewährleisten. Die Trennung der jungen und reifen Trichome erfolgte dann mittels Ethanol-Percoll®-Dichtegradientenzentrifugation. Hierbei konnten etwa 15 mg einer auf ca. 40% angereicherten Fraktion von jungen Trichomen und etwa 100 mg einer 99% reinen Fraktion von reifen Trichome gewonnen werden (Anhang Abbildung A12 A, B) aus denen zwischen 750 ng (junge Trichome) und 5000 ng (reife

Ergebnisse

Trichome) Gesamt-RNA isoliert werden konnten. Aufgrund der geringen RNA-Mengen und der niedrigen RNA-Integrität (RIN 5,5-6,6; siehe Anhang Abb. A12 C, D) wurde für die Sequenzierung der mRNAs das *3'-RNA-library* Verfahren angewendet. Bei diesem Verfahren wird nur das 3'Ende der kodierenden Sequenz sowie ein Teil der 3' *untranslated region* (UTR) sequenziert. Dies führt zu einer besseren Erfassung von teilweise degradierten RNAs und zu einer erhöhten Sensitivität.

Durch das *3'-RNA-library* Verfahren konnten schlussendlich Transkripte von insgesamt 14.490 Genen in den jungen und reifen Trichome analysiert werden. Von diesen 14.490 Genen weisen 587 eine differenzielle (*fold change* > 2; FDR < 0,05; n=3) Expression auf. Der größte Teil dieser differenziell exprimierten Gene zeigt hierbei in den jungen Trichomen (515 Gene) eine höhere Expression als in den reifen Trichomen (72 Gene). Die Unterschiede in den Expressionsleveln liegen dabei bei 2- bis 1500- fach für Gene, die in den jungen Trichomen höher exprimiert sind und bei 2- bis 3,8- fach für Gene, die in den reifen Trichomen höher exprimiert sind. Die sehr hohen Expressionsunterschiede von bis zu 1500- fach für einige Gene, die in den jungen Trichomen höher exprimiert sind, kommen hierbei dadurch zustande, dass die Expression dieser Gene in den reifen Trichomen extrem gering ist. Aufgrund dieses Umstandes ist es möglich, dass diese Daten einen Überbefund darstellen, weshalb die Daten durch einen zweiten Ansatz überprüft werden mussten (siehe 3.3.3.).

Um einen ersten Überblick über die differenzielle Genexpression der jungen und reifen Trichome zu gewinnen, wurden alle unterschiedlich exprimierten Gene anhand ihrer biologischen Funktion verschiedenen Ontologie-Klassen zugeordnet (Abbildung 20). Die Zuordnung basierte dabei auf den 35 Ontologie-Klassen von MapMan und ermöglichte die Einteilung von 483 der 587 differenziell exprimierten Gene. Die Kategorisierung der Gene anhand ihrer Funktion zeigt dabei, dass die Mehrzahl der in den jungen Trichomen höher exprimierten Gene im Proteinstoffwechsel (157 Gene, davon 130 ribosomale Proteine) oder in der Regulierung und Synthese von RNA (45 Gene) und DNA (44 Gene) beteiligt sind. Die hohen Expressionslevel dieser Gene in den jungen Trichomen sind dabei vermutlich auf die höhere Aktivität von RNA- und Proteinsynthese in jungen Zellen zurückzuführen und stellen wahrscheinlich kein trichomspezifisches Muster dar. Des Weiteren sind in den jungen Trichomen viele Gene mit Funktionen im Bereich des Zellwand- und Lipidstoffwechsels, der Signalverarbeitung, von verschiedenen Transportprozessen und der Stressantwort verstärkt exprimiert. Unter den in den jungen Trichomen höher exprimierten Genen des Zellwandmetabolismus (18 Gene) finden sich

dabei Gene der Synthese (7 Gene), der Modifizierung (4 Gene) und des Abbaus von Zellwandmaterial (6 Gene).

Besonders interessant ist dabei die erhöhte Expression von verschiedenen *Expansinen* (Solyc05g007830.2.1, Solyc09g010860.2.1, Solyc12g089380.2.1) und *Endoglukanasen* (Solyc05g005080.2.1, Solyc08g082250.2.1, Solyc10g079860.1.1), sowie jeweils einer *Xylosidase* (Solyc01g079570.2.1), *Arabinofuranosidase* (Solyc01g104950.2.1), *Pektatlyase* (Solyc09g091430.2.1) und *Peroxidase* (Solyc04g071890.2.1). Die durch diese Gene kodierten Proteine können an der Auflockerung bzw. Auflösung von Zellwandstrukturen beteiligt sein, weshalb eine Beteiligung dieser Proteine an der Entstehung des sekretorischen Hohlraumes durch die gezielte Auflösung bestimmter Zellwandbereiche denkbar ist.

Weiterhin zeigen auch vier Vertreter der MYB-Transkriptionsfaktoren (Solyc09g008250.2.1, Solyc02g088190.2.1, Solyc10g081490.1.1, Solyc03g006150.2.1) in den jungen Trichomen eine deutlich erhöhte Expression, von denen die ersten drei wiederum eine starke Homologie zu drei R2R3 MYB-Transkriptionsfaktoren (AT2G36890.1, AT5G15310.1, AT1G08810.1) von *Arabidopsis* aufweisen. Da die bisherigen Untersuchungen der R2R3 MYB-Transkriptionsfaktoren zeigten, dass die Vertreter dieser Genfamilie an einer Vielzahl von Prozessen, wie Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen sowie der Regulation des Phenylpropanoidstoffwechsels beteiligt sein können (Stracke *et al.* 2001), liegt die Vermutung nahe, dass die betreffenden Gene auch bei der Entwicklung der Typ VI Trichome eine wichtige Rolle einnehmen könnten.

Ferner fällt bei der genaueren Betrachtung der Daten auf, dass auch die Expressionslevel von zwei putativen *Flavoproteinen* (Solyc03g121600.2.1, Solyc06g065630.2.1) in den jungen Trichomen deutlich (12- und 26,9-fach) erhöht sind. Die Aminosäuresequenzen der beiden Proteine weisen starke Ähnlichkeiten zu den FAD-bindenden Redoxenzymen Hothead und Yucca aus *Arabidopsis* auf (Krolikowsk *et al.* 2003; Dai *et al.* 2013). Sollten die beiden Proteine tatsächlich FAD binden, könnte es sich bei den beiden Proteinen um die gesuchten Flavoproteine handeln, die für die gelb-grüne Autofluoreszenz der jungen Trichome verantwortlich sind (siehe 3.1.3.2.).

Ergebnisse

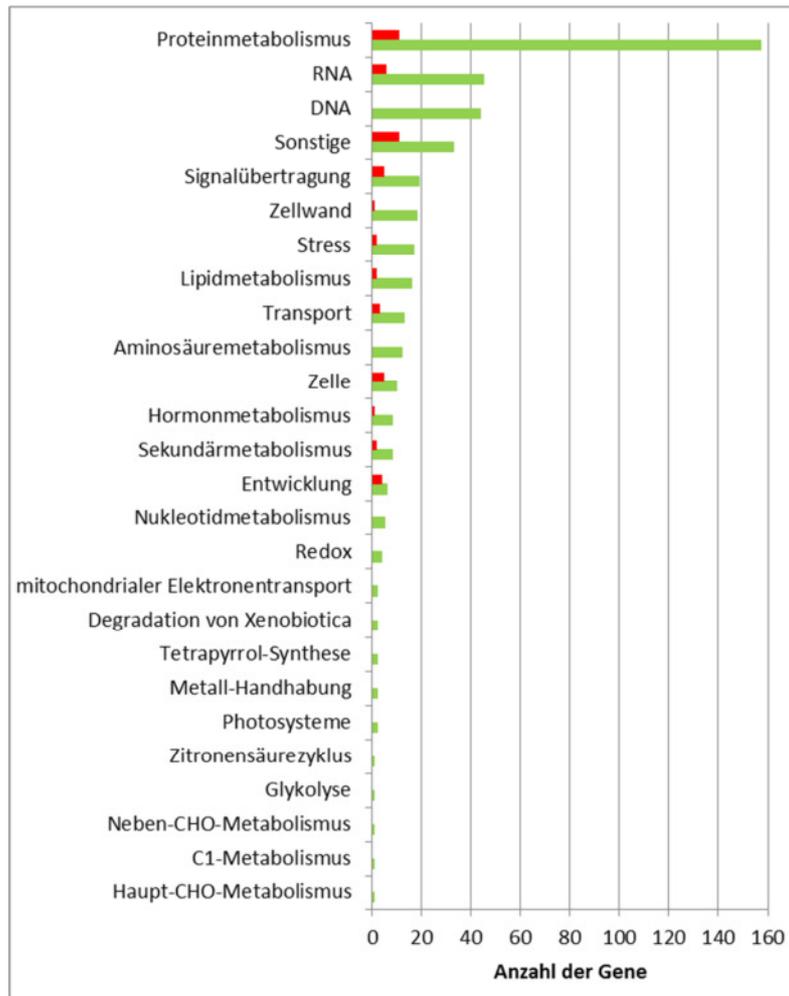


Abbildung 20: Funktionelle Zuordnung der in den jungen und reifen Trichomen von *S. habrochaites* LA1777 differenziell exprimierten Gene: Einteilung der in den jungen (grün) bzw. reifen (rot) Typ VI Trichomen höher exprimierten Gene anhand ihrer biologischen Funktion nach den 35 MapMan Ontologie-Klassen.

Anhand der Daten der RNA-Seq-Analyse kann somit ein interessanter erster Einblick in die spezifische Genexpression der jungen Typ VI Trichome gewonnen werden. Vor der weiteren Selektion potentieller Kandidaten für weitere funktionelle Analysen mussten die durch die RNA-Seq-Analyse erhaltenen Daten jedoch zunächst überprüft werden. Hierfür wurden die Expressionsmuster von 44 ausgewählten Genen mittels qPCR ermittelt.

3.3.3. Datenvalidierung mittels qPCR

Die Ernte und Sortierung der Trichome von *S. habrochaites* für die Datenvalidierung wurde wie unter 3.3.2. beschrieben durchgeführt, mit dem Unterschied, dass bereits die Trichomernte in 70% Ethanol erfolgte. Durch den hierdurch früher gewährleisteten Schutz der RNA vor Degradation konnte auf diese Weise RNA mit einer, im Vergleich zu den für die RNA-Seq-Analyse verwendeten Proben, höheren Integrität (RIN 9-10) isoliert werden. Die Reinheit der Fraktionen der jungen und reifen Trichome war hingegen ähnlich zu den Proben, die für die RNA-Seq-Analyse genutzt wurden und lag bei ca. 40-50% für die

Fraktion der jungen Trichome und bei 99% für die Fraktion der reifen Trichome. Weiterhin wurden für die Datenvalidierung acht Replikate (vier biologische und je zwei technische Replikate) verwendet, um bei der Bestimmung der Expressionslevel eine höhere Reproduzierbarkeit zu erreichen. Die Überprüfung der RNA-Seq-Daten erfolgte anhand der Expressionsanalyse von 44 differentiell exprimierten Genen. Von den verwendeten 44 Genen zeigten bei der RNA-Seq-Analyse 39 Gene eine höhere Expression in den jungen Trichomen und fünf Gene eine höhere Expression in den reifen Trichomen.

Für die Überprüfung dieser Expressionsmuster wurde zunächst ein geeignetes Referenzgen ermittelt. Für diesen Zweck wurden acht verschiedene Gene (Solyc06g063370.2.1, Solyc11g068430.1.1, Solyc02g080540.1.1, Solyc04g081400.2.1, Solyc10g085020.1.1, Solyc04g064700.2.1, Solyc01g088720.2.1, Solyc03g078400.2.1) analysiert, die bei der RNA-Seq-Analyse gleiche Expressionslevel in den jungen und reifen Trichomen aufwiesen. Hierbei zeigten sich für die analysierten Gene 1,2- bis 2,1- fache Unterschiede zwischen den jungen und den reifen Trichomen, die bei fünf von acht Genen jedoch nicht signifikant waren ($p > 0,05$; Daten nicht gezeigt). Von diesen fünf Genen wurde aufgrund eines geeigneten Expressionsniveaus und einer hohen Reproduzierbarkeit *Aktin* (Solyc03g078400.2.1) als Referenzgen ausgewählt.

Von den analysierten 44 Genen konnten bei der qPCR 43 detektiert werden, von denen wiederum 41 den gleichen Trend wie bei der RNA-Seq-Analyse aufweisen (Tabelle 4). Bei 35 dieser Gene weisen die Expressionslevel einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) auf. Die absoluten Unterschiede in der Genexpression zwischen den jungen und reifen Trichomen zeigen dabei jedoch teilweise große Abweichungen zu den RNA-Seq-Daten. So zeigen sich vor allem bei den Genen, die bei den RNA-Seq-Daten eine extrem hohe differenzielle Expression (16,6-377- fach) aufwiesen, bei den Daten der qPCR deutlich niedrigere Werte. Die teils großen Diskrepanzen zwischen den beiden Ansätzen lassen sich dabei, wie bereits erwähnt (siehe 3.3.2.), hauptsächlich auf die sehr geringe Expression dieser Gene in den reifen Trichomen zurückführen. So kann es im Zusammenspiel aus der niedrigen RNA-Integrität der Gesamt-RNA, die für die RNA-Seq-Analyse verwendet wurde, und der sehr niedrigen Expression der betreffenden Gene zu einer Unterbestimmung der Transkripte in den reifen Trichomen kommen, die wiederum zu einer Überbestimmung der Differenzen zwischen jungen und reifen Trichomen führt.

Dennoch zeigen auch bei der qPCR einige Gene sehr hohe Differenzen in den Expressionsleveln. So weisen sieben der 44 analysierten Gene eine 12,1- bis 26,1- fach höhere Expression in den jungen Trichomen auf. Zwei dieser sieben Gene kodieren dabei für MYB-Transkriptionsfaktoren (Solyc09g008250.2.1, Solyc03g006150.2.1), wobei für den

Ergebnisse

R2R3 homologen MYB-Transkriptionsfaktor *Bli1* (Solyc09g008250.2.1) bereits eine wichtige Funktion bei der Sprossentwicklung in *S. lycopersicum* nachgewiesen werden konnte (Busch *et al.* 2011). Zwei weitere Gene kodieren für Proteine des Phenylpropanoidstoffwechsels (Solyc10g008120.2.1, Solyc03g025320.2.1). Der Abgleich der Sequenzen der beiden entsprechenden Proteine mit den *Arabidopsis*-Proteom zeigt dabei für eines der Proteine, die vermeintliche O-Methyltransferase 3 (Solyc03g025320.2.1), eine starke Homologie zu einer Diacylglycerol-Acyltransferase (AT5G23940.1) auf, die in *Arabidopsis* eine entscheidende Rolle bei der Kutin-Biosynthese spielt (Panikashvil *et al.* 2009; Rani *et al.* 2010). Da die glandulären Typ VI Trichome als Auswüchse der Epidermis ebenfalls eine Kutikula besitzen, lässt sich vermuten, dass das entsprechende Protein auch bei den Typ VI Trichomen eine wichtige Rolle bei der Synthese von Kutin spielen könnte. Die restlichen drei Gene kodieren für ein Expansin (Solyc09g010860.2.1), eine Endoglukanase (Solyc10g079860.1.1) und eine Peroxidase (Solyc04g071890.2.1), die alle eine wichtige Rolle bei der Auflockerung und Auflösung von Zellwänden einnehmen können (siehe McQueen-Mason und Cosgrove 1995; Yoshida und Komae 2006; Passardi *et al.* 2004),

Angesichts der hohen Unterschiede in den Expressionsleveln zwischen den jungen und reifen Trichomen könnten all diese Gene potenziell an der Entwicklung der Typ VI Trichome von *S. habrochaites* beteiligt sein und stellen daher interessante Kandidaten für eine funktionelle Überprüfung, etwa durch die Erstellung von *knock-down* oder *knock-out* Linien, dar.

Aufgrund zahlreicher Schwierigkeiten, wie der schlechten Transformationseffizienz (Daten nicht gezeigt) und der Selbstinkompatibilität von *S. habrochaites* LA1777 (Broz *et al.* 2017), konnte bislang jedoch keine Methode zur stabilen Transformation von *S. habrochaites* LA1777 etabliert werden. Infolge dieser Problematik wurden die Expressionanalysen an den jungen und reifen Trichomen von *S. lycopersicum* LA4024 wiederholt, wodurch zumindest die funktionelle Überprüfung von Genen, die grundlegende Prozesse der Trichomentwicklung steuern, ermöglicht wird.

Tabelle 4: Validierung der RNA-Seq-Daten von *S. habrochaites* LA1777 mittels qPCR: Unterschiede der Expression von 44 Genen, ermittelt durch RNA-Seq (n=3) und qPCR (n=4). Positive Werte bedeuten eine höhere Expression in den jungen Trichomen, negative Werte eine höhere Expression in den reifen Trichomen. Die grün markierten Gene zeigten bei der qPCR eine mehr als 10-fach höhere Expression in den jungen Trichomen, während die rot markierten Gene keine signifikanten Unterschiede in den Expressionsleveln aufwiesen. Die grau hinterlegten Gene konnten bei der qPCR nicht detektiert werden.

	Genidentifikations- nummer	Blast	RNA-Seq fache Änderung	qPCR fache Änderung	t-Test
1	Solyc11g072890.1.1	Unbekanntes Protein	1504,4	x	x
2	Solyc05g046290.2.1	Xyloglukan-Endotransglukosylase	377,2	3,7	4,6E-06
3	Solyc12g089380.1.1	Expansin	350,4	3,2	2,9E-06
4	Solyc07g042390.1.1	Pektinesterase	121,1	-1,4	4,4E-01
5	Solyc02g083610.2.1	BZIP Transkriptionsfaktor	83,7	3,9	1,0E-02
6	Solyc01g068380.2.1	Purple acid-Phosphatase	60,5	1,6	6,3E-02
7	Solyc03g083900.2.1	Laccase-22	47,7	5,2	7,4E-07
8	Solyc09g008250.2.1	Bli1 MYB Transkriptionsfaktor	41,3	22,0	3,0E-08
9	Solyc05g014120.1.1	Methyltransferase typ 11	34,1	-1,6	9,1E-02
10	Solyc06g065630.2.1	YUCCA-ähnliche Flavinmonooxygenase	26,9	5,4	1,3E-06
11	Solyc09g008810.2.1	Homeobox Leucin Zipper-ähnliches Protein	26,1	4,6	3,1E-05
12	Solyc01g111830.2.1	24-sterol C-Methyltransferase	23,1	3,9	1,6E-03
13	Solyc03g019890.2.1	Beta-Galaktosidase	21,7	2,8	4,6E-03
14	Solyc03g006150.2.1	Myb-ähnliche DNA-Bindedomäne	20,4	13,9	7,5E-08
15	Solyc12g006430.1.1	UDP-glukuronosyltransferase	19,7	2,3	9,3E-04
16	Solyc01g079570.2.1	Beta-Xylosidase	19,4	6,2	1,7E-06
17	Solyc08g082250.2.1	Endoglukanase 1	17,8	6,3	1,8E-06
18	Solyc04g050570.2.1	GDSL Esterase/Lipase	16,6	4,3	5,4E-06
19	Solyc10g008120.2.1	O-Methyltransferase 3	15,5	26,1	2,4E-07
20	Solyc09g010860.2.1	Expansin	13,5	18,5	6,9E-07
21	Solyc10g079860.1.1	Endo-beta-1,3-Glukanase	12,1	23,7	7,5E-04
22	Solyc03g121600.2.1	Hothead-ähnliches Protein	12,0	4,9	3,0E-06
23	Solyc03g111550.2.1	GDSL Esterase/Lipase	11,6	9,1	8,7E-08
24	Solyc04g063230.2.1	Dehydrin	11,3	5,4	8,9E-05
25	Solyc05g053790.1.1	UDP-D-Glukuronate 4-Epimerase 4	10,7	2,7	2,7E-04
26	Solyc11g010460.1.1	Cyclin D2	10,4	4,6	4,1E-05
27	Solyc04g071890.2.1	Peroxidase 4	10,0	23,2	8,4E-07
28	Solyc02g088190.2.1	MYB Transkriptionsfaktor	9,9	6,4	3,3E-07
29	Solyc11g008630.1.1	Hydroxycinnamoyltransferase-ähnliches Protein	9,2	4,9	6,6E-06
30	Solyc09g014350.2.1	Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase 6	8,2	4,5	3,1E-06
31	Solyc10g081490.1.1	MYB Transkriptionsfaktor	8,0	5,2	7,5E-07
32	Solyc03g025320.2.1	Hydroxycinnamoyltransferase	7,6	12,1	4,8E-07
33	Solyc02g089440.2.1	Glykosyltransferase	4,3	2,5	6,8E-05
34	Solyc05g007830.2.1	Expansin 2	4,2	2,1	1,7E-03
35	Solyc05g005080.2.1	Endo-1,4-beta-Glukanase	4,2	4,5	1,0E-07
36	Solyc05g005080.2.1	Endoglukanase	4,2	3,9	6,4E-05
37	Solyc09g091430.2.1	Pektatlyase 1-27	3,7	7,2	3,8E-05
38	Solyc01g104950.2.1	Arabinofuranosidase	3,1	1,2	2,1E-01
39	Solyc01g008530.2.1	Cinnamoyl CoA Reduktase-ähnliches Protein	2,9	3,1	7,4E-04
40	Solyc06g076920.2.1	Undekaprenyl-Pyrophosphate-Synthase	-3,8	-1,5	1,2E-01
41	Solyc09g074530.2.1	SWEET Zuckertransporter	-3,3	-1,9	2,0E-02
42	Solyc02g038740.2.1	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Koenzyme A Reduktase	-2,8	-1,1	7,4E-01
43	Solyc04g082200.2.1	Dehydrin	-2,3	-1,2	3,5E-01
44	Solyc08g006310.2.1	Zellulosesynthase-ähnliches Protein	-2,5	-1,3	3,0E-01

3.3.4. Expressionsanalyse ausgewählter Gene in den jungen und reifen Trichomen von *S. lycopersicum*

Für die Ernte, Sortierung und RNA- Isolation aus den jungen und reifen Trichomen von *S. lycopersicum* wurden identische Methoden wie für die Validierung der RNA-Seq-Daten (siehe 3.3.3.) verwendet. Vor der Analyse der Expressionsmuster der bereits unter 3.3.3. beschriebenen Gene wurde zunächst erneut ein geeignetes Referenzgen ermittelt. Hierfür wurden die Expressionslevel der fünf Gene untersucht, die bereits bei *S. habrochaites* keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. Bei der Analyse dieser Gene zeigten sich bei *S. lycopersicum* jedoch für vier der fünf analysierten Gene signifikante, ($p < 0,05$; Daten nicht gezeigt) 1,5- bis 4,8- fache Unterschiede in den Expressionslevel. Lediglich für einen *Transkriptionsinitiationsfaktor* (Solyc01g088720.2.1) konnten wie bereits bei *S. habrochaites* keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$; Daten nicht gezeigt) in den Expressionslevel zwischen den jungen und reifen Trichomen festgestellt werden, weshalb dieses Gen als Referenzgen ausgewählt wurde.

Von den analysierten 44 Genen konnten 41 Gene auch in den Trichomen von *S. lycopersicum* detektiert werden, von denen wiederum 36 Gene den gleichen Trend wie bei den qPCR-Daten von *S. habrochaites* zeigen (Tabelle 5). Bei der Betrachtung der absoluten Unterschiede der Genexpression zeigen sich jedoch teilweise starke Diskrepanzen zwischen den beiden Tomatenlinien. So zeigen einige Gene, die bei *S. habrochaites* eine hohe differentielle Expression aufweisen, bei *S. lycopersicum* nur geringe Unterschiede und umgekehrt. Trotzdem können für vier Gene, darunter der MYB-Transkriptionsfaktor *Bli1* (Solyc09g008250.2.1), sowie ein weiterer *MYB-Transkriptionsfaktor* (Solyc03g006150.2.1), ein *Expansin* (Solyc09g010860.2.1) und die putative *Diacylglycerol-Acyltransferase* (Solyc03g025320.2.1; siehe 3.3.3.), bei beiden Tomatenlinien mehr als 12- fach erhöhte Expressionslevel in den jungen Trichomen beobachtet werden. Aus diesem Grund stellen diese Gene vielversprechende Kandidaten für eine funktionelle Charakterisierung durch die Erstellung von *knock-down* oder *knock-out* Linien in *S. lycopersicum* LA4024 dar.

Ogleich die Erstellung und Charakterisierung dieser Linien nicht im Umfang der vorliegenden Arbeit durchgeführt werden konnte, konnte zumindest der Einfluss des *knock-downs* eines dieser Gene, des MYB-Transkriptionsfaktors *Bli1* (Solyc09g008250.2.1), auf die Entwicklung der Typ VI Trichome an einer bereits bestehenden RNAi-Linie untersucht werden.

Tabelle 5: Expressionsanalyse ausgewählter Gene in den jungen und reifen Trichomen von *S. lycopersicum* LA4024: Unterschiede der Expression von 44 Genen, ermittelt durch qPCR (n=4). Positive Werte bedeuten eine höhere Expression in den jungen Trichomen, negative Werte eine höhere Expression in den reifen Trichomen. Die rot markierten Gene zeigten bei der qPCR keine signifikanten Unterschiede (*kursiv*) oder im Vergleich zu *S. habrochaites* gegensätzliche Expressionslevel (**fett**). Die grün markierten Gene zeigten sowohl bei *S. lycopersicum* als auch bei *S. habrochaites* eine mehr als 10- fach höhere Expression in den jungen Trichomen. Die grau hinterlegten Gene konnten bei der qPCR nicht detektiert werden.

	Genidentifikations- nummer	Blast	qPCR LA4024 fache Änderung	t-Test	qPCR LA1777 fache Änderung
1	Solyc11g072890.1.1	Unbekanntes Protein	x	x	x
2	Solyc05g046290.2.1	Xyloglukan-Endotransglukosylase	33,8	6,8E-05	3,7
3	Solyc12g089380.1.1	Expansin	8,8	5,4E-05	3,2
4	<i>Solyc07g042390.1.1</i>	<i>Pektinesterase</i>	<i>2,1</i>	<i>3,5E-01</i>	<i>-1,4</i>
5	<i>Solyc02g083610.2.1</i>	<i>BZIP Transkriptionsfaktor</i>	<i>1,3</i>	<i>3,4E-01</i>	3,9
6	<i>Solyc01g068380.2.1</i>	<i>Purple acid-Phosphatase</i>	<i>-1,4</i>	<i>1,9E-01</i>	<i>1,6</i>
7	<i>Solyc03g083900.2.1</i>	<i>Laccase-22</i>	<i>1,5</i>	<i>8,0E-02</i>	5,2
8	Solyc09g008250.2.1	Bli1 MYB Transkriptionsfaktor	33,0	3,7E-08	22,0
9	Solyc05g014120.1.1	Methyltransferase typ 11	18,9	7,6E-06	-1,6
10	Solyc06g065630.2.1	YUCCA-ähnliche Flavinmonooxygenase	13,2	2,2E-05	5,4
11	Solyc09g008810.2.1	Homeobox Leucin Zipper-ähnliches Protein	17,8	7,0E-07	4,6
12	<i>Solyc01g111830.2.1</i>	<i>24-sterol C-Methyltransferase</i>	<i>1,3</i>	<i>7,4E-01</i>	3,9
13	Solyc03g019890.2.1	Beta-Galaktosidase	7,6	5,5E-07	2,8
14	Solyc03g006150.2.1	Myb-ähnliche DNA-Bindedomäne	25,0	8,1E-07	13,9
15	<i>Solyc12g006430.1.1</i>	<i>UDP-glukuronosyltransferase</i>	<i>-2,1</i>	<i>5,0E-02</i>	2,3
16	Solyc01g079570.2.1	Beta-Xylosidase	7,2	1,5E-03	6,2
17	Solyc08g082250.2.1	Endoglukanase 1	23,2	6,2E-06	6,3
18	Solyc04g050570.2.1	GDSL Esterase/Lipase	25,2	5,0E-10	4,3
19	<i>Solyc10g008120.2.1</i>	<i>O-Methyltransferase 3</i>	<i>1,2</i>	<i>6,6E-01</i>	26,1
20	Solyc09g010860.2.1	Expansin	40,3	5,2E-08	18,5
21	Solyc10g079860.1.1	Endo-beta-1,3-Glukanase	6,8	1,2E-03	23,7
22	Solyc03g121600.2.1	Hothead-ähnliches Protein	14,5	4,4E-05	4,9
23	Solyc03g111550.2.1	GDSL Esterase/Lipase	x	x	9,1
24	Solyc04g063230.2.1	Dehydrin	9,4	7,3E-06	5,4
25	Solyc05g053790.1.1	UDP-D-Glukuronate 4-Epimerase 4	7,7	4,0E-05	2,7
26	Solyc11g010460.1.1	Cyclin D2	3,4	8,3E-03	4,6
27	Solyc04g071890.2.1	Peroxidase 4	2,6	1,6E-04	23,2
28	Solyc02g088190.2.1	MYB Transkriptionsfaktor	40,8	6,0E-06	6,4
29	Solyc11g008630.1.1	Hydroxycinnamoyltransferase-ähnliches Protein	33,9	1,7E-06	4,9
30	Solyc09g014350.2.1	Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase 6	15,7	1,0E-04	4,5
31	Solyc10g081490.1.1	MYB Transkriptionsfaktor	40,6	3,0E-06	5,2
32	Solyc03g025320.2.1	Hydroxycinnamoyltransferase	37,9	5,5E-09	12,1
33	Solyc02g089440.2.1	Glykosyltransferase	3,2	3,7E-03	2,5
34	Solyc05g007830.2.1	Expansin 2	3,1	3,2E-02	2,1
35	Solyc05g005080.2.1	Endo-1,4-beta-Glukanase	8,2	9,5E-05	4,5
36	Solyc05g005080.2.1	Endoglukanase	12,6	2,9E-05	3,9
37	Solyc09g091430.2.1	Pektatlyase 1-27	22,1	1,6E-06	7,2
38	Solyc01g104950.2.1	Arabinofuranosidase	6,1	1,2E-03	1,2
39	Solyc01g008530.2.1	Cinnamoyl CoA Reduktase-ähnliches Protein	x	x	3,1
40	Solyc06g076920.2.1	Undekaprenyl-Pyrophosphate-Synthase	-2,8	2,5E-04	-1,5
41	Solyc09g074530.2.1	SWEET Zuckertransporter	-2,7	2,7E-02	-1,9
42	Solyc02g038740.2.1	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Koenzyme A Reduktase	-1,3	3,2E-03	-1,1
43	<i>Solyc04g082200.2.1</i>	<i>Dehydrin</i>	<i>-1,2</i>	<i>2,5E-01</i>	<i>-1,2</i>
44	Solyc08g006310.2.1	Zellulosesynthase-ähnliches Protein	1,9	2,6E-02	-1,3

Neben der Ermittlung von Genen die potentiell an grundlegenden Prozessen der Trichomentwicklung beteiligt sein könnten, liefert die vergleichende Untersuchung der

Ergebnisse

Genexpression in den jungen und reifen Trichomen von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* auch Hinweise auf Gene die für eine der beiden Tomatenlinien spezifisch sein könnten. So zeigen etwa bei *S. lycopersicum* auch fünf Gene keine signifikant unterschiedliche Expression bzw. zwei Gene einen im Vergleich zu *S. habrochaites* gegensätzlichen Trend. Besonders groß sind diese Unterschiede der Expressionsprofile dabei für zwei Methyltransferasen. So weist das Gen einer *O-Methyltransferase* (Solyc10g008120.2.1) eine stark erhöhte Expression in den jungen Trichomen von *S. habrochaites* auf wohingegen bei *S. lycopersicum* kein Expressionsunterschied erkennbar ist. Auf eine andere *Methyltransferase* (Solyc05g014120.1.1) trifft wiederum das Gegenteil zu. Obgleich der Abgleich der Sequenzen der beiden Proteine keine ausgeprägten Homologien zu bereits charakterisierten Genen aus Tomate oder *Arabidopsis* aufzeigt, stellt diese Beobachtung, gemeinsam mit den bereits erfolgten Analysen der Pektinstruktur (siehe 3.2.3.), einen Hinweis auf eine zentrale Rolle des Methylierungsgrades des Pektins bei der Entwicklung der Typ VI Trichome dar.

3.3.5. Einfluss des *knock-down* von *Bli1* auf die Entwicklung der Typ VI

Trichome

Die Untersuchung des Einflusses von *Bli1* auf die Entwicklung der glandulären Typ VI Trichome wurde anhand von *bli1*-RNAi-Pflanzen von *S. lycopersicum* cv. Moneymaker durchgeführt. Die Samen der Mutante und des korrespondierenden Wildtyp wurden dabei freundlicherweise vom Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (MPI Köln) bereitgestellt (Busch *et al.* 2011). Vor der Untersuchung der Typ VI Trichome der RNAi-Linie wurde zunächst der Umfang des Gen-*knock-down* durch qPCR überprüft. Das Expressionslevel des *Bli1*-Gens in den RNAi-Pflanzen beträgt dabei 20,5% des Expressionslevel des Wildtyps. Um herauszufinden, welchen Einfluss der *knock-down* des *Bli1*-Gens auf die Entwicklung der Typ VI Trichome hat, wurde anschließend die Trichomdichte, sowie die Größe und Struktur der Typ VI Trichome der RNAi-Linie und des Wildtyps analysiert. Hierbei zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen den beiden Linien. So haben die RNAi-Linie und der Wildtyp eine nahezu identische Anzahl an Typ VI Trichomen (Daten nicht gezeigt), die in beiden Linien ein völlig identisches Erscheinungsbild (Abbildung 21 A, C) haben. Die Typ VI Trichome gleichen hierbei in Größe und Form den Typ VI Trichomen von *S. lycopersicum* LA4024. Darüber hinaus wurden auch die verschiedenen Entwicklungsstadien der Typ VI Trichome mittels

Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie verglichen (Abb. 21 B, D), jedoch waren auch hierbei keine Unterschiede zwischen den beiden Linien feststellbar.

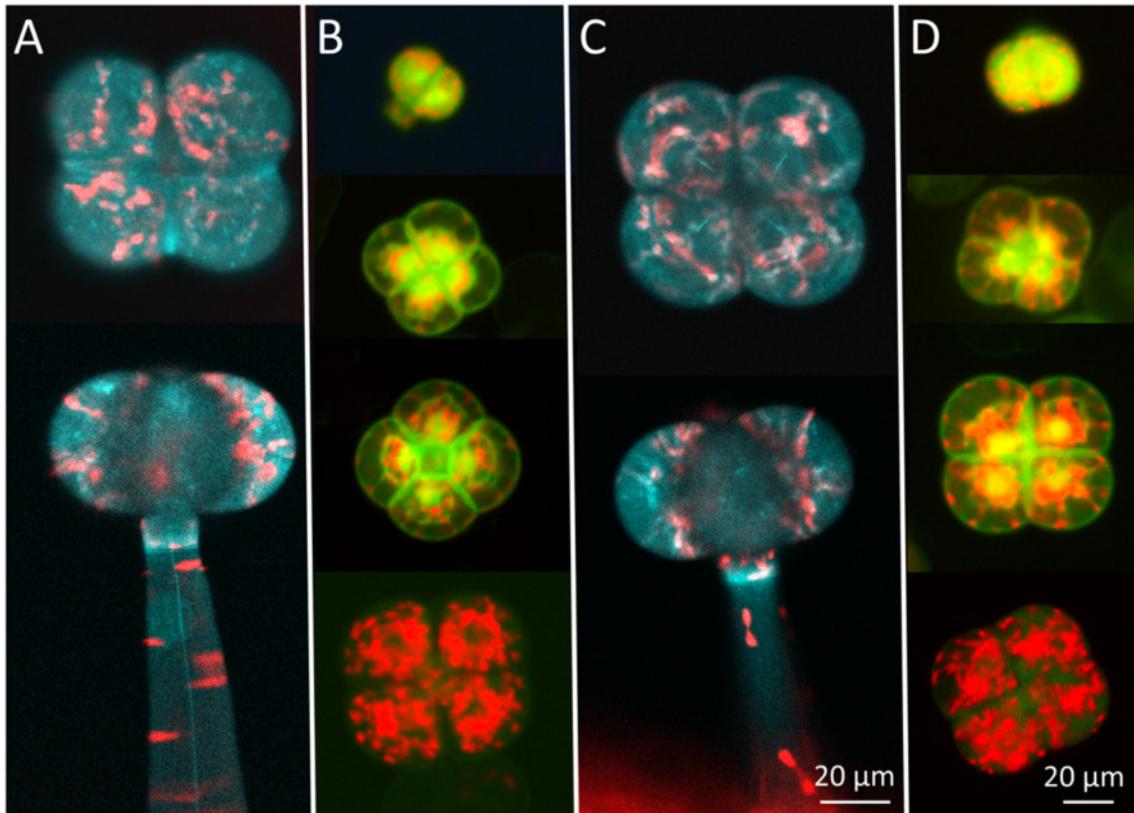


Abbildung 21: Einfluss des knock-downs von *Bli1* auf die Entwicklung der Typ VI Trichome von *S. lycopersicum*: Konfokalmikroskopie von reifen (A, C) und Fluoreszenzmikroskopie von in der Entwicklung befindlichen Typ VI Trichomen (B, D) einer *bli*-RNAi-Linie (A, B) und des korrespondierenden Wildtyps (C, D).

Somit konnte letztendlich kein Einfluss durch die geringere Expression des *Bli1*-Gens auf die Entwicklung der Typ VI Trichome festgestellt werden. Diese Beobachtungen stellen jedoch keinen Nachweis für eine Nichtbeteiligung des Transkriptionsfaktors *Bli1* an der Entwicklung der Typ VI Trichome dar, da das Gen auch in den RNAi-Pflanzen in gewissem Umfang exprimiert ist. So könnte es sein, dass die Restexpression von 20,5% ausreicht, um eine normale Entwicklung der Trichome zu ermöglichen. Aufschluss hierüber könnte etwa der *knock-out* dieses Gens in *S. lycopersicum* liefern.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe von zahlreichen mikroskopischen und biochemischen Techniken, sowie Transkript-, Metabolit- und Zellwandanalysen ein umfassender Einblick in die Struktur und die Entwicklung glandulärer Typ VI Trichome der Wildtomate *Solanum habrochaites* LA1777 und der Kulturtomate *Solanum lycopersicum* LA4024 gewonnen werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Prozess der Trichomentwicklung in beiden Arten zwar ähnlich, aber nicht identisch abläuft und dass diese Unterschiede in der Entwicklung mit der unterschiedlichen Erscheinungsform der Trichome von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* korrelieren. Weiterhin konnte eine Methode für die Ernte und Sortierung von jungen und reifen Typ VI Trichomen für Metabolit- und Transkriptanalysen etabliert werden. Die Entwicklung dieser Methode ermöglichte die vergleichende Untersuchung der Genexpression unterschiedlicher Entwicklungsstadien der Trichome. Die hierbei gewonnenen Einblicke stellen, gemeinsam mit den separat durchgeführten Analysen der Zellwandstrukturen, einen Ausgangspunkt für weitere funktionelle Analysen verschiedener potentiell an der Entwicklung beteiligter Gene dar. Dies wiederum bedeutet einen ersten Schritt in Richtung der Wiedereinführung natürlicher Resistenzen gegen Pflanzenschädlinge in die Kulturformen der Tomate.

4.1. Morphologie der Entwicklung der Typ VI Trichome

4.1.1. Architektur der Typ VI Trichome von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum*

Bereits die ersten Untersuchungen mittels Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie zeigten, dass sich die Form und die Struktur der Typ VI Trichome deutlich zwischen *S. lycopersicum* und *S. habrochaites* unterscheiden, obgleich in beiden Fällen der gleiche Aufbau zugrunde liegt. So bestehen die Typ VI Trichome immer aus einem langen einzelligen Stiel, an dessen Ende sich eine kurze Zwischenzelle anschließt, die die Verbindung zum sekretorischen Köpfchen herstellt. Das Trichomköpfchen ist dabei immer aus vier sekretorischen Kopfzellen aufgebaut, die auf einer Ebene liegen und in deren Mitte sich ein extrazellulärer Hohlraum befindet. Die Form und der Aufbau des sekretorischen Köpfchens unterscheiden sich dabei jedoch grundlegend zwischen den beiden Linien. So hat das Köpfchen der Trichome von *S. habrochaites* eine runde Struktur, während das Trichomköpfchen von *S. lycopersicum* in seiner Form an ein vierblättriges Kleeblatt erinnert.

Des Weiteren unterschieden sich die Trichome von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* stark in Hinblick auf die Größe des extrazellulären Hohlraumes. So nimmt der Hohlraum bei den Trichomen von *S. habrochaites* den Großteil des Gesamtvolumens des Trichomköpfchens ein, während er bei *S. lycopersicum* nur rudimentär vorhanden ist und weniger als 10% des Gesamtvolumens ausmacht. Anfärbungen mit NADI-Reagenz und Nilrot geben Hinweise darauf, dass der Hohlraum als Lagerort für die in den Trichomen produzierten Sekundärstoffe dient. Der stark vergrößerte Hohlraum der Typ VI Trichome von *S. habrochaites* kann somit eine der Ursachen für die verstärkte Akkumulation von Sekundärmetaboliten in den Trichomen der Wildlinien darstellen, die mit der erhöhten Resistenz der Pflanzen gegen Pflanzenschädlinge einhergeht (Channarayappa *et al.* 1992). Der Aufbau und die Funktionsweise der Typ VI Trichome der Tomate erinnern dabei stark an die peltaten Trichome der Lippenblütler, wie der der Pfefferminze (Abbildung 22 A; Turner *et al.* 2000b). So bestehen auch die peltaten Trichome aus einer Stielzelle, mehreren sekretorischen Zellen und einem sekretorischen Raum. Im Gegensatz zu den Typ VI Trichomen der Tomate besitzen die peltaten Trichome der Pfefferminze jedoch nur einen kurzen, einzelligen Stiel, an dessen Ende sich acht anstatt von vier sekretorischen Zellen befinden. Die peltaten Trichome des Basilikums besitzen dagegen auch vier sekretorische Zellen (Ioannidis *et al.* 2002), wie die Typ VI Trichome der Tomaten. Ein weiterer auffälliger Unterschied ist, dass sich der sekretorische Hohlraum der Typ VI Trichome zwischen den sekretorischen Zellen befindet, wohingegen für die peltaten Trichome der Lippenblütler die Ausbildung eines subkutikulären Hohlraumes typisch ist (Amelunxen 1965). Die Ausbildung solcher extrazellulären Hohlräume für die Lagerung von Sekundärmetaboliten ist für Trichome ungewöhnlich und wurde bisher nur für die Zwischenwanddrüsen des Rhododendrons beschrieben (Abbildung 22 B; Kratzmann 1910).

Trotz dieser Unterschiede gibt es viele Gemeinsamkeiten zwischen den Typ VI Trichomen der Tomaten und den peltaten Trichomen der Lippenblütler, wie den unveränderlichen Aufbau, der die Trichome zu einem interessanten Ziel für die Erforschung von pflanzlichen Entwicklungsprozessen macht.

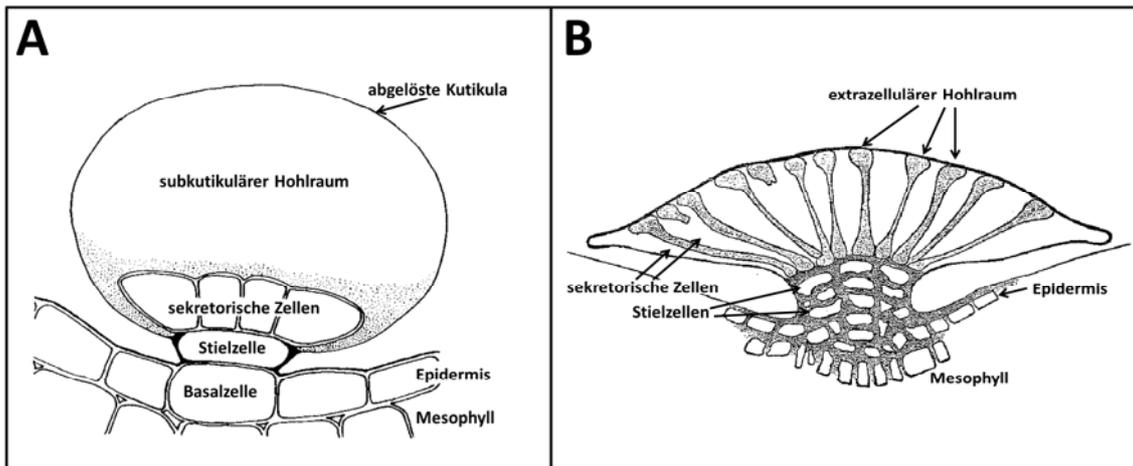


Abbildung 22: Unterschiedlicher Aufbau pflanzlicher Drüsen: Schematischer Aufbau eines peltaten Trichoms der Pfefferminze nach Turner *et al.* 2000b (A) und einer Zwischenwanddrüse des Rhododendrons nach Kratzmann 1910 (B).

4.1.2. Entwicklungsstadien der Typ VI Trichome

Nach der ersten mikroskopischen Charakterisierung der reifen Typ VI Trichome sollte weiterführend durch Hellfeld-, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie von jungen Blättern und isolierten Trichomen ein Überblick über die Entwicklungsstadien der Typ VI Trichome von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* gewonnen werden. Hierbei zeigte sich, dass der Entwicklungsprozess der Typ VI Trichome bei den beiden untersuchten Tomatenlinien ähnlich abläuft und starke Ähnlichkeiten zu der Entwicklung der glandulären Trichome anderer *Solanales* und der *Lamiales* (Unzelman und Healey 1974; Dell und McComb 1977; Turner *et al.* 2000a) aufweist.

Die Entwicklung der Trichome beginnt dabei in beiden Fällen mit der Ausstülpung einer einzelnen Zelle aus der Epidermis. Im Anschluss an diesen ersten Entwicklungsschritt finden mehrere perikline Zellteilungen statt. Hierdurch bildet sich der für die Typ VI Trichome charakteristische Aufbau aus Stielzelle, Zwischenzelle und dem Vorläufer des glandulären Köpfchens heraus, wobei die Ausbildung einer langgestreckten Stielzelle ein deutliches Unterscheidungsmerkmal zu den kurzstieligen glandulären Trichomen der *Solanales* und der *Lamiales* darstellt. Nach der Ausbildung der Grundstruktur der Typ VI Trichome erfolgen weitere antikline Zellteilungen der Vorläuferzelle des glandulären Köpfchens, so dass ein vierzelliges Trichomköpfchen entsteht. Die Entwicklungsprozesse, die bis zu diesem Zeitpunkt ablaufen, können in Anlehnung an die Entwicklungsstadien der peltaten Trichome der Pfefferminze (Turner *et al.* 2000a) als präsekretorische Phase zusammengefasst werden. Bis zu diesem Entwicklungsstadium sind die glandulären Zellen

durch eine Vielzahl von Organellen, große intakte Zellkerne sowie eine Vielzahl an kleinen Vakuolen und Vesikeln gekennzeichnet, die für die Bildung der hohen Mengen der in den Trichomen produzierten Sekundärmetabolite essentiell sein dürften.

Während der nun folgenden sekretorischen Phase der Trichomentwicklung beginnt die Entstehung eines extrazellulären Hohlraumes im Inneren des Trichomköpfchens, der der Lagerung der in den Trichomen produzierten Sekundärmetabolite dient (siehe 4.1.1.). Die Entstehung des extrazellulären Hohlraumes, die durch die Auflösung der inneren Zellwände erfolgt, stellt dabei eine Besonderheit der Typ VI Trichome der Tomaten dar und unterscheidet diese grundlegend von den Trichomen anderer *Solanales* und der *Lamiales*. Eine weitere Besonderheit der Typ VI Trichome stellt zudem die starke gelbgrüne Autofluoreszenz der jungen Trichome dar, die erst kurz vor der Entstehung des sekretorischen Hohlraumes verschwindet (siehe 4.1.3.). Mit der Vollendung der Ausbildung des sekretorischen Hohlraumes, treten die Trichome schließlich in das letzte Entwicklungsstadium, die postsekretorische Phase, ein. In diesem Entwicklungsstadium sind die glandulären Zellen durch eine deutliche Degradation der Organellen und Zellkerne, sowie durch eine hohe Dichte an Vakuolen gekennzeichnet und scheinen nun lediglich der Lagerung der in ihrem Inneren gespeicherten Metabolite, bis zu deren Freisetzung, zu dienen (siehe 4.1.4.).

Obleich dieser grundlegende Prozess der Trichomentwicklung bei *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* gleich abläuft, gibt es doch einige Unterschiede zwischen den beiden Linien. So nimmt zum einen die Bildung des sekretorischen Hohlraumes in den Trichomen von *S. habrochaites* einen wesentlich größeren Umfang als bei *S. lycopersicum* ein (siehe 4.1.1.). Zum anderen behalten die Köpfchen der Typ VI Trichome von *S. habrochaites* über alle Entwicklungsstadien hinweg ihre runde Form. Bei den Typ VI Trichomen von *S. lycopersicum* dagegen verändert sich die runde Form des Trichomköpfchens mit dem Erreichen des vierzelligen Stadiums hin zu einer kleeblattartigen Struktur. Die Herausbildung der runden Struktur der Typ VI Trichome von *S. habrochaites* könnte dabei im Zusammenhang mit der verstärkten Speicherung von Sekundärmetaboliten stehen. So könnte durch die massive Einlagerung von Sekundärmetaboliten im Inneren der Trichome von *S. habrochaites* ein Druck entstehen, der die Ausbildung der runden Struktur bedingt (siehe 4.1.4.). Die in den Trichomen von *S. lycopersicum* stark verringerte Akkumulation von Sekundärstoffen könnte dabei eine Verringerung dieses Drucks zur Folge haben, was letztendlich zu der veränderten Form der Trichome führen könnte. Ob die unterschiedliche Form der Trichome jedoch wirklich im Zusammenhang mit der Menge der gelagerten Sekundärmetabolite steht, oder einen anderen Ursprung hat, kann letzten Endes nur durch

Diskussion

weiterführende Experimente, wie etwa des *knock-downs* des Terpenstoffwechsels in den Trichomen von *S. habrochaites*, untersucht werden.

4.1.3. Gelb-grüne Autofluoreszenz der jungen Trichome

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der sich entwickelnden Trichome zeigten, dass die jungen Trichome der beiden untersuchten Tomatenlinien eine starke gelb-grüne Autofluoreszenz aufweisen. Diese Autofluoreszenz verschwindet erst, sobald das vierzellige Trichomköpfchen zur finalen Größe wächst und die Bildung des sekretorischen Hohlraumes beginnt. Weitere Analysen zeigten, dass die fluoreszierende Substanz im Inneren der glandulären Zellen lokalisiert ist und nur durch die Behandlung mit konzentrierter Natronlauge bei hoher Temperatur extrahiert bzw. zerstört werden kann.

Auffällige fluoreszierende Verbindungen konnten bereits bei den Trichomen von anderen Pflanzenarten wie *Arabidopsis*, *Chenopodium* und *Aldama* beobachtet werden. So konnte etwa in den Trichomen von *A. thaliana* die Akkumulation von Derivaten der Sinapinsäure beobachtet werden (Abb. 23 A), die eine starke Autofluoreszenz der Trichome zur Folge hat (Sinlapadech *et al.* 2007). Da die Fluoreszenz der Sinapinsäure jedoch eher im blau-grünen Bereich liegt (Smyk 2003), ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei der fluoreszierenden Verbindung in den Typ VI Trichomen der Tomaten auch um ein Derivat der Sinapinsäure handelt. Weiterhin konnte auch bei den Trichomen von *Chenopodium album* und *Aldama discolor* eine Einlagerung von fluoreszierenden Substanzen in den Trichomen beobachtet werden (Abb. 23 B, C). In diesem Fall liegt jedoch die Vermutung nahe, dass die fluoreszierenden Substanzen aus der Klasse der Flavonoide stammen (Roshchina 2014; Bombo *et al.* 2016).

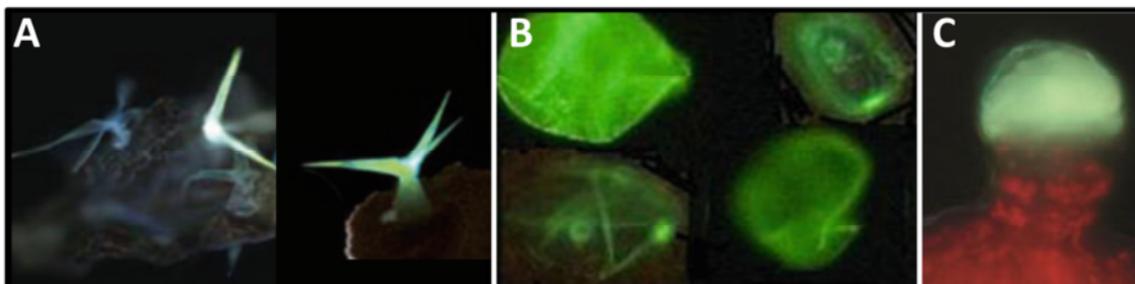


Abbildung 23: Autofluoreszenz bei Trichomen: Blau-grüne Autofluoreszenz von nicht-glandulären *A. thaliana* Trichomen modifiziert nach Sinlapadech *et al.* 2007 (A). Gelb-grüne Autofluoreszenz von *C. album* (B) und *A. discolor* Trichomen (C) modifiziert nach Roshchina *et al.* 2014 (B) und Bombo *et al.* 2016 (C).

Aufgrund der starken Produktion und Akkumulation von Flavonoiden, die oft in den glandulären Trichomen der Tomaten stattfindet (McDowell *et al.* 2011; Nakashima *et al.* 2016), sowie der Anregungs- und Emissionswellenlänge der fluoreszierenden Substanz lag zunächst die Vermutung nahe, dass es sich bei der fluoreszierenden Substanz in den Typ VI Trichomen der Tomate auch um ein Flavonoid handeln könnte. Flavonoide können eine starke Fluoreszenz im gelb-grünen Wellenlängenbereich aufweisen, wenn sie eine Methylierung (Jurd und Horowitz 1957; Harborne 1962) oder eine Glykosylierung (Harborne 1967; Daimon *et al.* 2010) an der 5'-Position besitzen.

Aufgrund dieser Vermutung wurden die Typ VI Trichome verschiedener Flavonoid-Mutantenlinien untersucht. Hierbei zeigte sich, dass das Ausschalten der Chalconisomerase, die einen Zwischenschritt bei der Bildung des Flavonoidvorläufers Naringenin katalysiert, eine gestörte Entwicklung der Typ VI Trichome zur Folge hat (Kang *et al.* 2014). So ist in der Mutante, neben einer verringerten Akkumulation von Flavonoiden, auch eine veränderte Verteilung der fluoreszierenden Substanz erkennbar, die mit einer geringeren Größe der reifen Typ VI Trichome und der Abwesenheit eines sekretorischen Hohlraumes einhergeht (Schema Abbildung 25). Die fluoreszierende Substanz akkumuliert dabei in kleinen Vesikeln innerhalb der Zellen und bleibt im Unterschied zum Wildtyp auch in den reifen Trichomen erhalten. Massenspektrometrische Analysen der fluoreszierenden Substanz, die sich mit Hilfe organischer Lösungsmittel leicht aus den Vesikeln der Trichome der Mutantenlinie extrahieren lässt, weisen jedoch darauf hin, dass es sich dabei nicht um ein Flavonoid-Derivat, sondern um Riboflavin handelt.

Diese Beobachtung wirft wiederum die Frage auf, in welcher Form die fluoreszierende Substanz in den Trichomen der beiden Wildtypen vorkommt und welche Rolle sie bei der Entwicklung der Typ VI Trichome spielt. Da es sich bei der fluoreszierenden Substanz in den Vesikeln der Trichome der Mutantenlinie um Riboflavin zu handeln scheint, liegt die Vermutung nahe, dass es sich auch bei der fluoreszierenden Substanz in den Trichomen von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* um ein Derivat des Riboflavins handelt. Riboflavin ist ein Vorläufer der essentiellen Kofaktoren FMN und FAD, die für die Katalyse einer Vielzahl verschiedener Redoxprozesse benötigt werden (Joosten und van Berkel 2007; Macheroux *et al.* 2011). Die Kofaktoren FMN und FAD liegen dabei zumeist in Form von Flavoproteinen vor, an die sie nicht-kovalent oder kovalent gebunden sein können. Obgleich FMN und FAD nahezu identische Fluoreszenzparameter wie Riboflavin haben, kann die Bindung der Kofaktoren an Proteine in Abhängigkeit der jeweiligen Proteinstruktur zu einer starken Quenchung der Fluoreszenz führen (Mataga *et al.* 2000).

Diskussion

Jedoch können auch Flavoproteine eine starke Fluoreszenz im gelb-grünen Bereich aufweisen, die sich im oxidierten Zustand verstärkt und daher auch zur Visualisierung des Redoxpotentials von Zellen genutzt werden kann (Hall und Kamin 1975; Romashko *et al.* 1998). Flavoproteine können an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt sein. So nehmen sie essentielle Rollen im Primär- und Sekundärstoffwechsel, wie etwa im Zitronensäurezyklus, bei der Produktion anderer essentieller Kofaktoren, bei Entwicklungsprozessen, oder bei der Produktion von Sekundärmetaboliten und Phytohormonen ein (Joosten und van Berkel 2007; Macheroux *et al.* 2011; Zhao 2014).

Bei der fluoreszierenden Substanz in den jungen Typ VI Trichomen von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* könnte es sich daher ebenfalls um ein Flavoprotein handeln, an das FMN oder FAD als Kofaktor gebunden ist. Die vergleichende Betrachtung der Genexpression in den jungen und reifen Typ VI Trichomen zeigte (siehe 4.3.2.), dass die Gene zweier putativer Flavoproteine eine stark erhöhte Expression in den jungen Trichomen aufweisen. Die beiden Proteine, die starke Sequenzähnlichkeiten zu den FAD-bindenden Redoxenzymen Hothead und Yucca aus *Arabidopsis* zeigen, nehmen wichtige Rollen in der Kutin- bzw. Auxin-Biosynthese ein (Krolikowsk *et al.* 2003; Kurdyukov *et al.* 2006; Dai *et al.* 2013; Zhao 2014). Interessanterweise konnte bereits beobachtet werden, dass Yucca-Proteine eine starke Autofluoreszenz im grünlichem Bereich besitzen (Ishida *et al.* 2016). Aufgrund dieser Tatsache und der hohen Expression eines Auxin-Reporterkonstruktes in den Typ VI Trichomen von Tomate (Ichihashi *et al.* 2014), die auf eine hohe Aktivität der Auxin-Biosynthese in den Trichomen schließen lässt, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei der fluoreszierenden Substanz in den jungen Trichomen um ein Yucca-Protein handeln könnte.

Diese Vermutung wiederum wirft eine Reihe neuer Fragen auf. So stellt sich die Frage, weshalb die Störung der Produktion von Flavonoiden in der Mutante zu einer Akkumulation von Riboflavin in kleinen Vesikeln führen sollte. Dass das Ausschalten der Chalconisomerase nicht nur zu einer massiven Störung der Biosynthese und Akkumulation von Flavonoiden führt, sondern auch einen Einfluss auf andere Stoffwechselwege hat, wurde bereits bei der ersten Charakterisierung der Mutantenlinie LA1049 festgestellt (Kang *et al.* 2014). So stellte sich heraus, dass in der Mutante auch die Akkumulation von Terpenen stark reduziert ist, was zu einer erhöhten Sensitivität der Pflanzen gegenüber von verschiedenen Schädlingen beiträgt. Für diese erstaunliche Kopplung zwischen Flavonoid- und Terpenmetabolismus gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. So wurde bereits gezeigt, dass Flavonoide einen Einfluss auf die Regulation verschiedener Stoffwechselwege haben können (Peer und Murphy 2007; Ringli *et al.* 2008; Pourcel *et al.*

2013). In den Typ VI Trichomen der Wildtypen könnte somit ein Intermediat oder ein Endprodukt des Flavonoidstoffwechsels die Expression bestimmter Gene des Terpenstoffwechsels regulieren. Die Abwesenheit des entsprechenden Metaboliten würde in der Mutante so zu einer gestörten Regulation des Terpenstoffwechsels führen, die letztendlich eine verringerte Akkumulation von Terpenen zur Folge haben könnte (Kang *et al.* 2014). Es könnte jedoch auch der umgekehrte Fall vorliegen. So könnte die Akkumulation eines Flavonoid-Intermediates wie etwa des Naringenin-chalcons in der Mutante einen negativen Einfluss auf den Terpenstoffwechsel haben. Ein ähnliches Phänomen konnte bereits in einer *Arabidopsis*-Mutantenlinie beobachtet werden, bei der die Akkumulation von MeCPP, eines Intermediates des MEP Stoffwechsels, einen direkten Einfluss auf die Bildung von Salizylsäure hat (Xiao *et al.* 2012). In Anlehnung an diese Beobachtungen könnte auch die Akkumulation von Riboflavin in den kleinen Vesikeln bei der Mutante direkt oder indirekt durch die Akkumulation eines Intermediates oder die Abwesenheit eines Endproduktes des Flavonoidstoffwechsels bedingt werden. Die Kompartimentierung des Riboflavins in Vesikeln könnte dabei, ähnlich wie die Bindung an riboflavinbindende Enzyme (Grininger *et al.* 2009), dem Schutz der Zelle vor unerwünschten Nebenreaktionen des freien Riboflavins dienen.

Für die weitere Untersuchung dieser Hypothesen müsste zunächst eine geeignete Methode für die Extraktion und die Analyse der fluoreszierenden Substanz aus den Trichomen von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* etabliert werden. Da die fluoreszierende Substanz bei den beiden Wildtypen ausschließlich in den jungen Trichomen vorzufinden ist, welche wiederum nur in sehr geringen Mengen geerntet werden können, müsste die hierfür verwendete Analyse-methode eine sehr hohe Sensitivität und Reproduzierbarkeit aufweisen. Des Weiteren könnte durch vergleichende Analysen der Auxingehalte in den jungen und reifen Trichomen sowie Fluoreszenzanalysen des putativen Yucca-Proteins der Frage nachgegangen werden, ob es sich bei der fluoreszierenden Substanz tatsächlich um ein Yucca-Protein handeln kann.

4.1.4. Ausbildung einer Sollbruchstelle für die Freisetzung der Sekundärmetabolite

Bei der Ernte der Typ VI Trichome mit der Glaskugelmethode (Gershenzon *et al.* 1992, Schillmiller *et al.* 2010) fiel auf, dass die Typ VI Trichome immer an der gleichen Stelle abbrechen. So bleibt der Stiel der Trichome, inklusive der Zwischenzelle, am Blatt zurück,

Diskussion

während das vierzellige glanduläre Köpfchen abbricht. Die Verbindung zwischen der Zwischenzelle und dem Trichomköpfchen stellt somit eine Sollbruchstelle dar.

Bei den Trichomen von *S. habrochaites* führt das Abbrechen der Verbindung zwischen Zwischenzelle und dem Trichomköpfchen dabei zum Zusammenbruch der kugelförmigen Struktur des Köpfchens. So sind die geernteten Trichomköpfchen durch eine deutlich flachere Form gekennzeichnet und weisen zudem einen verkleinerten sekretorischen Hohlraum auf, der durch eine wellenartige Struktur der inneren Zellwände gekennzeichnet ist. Aufgrund dieser Beobachtungen lässt sich vermuten, dass die Akkumulation der großen Mengen an Sekundärmetaboliten im Inneren des sekretorischen Hohlraumes zum Aufbau eines erhöhten Drucks führt, durch den die runde Struktur des Trichomköpfchens zustande kommt und auch aufrecht erhalten wird. Sobald das Trichom berührt wird, bricht das Köpfchen an der bereits erwähnten Sollbruchstelle ab. Der erhöhte Druck im Inneren des sekretorischen Hohlraumes führt dabei zu einer sofortigen Freisetzung der gespeicherten Sekundärmetabolite, was wiederum zum Kollabieren der kugelförmigen Struktur des Trichomköpfchens führt. Die Zwischenzelle funktioniert hierbei als eine Art „Stöpsel“, der den einzigen Ausgang des sekretorischen Hohlraumes verschließt, bis er durch Berührung des Trichomköpfchens herausgezogen wird, wodurch ein schlagartiges/rapides Austreten der Sekundärmetabolite ermöglicht wird.

Auch bei den Typ VI Trichomen von *S. lycopersicum* ist diese Sollbruchstelle vorhanden. Im Gegensatz zu den Trichomköpfchen von *S. habrochaites*, besitzen die Trichome von *S. lycopersicum* jedoch bereits vor dem Abbrechen eine flache Form, die auch nach der Ernte der Trichomköpfchen bestehen bleibt. Die andersartige Form des Trichomköpfchens könnte dabei auf den stark verkleinerten sekretorischen Hohlraum und die dadurch verringerte Lagerungskapazität für Sekundärmetabolite zurückzuführen sein. So könnte die verringerte Akkumulation von Sekundärmetaboliten im Inneren des Trichomköpfchens zu einem verminderten Innendruck führen, der die Ausbildung der flacheren Form des Trichomköpfchens zur Folge hat. Im Gegensatz zu den Trichomen von *S. habrochaites* scheint die Sollbruchstelle bei den Trichomen von *S. lycopersicum* damit keine essentielle Funktion einzunehmen.

Bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten weitere Einblicke in die Struktur der Sollbruchstelle der Typ VI Trichome von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* gewonnen werden. Dabei zeigte sich eine deutliche Grenze zwischen der dünneren Zellwand der Zwischenzelle und der dickeren Zellwand der sekretorischen Zellen. Weiterhin konnte bei den Trichomen beider Tomatenlinien am äußeren Ende dieses Überganges zwischen den beiden Zellen ein aufgelagerter Ring von Zellwandmaterial

beobachtet werden. Diese Auflagerung von Zellwandmaterial findet bei den Trichomen von *S. habrochaites* in einem größeren Umfang als bei den Trichomen von *S. lycopersicum* statt. Die genaue Funktion dieser Auflagerungen bleibt vorerst unklar, jedoch deutet die Lokalisation des aufgelagerten Materials auf eine Funktion bei der Stabilisierung der Sollbruchstelle hin. Ähnliche Strukturen konnten bereits bei *A. thaliana* im Bereich von Abszissionszonen beobachtet werden. Die Überexpression, eines bei der Abszission beteiligten Proteines, führt in diesem Fall zu einer verstärkten Akkumulation von Arabinogalaktanproteinen (AGP) im Bereich der Abszissionszonen (Stenvik *et al.* 2006), die eine starke Ähnlichkeit zu den Auflagerungen an der Sollbruchstelle der Typ VI Trichome aufweist. Interessanterweise deuten Immunolabellingexperimente der Trichome von *S. habrochaites* (siehe 4.2.1.) darauf hin, dass auch im Bereich der Sollbruchstelle der Typ VI Trichome eine Akkumulation von Arabinanen bzw. AGPs stattfindet. Des Weiteren konnte bei den Trichomen von *S. habrochaites* eine starke Einlagerung von nicht identifizierbarem Material am oberen Ende der Zwischenzelle beobachtet werden, die bei den Trichomen von *S. lycopersicum* nicht stattfindet. Der Grund dieser Unterschiede in der Struktur der Sollbruchstelle von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* kann allein anhand der durchgeführten Experimente nicht zweifelsfrei festgestellt werden. Die verstärkte Ein- und Auflagerung von Material im Bereich der Sollbruchstelle der Trichome von *S. habrochaites* deutet jedoch auf eine Funktion bei der Stabilisierung der Sollbruchstelle hin, durch die eine vorzeitige Freisetzung der gelagerten Sekundärmetabolite verhindert wird. Durch die geringe Akkumulation von Sekundärmetaboliten in den Trichomen von *S. lycopersicum* könnte diese Stabilisierung überflüssig sein, weshalb in diesem Fall eine verringerte Ein- und Auflagerung von Material zu beobachten ist.

Die schnelle Freisetzung der gespeicherten Sekundärmetabolite durch leichte Berührung des Trichomköpfchens stellt bei *S. habrochaites* somit einen wichtigen Teil der Anpassung gegen verschiedene Pflanzenschädlinge dar. Die genauere Untersuchung des Entwicklungsprozesses der Sollbruchstelle könnte daher eine wichtige Rolle bei der Wiedereinführung der natürlichen Resistenzen in unsere kultivierten Tomatenlinien spielen.

4.2. Analyse der Zellwandstruktur

4.2.1. Immunmarkierung verschiedener Pektin-Epitope

Durch die durchgeführten Immunmarkierungsexperimente konnte ein erster Einblick in die Entwicklung der Zellwände der Typ VI Trichome von *S. habrochaites* gewonnen werden. Markierungen mit den Antikörpern JIM7 und LM19 zeigten dabei, dass sich die Struktur der inneren Zellwand im Laufe der Trichomentwicklung verändert. So sind bei den inneren Zellwänden der jungen Trichome methylierte Pektine vorzufinden, die jedoch mit dem Beginn der Entstehung des sekretorischen Hohlraumes verschwinden. Demethylierte Pektine sind dagegen in jedem Stadium der Trichomentwicklung zu beobachten. Somit lässt sich vermuten, dass die Demethylierung der Pektine der inneren Zellwände eine wichtige Rolle bei der Entstehung des sekretorischen Hohlraumes spielt (Schema Abbildung 24). Dass der Methylierungsstatus eine wichtige Rolle bei der Remodellierung pflanzlicher Zellwände einnehmen kann, ist bereits bekannt. So konnte etwa für *A. thaliana* gezeigt werden, dass die Demethylierung des Pektins einen entscheidenden Schritt bei der Reifung der Pollen einnimmt (Francis *et al.* 2006). Ob dies auch auf die Entwicklung des sekretorischen Hohlraumes zutrifft, kann jedoch allein anhand der bisherigen Daten nicht mit Sicherheit gesagt werden. Weitere Experimente könnten hierüber Aufschluss geben und zugleich der Frage nachgehen, ob eine fehlende oder verringerte Demethylierung der inneren Zellwände bei den Trichomen von *S. lycopersicum* einen Grund für die unvollständige Entwicklung des Hohlraumes darstellt.

Markierungen mit den Antikörpern LM13 und LM6 zeigten weiterhin, dass auch die Bildung von Arabinanen und AGPs einen spezifischen Prozess bei der Reifung der Typ VI Trichome darstellt. Bei Immunmarkierungen der Abszissionszonen von *S. lycopersicum* konnte bereits gezeigt werden, dass unmittelbar vor der Abszission der Blüten eine verstärkte Akkumulation von Arabinanen im Bereich der Abszissionszone stattfindet (Tsuchiya *et al.* 2015). Auch bei den Typ VI Trichomen von *S. habrochaites* wäre daher eine Korrelation zwischen der Entstehung der Sollbruchstelle bzw. der Auflösung der inneren Zellwand und der Bildung von Arabinanen und AGPs (siehe auch 4.1.4.) im Bereich der betreffenden Zellwände denkbar. Ob diese Zellwandbestandteile letztendlich in die Entstehung der Sollbruchstelle involviert sind, kann jedoch nur durch weiterführende Experimente überprüft werden (siehe 5.).

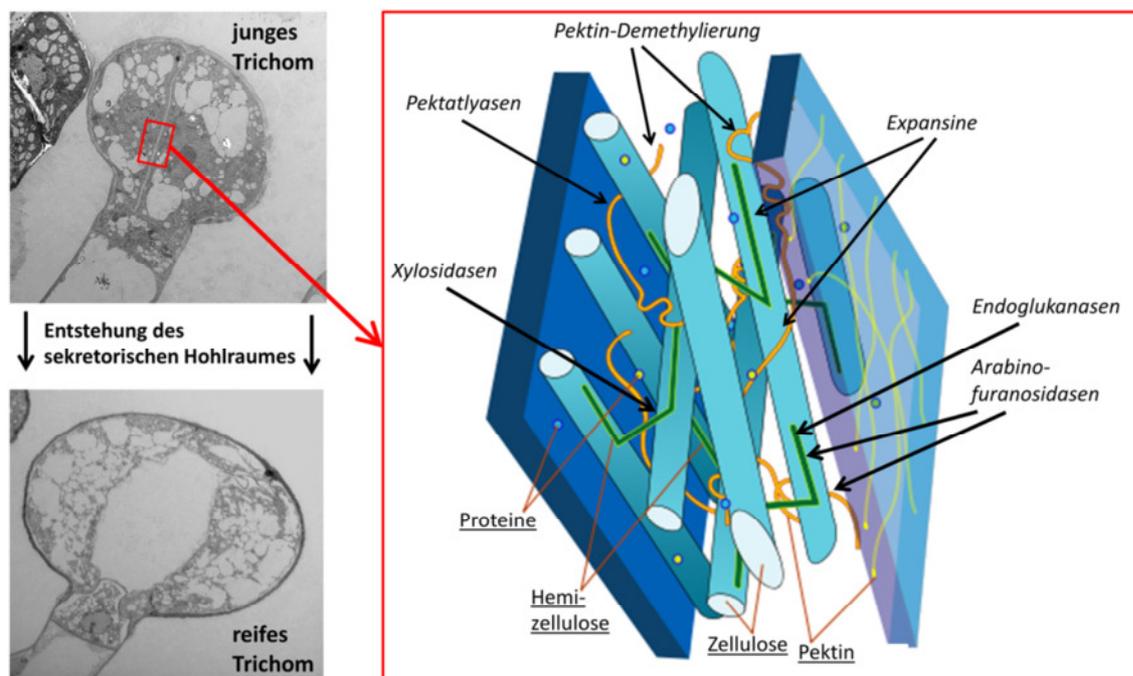


Abbildung 24: Entstehung des sekretorischen Hohlraumes: Schematische Darstellung der Herausbildung des Hohlraumes der Typ VI Trichome von *S. habrochaites* durch den enzymatischen Abbau (*kursiv*) verschiedener Zellwandpolymere (unterstrichen). Quelle Zellwandschema: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/87/Plant_cell_wall_diagram-en.svg/2000px-Plant_cell_wall_diagram-en.svg.png

4.2.2. Vergleichende Analyse der Pektinstruktur der Trichome von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum*

Nachdem durch die durchgeführten Immunmarkierungsexperimente ein erster Einblick in die Pektinstruktur der Zellwände der sich entwickelnden Typ VI Trichome von *S. habrochaites* gewonnen werden konnte, wurde mit Hilfe massenspektrometrischer Analysen die Zusammensetzung des Pektins von reifen *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* Trichomen miteinander verglichen. Hierbei sollte insbesondere ein Einblick über den Methylierungsstatus der inneren Zellwände gewonnen werden, der an der Entstehung des sekretorischen Hohlraumes beteiligt sein könnte (siehe 4.2.1.).

Bei den durchgeführten massenspektrometrischen Analysen zeigte sich für die Gehalte der analysierten unmodifizierten und modifizierten Oligomere des Homogalakturonans und des Rhamnogalakturonans I ein unterschiedliches Bild. So konnten bei der Betrachtung der Gehalte einer Vielzahl von unmodifizierten Pektinoligomeren keine bzw. nur geringfügige Unterschiede zwischen den Typ VI Trichomen der beiden untersuchten Tomatenlinien beobachtet werden. Die Gehalte der meisten methylierten und acetylierten Oligomere waren dagegen in den Trichomen von *S. habrochaites* signifikant erhöht.

Diskussion

Die erhöhten Gehalte von modifizierten Pektinen bei annähernd gleichen Gehalten an unmodifizierten Pektinen lassen dabei auf eine verstärkte Modifizierung der Pektine in den Zellwänden der Typ VI Trichome bei *S. habrochaites*, insbesondere durch Acetylierung, schließen. Durch diese Beobachtung kann die anhand der Ergebnisse der Immunmarkierungsexperimente aufgestellte Vermutung, dass die Demethylierung des Pektins der inneren Zellwand für die Entstehung des sekretorischen Hohlraumes wichtig ist, nicht unterstützt werden. So weisen die geringeren Gehalte der methylierten Oligomere des Homogalakturonans bei den Trichomen von *S. lycopersicum* nicht auf eine Verringerung der Demethylierung hin, die zur Bildung eines verkleinerten Hohlraumes führen könnte. Da die massenspektrometrischen Untersuchungen jedoch an dem Zellwandmaterial von ganzen Trichomköpfchen durchgeführt wurden, sind die beobachteten Gehalte der Pektinoligomere als eine Mischung aus den äußeren Zellwänden und den inneren Zellwänden zu betrachten, weshalb aus den erhaltenen Daten nur sehr bedingt auf den Methylierungsstatus der inneren Zellwand geschlossen werden kann.

So könnte es etwa sein, dass die Pektine der äußeren Zellwand bei *S. habrochaites* ein gegenüber *S. lycopersicum* verstärktes Maß an Methylierung und Acetylierung aufweisen. Diese verstärkte Modifizierung des Pektins bei *S. habrochaites* könnte dabei für eine erhöhte Flexibilität der Zellwände verantwortlich sein (Goldberg *et al.* 1986; Zhao *et al.* 2008; Orfila *et al.* 2012), die wiederum für die schnelle Freisetzung der im Inneren gespeicherten Sekundärmetabolite durch das Kollabieren der kugelförmigen Struktur des Trichomköpfchens benötigt wird (siehe 4.1.4.). Bei den Pektinen der inneren Zellwände könnte hingegen der entgegengesetzte Trend bzw. kein Unterschied im Hinblick auf die Modifizierung vorliegen, was aufgrund des geringen Massenanteils der inneren Zellwände an der Gesamtheit der Zellwandfraktion jedoch nicht detektiert werden konnte.

Um Aufschluss hierüber zu erhalten, müsste eine getrennte Analyse der Pektinstruktur der inneren und äußeren Zellwände durchgeführt werden, wofür jedoch zunächst eine geeignete Methode zur Trennung der Zellwände etabliert werden müsste.

4.3. Analyse von Metabolismus und Genexpression der sich-entwickelnden Trichome

4.3.1. Etablierung einer Methode für die Ernte von jungen und reifen Typ VI Trichomen

Für die weitere Untersuchung der Entwicklung der Typ VI Trichome auf Metabolom- und Transkriptomenebene wurde eine geeignete Methode für die Ernte und die Sortierung von

jungen und reifen Trichomen entwickelt. Eine Basis hierfür stellte die Trichomernte mit Hilfe von Glaskugeln dar (Gershenzon *et al.* 1992), durch die gleichzeitig junge und reife Typ VI Trichome isoliert werden konnten. Für die Trennung der Trichome in frühe und späte Entwicklungsstadien wurde eine neue Methode, basierend auf Sieben, Dichtegradientenzentrifugation und Durchflusszytometrie etabliert. Durch die Kombination dieser drei unterschiedlichen Trennverfahren konnten schlussendlich nahezu 100% reine Fraktionen von jungen und reifen Typ VI Trichomen gewonnen werden. Leider konnten jedoch aus Zeitgründen nur einige erste Untersuchungen mit den so erhaltenen Trichomfraktionen durchgeführt werden. Hierbei konnte jedoch gezeigt werden, dass die sortierten Trichome sowohl für die Analyse der Sekundärmetabolitgehalte, als auch für die Analyse der Genexpression eingesetzt werden können.

Die Analyse der Sekundärmetabolitgehalte der sortierten Trichome mittels LC-MS zeigte dabei, dass in den jungen Typ VI Trichomen von *S. habrochaites* eine erhöhte Akkumulation von verschiedenen Flavonoid-Konjugaten, wie methylierten Formen des Myricetins und Quercetins stattfindet. Interessanterweise konnte bei *A. thaliana* bereits gezeigt werden, dass die Zusammensetzung und die Menge der gebildeten Flavonoid-Derivate einen Einfluss auf die Entwicklung der Trichome zu haben scheint (Ringli *et al.* 2008; Kuhn *et al.* 2016). Da eine Störung im Flavonoidmetabolismus auch einen Einfluss auf die Entwicklung der Typ VI Trichome von *S. lycopersicum* hat (siehe 4.1.3.) weisen die erhöhten Gehalte verschiedener Flavonoid-Derivate in den jungen Trichomen damit darauf hin, dass die Akkumulation von bestimmten Flavonoid-Derivaten eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Typ VI Trichome der Tomate einnehmen könnte (Schema Abbildung 25).

Obgleich die Analyse von Sekundärmetaboliten zeigt, dass die sortierten Trichome für metabolische Analysen verwendet werden können, bleibt bisher jedoch ungewiss inwieweit die sortierten Trichome auch für die Analysen von Metaboliten anderer Stoffklassen verwendbar sind. Besonders Primärmetabolite haben oft sehr geringe Halbwertszeiten (Stitt *et al.* 1980; Tredwell *et al.* 2011). Für die Bestimmung der Gehalte dieser Metabolite muss daher ein direktes *Quenching*, etwa durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff, erfolgen, was jedoch nicht mit der etablierten Sortiermethode kompatibel ist. Metabolitanalysen an Protoplasten von *Arabidopsis* Wurzeln legen jedoch nahe, dass die sortierten Trichome etwa für die Analyse von Glucosinolaten, Phenylpropanoiden, Peptiden, Aminosäuren, Fettsäuren, Zuckern und organischen Säuren verwendet werden könnten (Moussaieff *et al.* 2013; Petersson *et al.* 2015).

Diskussion

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass aus den sortierten Trichomen auch RNA von hoher Integrität gewonnen werden kann, obgleich aufgrund der sehr geringen Menge an RNA die aus den so sortierten Trichomen gewonnen werden konnte, für die Analyse der Genexpression mittels RNA-Seq (siehe 4.3.2.) eine vereinfachte Sortiermethode verwendet wurde.

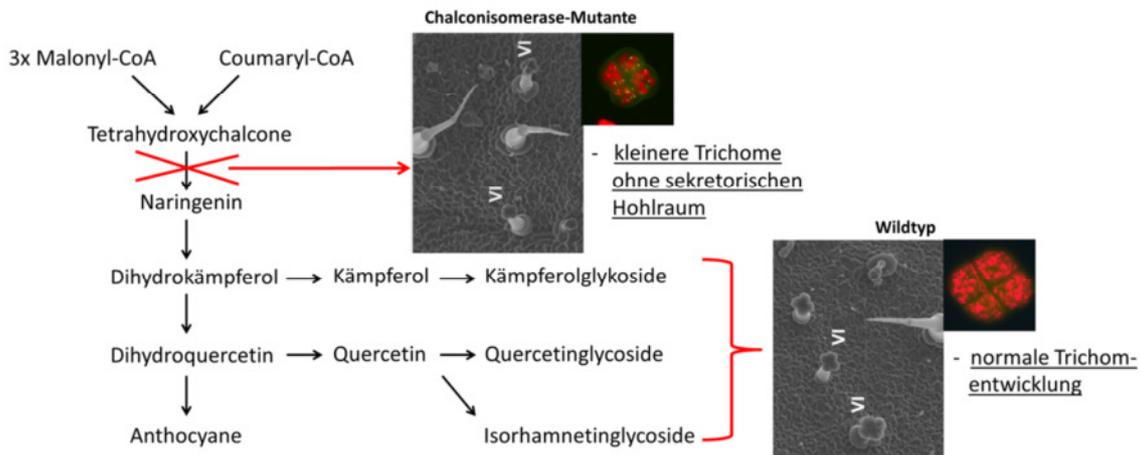


Abbildung 25: Trichomentwicklung und Flavonoidmetabolismus: Schematische Darstellung der Flavonoidbiosynthese und deren möglicher Einfluss auf die Entwicklung von Trichomen. Quelle der elektronenmikroskopischen Aufnahmen: Kang *et al.* 2014.

Nichtsdestotrotz stellt die etablierte Methode einen Ausgangspunkt für weitere umfangreiche Untersuchungen des Metaboloms, Transkriptom und Proteoms der sich entwickelnden Trichome dar, die zu einer Vertiefung des Verständnisses über den Prozess der Trichomentwicklung beitragen können. Darüber hinaus stellt die Trennung der Typ VI Trichome anhand von unterschiedlichen Autofluoreszenzen eine neue Anwendung für die Durchflusszytometrie dar. Bereits in der Vergangenheit konnte die Anwendbarkeit der Durchflusszytometrie bei der Sortierung von Pflanzenzellen gezeigt werden (Birnbaum *et al.* 2003; Nawy *et al.* 2005; Moussaieff *et al.* 2013; Petersson *et al.* 2015). Hierfür war jedoch immer ein vorangehender Verdau der Zellwand, sowie die Expression eines fluoreszierenden Markers bzw. eine Anfärbung der isolierten Protoplasten notwendig. Des Weiteren konnte auch bereits die Sortierung von neutrophilen Granulozyten anhand von unterschiedlichen Autofluoreszenzen durchgeführt werden (Dorward *et al.* 2013). Die für die Sortierung der Trichome etablierte Methode stellt jedoch das erste Beispiel für die durchflusszytometrische Sortierung von intakten multizellulären Pflanzenstrukturen anhand ihrer Autofluoreszenz dar, bei der weder ein Verdau der Zellwände noch eine vorangestellte Färbung bzw. die vorherige Erstellung von transgenen Pflanzen erforderlich ist. Pflanzenzellen besitzen oft autofluoreszierende Verbindungen, wie etwa Chlorophylle,

Sekundärmetabolite oder Zellwandbestandteile, wie z.B. Lignin (Roshchina 2012; Talamond *et al.* 2015). Sekundärmetabolite akkumulieren dabei meist in spezialisierten Zellen, weshalb die durch die Sekundärmetabolite entstehende Autofluoreszenz der Zellen für die Isolation verwendet werden könnte. Im Gegensatz zu leicht zugänglichen autofluoreszierenden Zellen oder Zellverbänden wie den Trichomen oder Pollenkörnern (Audran und Willemse 1982), können die Zellen auch tief im Gewebe eingebettet sein, wie etwa im Falle der Wurzelzellen des Hafers (Goodwin und Pollock 1954; Turner 1960) oder der Ideoblasten der Catharanthen (Yamamoto *et al.* 2016). Die Isolation dieser tief eingebetteten Zellen erfordert zunächst die Herstellung von Protoplasten. Diese Methode wurde jedoch bereits für die Isolation spezifischer Zellen anhand von fluoreszierenden Reporterlinien angewendet (Moussaieff *et al.* 2013) und sollte daher auch auf Autofluoreszenzsignale übertragbar sein. Die etablierte Sortierungsmethode stellt daher nicht nur einen wichtigen Baustein für die Analyse der Entwicklung von glandulären Trichomen dar, sondern könnte sich auch für die Analyse anderer spezialisierter Pflanzenzellen als nützlich erweisen.

4.3.2. Genexpression in jungen und reifen Trichomen

Durch die erfolgreiche Etablierung einer Methode zur Ernte und Sortierung von reinen Fraktionen junger und reifer Trichome konnte eine vergleichende Genexpressionsanalyse der sich entwickelnden Typ VI Trichome von *S. habrochaites* durchgeführt werden. Hierfür wurde zunächst ein *3'RNA-Sequencing* Experiment durchgeführt, bei dem die Expression von 14.490 Genen analysiert werden konnte, von denen wiederum 587 Gene eine differentielle Expression aufwiesen. Die durch das RNA-Seq-Experiment ermittelten Expressionsmuster wurden anschließend mittels qPCR anhand von 44 ausgewählten Genen in *S. habrochaites* überprüft und konnten dabei weitgehend bestätigt werden. Darüber hinaus wurde die Expression der ausgewählten Gene auch in den jungen und reifen Trichomen von *S. lycopersicum* untersucht und mit den Expressionsmustern von *S. habrochaites* verglichen.

Die Betrachtung aller in *S. habrochaites* differentiell exprimierten Gene zeigte, dass in den jungen Typ VI Trichomen vor allem ribosomale Proteine, sowie grundlegende Gene der Regulierung und Synthese von RNA und DNA eine erhöhte Expression aufweisen. Die verstärkte Expression dieser Gene in den jungen Trichomen lässt sich durch eine erhöhte Aktivität von Transkription und Translation in wachsendem Gewebe erklären und stellt somit vermutlich kein für die Trichomentwicklung spezifisches Muster dar.

Diskussion

Neben diesen allgemeinen Genen von Transkription und Translation, wurde bei den Genexpressionsanalysen auch eine Vielzahl weiterer differentiell exprimierter Gene mit Funktionen an unterschiedlichen Prozessen identifiziert. So weisen etwa vier MYB-Transkriptionsfaktoren, von denen drei eine ausgeprägte Homologie zu Vertretern der R2R3 MYB-Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis* zeigen, in den jungen Trichomen beider Tomatenlinien eine wesentlich höhere Expression als in den reifen Trichomen auf. Bereits die Untersuchung der Entwicklung der nicht-glandulären Trichome von *A. thaliana* zeigte, dass die Initiation und Entwicklung von Trichomen durch eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, unter anderem auch aus der Familie der R2R3 MYB Transkriptionsfaktoren wie etwa *GLI*, gesteuert wird (Hülskamp *et al.* 1994; Hülskamp *et al.* 1999; Hülskamp 2004; Balkunde *et al.* 2010). Da anzunehmen ist, dass auch die Entwicklung der Typ VI Trichome der Tomaten durch eine Reihe von Transkriptionsfaktoren gesteuert wird, stellen diese Gene vielversprechende Kandidaten für weitere funktionelle Analysen dar. So könnte etwa durch die Erstellung und Charakterisierung von *knock-out* oder Überexpressionslinien für diese Transkriptionsfaktoren ein tiefer Einblick in den grundlegenden Mechanismus der Entwicklung der Typ VI Trichome gewonnen werden.

Des Weiteren zeigten viele Gene des Zellwandstoffwechsels eine erhöhte Expression in den jungen Trichomen, wobei die verstärkt exprimierte Gene sowohl an der Synthese und Modifikation als auch an der Degradation von Zellwandmaterial beteiligt sind. Dass die sich im Wachstum befindlichen Trichome eine erhöhte Aktivität der Synthese der Zellwände aufweisen ist dabei nicht bemerkenswert. So wächst die Zellwand einer Pflanzenzelle im Verlaufe des Zellwachstums mit, indem fortwährend neues Material in die Primärwand eingelagert wird (Brett und Waldron 1990). Während des Wachstums der Zellwand wird dabei, neben der Synthese der einzelnen Polysaccharide, auch eine Modifikation bzw. Degradation von Zellwandpolymeren benötigt, die zur Auflockerung der Zellwandstrukturen führt. Dieser Prozess kann durch verschiedene Proteine bewirkt werden.

So können etwa Expansine die Auflösung von nicht-kovalenten Bindungen katalysieren, die wiederum zur Auflockerung von Zellwandstrukturen führen kann (McQueen-Mason und Cosgrove 1994; McQueen-Mason und Cosgrove 1995). Die Auflockerung der Zellwand kann jedoch auch durch Endoglukanasen vermittelt werden, indem diese eine Spaltung von Zellulose und Hemizellulose katalysieren (Ohmiya *et al.* 1995; Yoshida und Komae 2006; Urbanowicz *et al.* 2007). Aufgrund dieser Beteiligung der Expansine und der Endoglukanasen bei der Auflockerung von Zellwänden, könnte die erhöhte Expression der

hierfür kodierenden Gene in den jungen Trichomen auch auf eine Beteiligung bei der Entstehung des sekretorischen Hohlraumes hinweisen. Einen wichtigen Hinweis hierfür stellt auch die Anwesenheit von Expansinen im Bereich der Abszissionszonen von *S. lycopersicum* dar (Tsuchiya *et al.* 2015). Auch hier wird eine wichtige Rolle der Expansine bei der Auflösung von Zellwandverbindungen, die letztendlich zur Abszission führt, vermutet. Zusätzlich zu den Expansinen und Endoglukanasen könnten auch weitere Gene des Zellwandabbaus in die Entstehung des sekretorischen Hohlraumes involviert sein. So weisen auch die Gene einer Xylosidase, einer Pektatlyase, einer Arabinofuranosidase und einer Peroxidase eine erhöhte Expression in den jungen Typ VI Trichomen auf.

Xylosidasen katalysieren dabei die Hydrolyse der Hemizellulose Xylan und wurden zuerst in Pilzen und Mikroorganismen entdeckt und charakterisiert (Kerstens-Hilderson *et al.* 1969; Claeysens *et al.* 1971). Erst später konnte gezeigt werden, dass Xylosidasen auch bei Pflanzen vorkommen (Cleemput *et al.* 1993), wo sie in die Remodellierung von Zellwänden involviert sein können (Sampedro *et al.* 2010; Günl und Pauly 2011). Pektatlyasen dagegen katalysieren die hydrolytische Spaltung von demethylierten Pektinen. Auch sie wurden zunächst in Bakterien entdeckt und untersucht (Starr und Moraan 1962) und können bei Pflanzen an der Remodellierung der Zellwände beteiligt sein. So konnte etwa gezeigt werden, dass Pektatlyasen eine wichtige Rolle beim Weichwerden von Früchten einnehmen können (Marín-Rodríguez *et al.* 2002). Arabinofuranosidasen katalysieren wiederum die hydrolytische Spaltung von Arabinanseitenketten, die sowohl bei Pektinen als auch bei Hemizellulosen zu finden sind (Tateishi *et al.* 2005). Auch sie wurden zunächst in Pilzen und Mikroorganismen entdeckt (Kaji und Tagawa 1970; Kaji *et al.* 1981) und sind bei Pflanzen ebenfalls an der Remodellierung der Zellwände beteiligt (Tateishi *et al.* 2005; Arsovski *et al.* 2009). Zusätzlich können auch Peroxidasen eine wichtige Rolle bei der Auflockerung von Zellwandstrukturen einnehmen indem sie die intrazellulären Level an reaktiven Sauerstoffspezies regulieren (Passardi *et al.* 2004).

Aufgrund dieser Beteiligung der Expansine, Endoglukanasen, Xylosidasen, Pektatlyasen, Arabinofuranosidasen und Peroxidasen bei der Auflockerung und Remodellierung von Zellwänden durch die Spaltung verschiedener Verbindungen innerhalb der Zellwand, könnten all diese Proteine in die Entwicklung des sekretorischen Hohlraumes, der durch das Auflösen bestimmter Zellwandbereiche entsteht (Turner *et al.* 2000a), involviert sein (Schema Abb. 24). So könnte etwa die Demethylierung des Pektins der inneren Zellwand in den Trichomen von *S. habrochaites* (siehe 4.2.1.) einen Ausgangspunkt für die Spaltung

Diskussion

des Pektins durch eine Pektatlyase darstellen. Die erhöhte Expression dieser Gene in den jungen Trichomen von beiden Tomatenlinien könnte jedoch auch auf die Beteiligung dieser Gene beim Wachstum und der Entwicklung der äußeren Zellwände zurückzuführen sein. Ein detaillierteres Verständnis über die Funktion dieser Gene bei der Entwicklung der Typ VI Trichome könnte daher nur durch die Durchführung weiterer Experimente gewonnen werden.

So könnte etwa durch die Erstellung von *knock-down* oder *knock-out* Mutanten ein tieferer Einblick in die Funktion einzelner Kandidatengene gewonnen werden. Für die Erstellung solcher Mutanten gibt es bereits verschiedene etablierte Methoden, wie zum Beispiel die Methoden des *Virus Induced Gene Silencings* (VIGS), der RNA Interferenz (RNAi) oder des CRISPR/Cas9-Systems die bereits an verschiedenen Linien von *S. lycopersicum* für verschiedene Gene erfolgreich durchgeführt werden konnten (siehe etwa Liu *et al.* 2002; Fu *et al.* 2005; Orzaez *et al.* 2009; Escobar *et al.* 2001; Schijlen *et al.* 2007; Gupta *et al.* 2013; Brooks *et al.* 2014; Pan *et al.* 2016). Für die Untersuchung spezifischer Entwicklungsprozesse der Typ VI Trichome von *S. habrochaites*, wie etwa der Entstehung des sekretorischen Hohlraumes, kann die Erstellung der Mutantenlinien jedoch nicht an einer kultivierten Tomatenlinie durchgeführt werden. Für die Erstellung von *knock-down* bzw. *knock-out* Mutanten von *S. habrochaites* müsste somit zunächst eine geeignete Methode für die stabile Transformation von *S. habrochaites* etabliert werden, wobei die bereits etablierten Methoden zur Transformation von *S. lycopersicum* als Ausgangspunkt dienen könnten.

Für die Untersuchung von Genen, die grundlegende Prozesse der Trichomentwicklung steuern, könnten jedoch auch an *S. lycopersicum knock-down* oder *knock-out* Experimente durchgeführt werden. Eine wichtige Grundlage hierfür stellt der bereits erfolgte Abgleich der Expressionsmuster der 44 potentiell an der Entwicklung beteiligten Gene in den jungen und reifen Trichomen von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* dar. Hierbei zeigten neben dem MYB-Transkriptionsfaktor *Bli1* auch ein weiterer *MYB-Transkriptionsfaktor*, die putative *Diacylglycerol-Acyltransferase* sowie ein *Expansin* in den jungen Trichomen von beiden Linien stark erhöhte Expressionslevel (> 12-fach), weshalb diese Gene als vielversprechende Kandidaten für eine funktionelle Analyse angesehen werden können. Die Erstellung und Charakterisierung von *knock-out* Mutanten für diese Gene könnte daher einen detaillierten Einblick in die Trichomentwicklung auf Genebene liefern, was wiederum einen bedeutenden Beitrag zur Vervollständigung des Verständnisses der Entwicklung dieser faszinierenden Strukturen leisten würde.

5. Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein erster Einblick in die Entwicklung der Typ VI Trichome von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* gewonnen werden. Viele Aspekte der Trichomentwicklung bleiben bisher jedoch noch unbekannt.

So wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass in den jungen Trichomen beider Linien eine gelb-grün fluoreszierende Substanz akkumuliert, die maßgeblich an der Entwicklung der Trichome beteiligt zu sein scheint. Obgleich erste Untersuchungen nahelegen, dass es sich bei der fluoreszierenden Substanz um ein Flavoprotein handeln könnte, bleibt die genaue Struktur der Substanz sowie die Rolle, die sie in der Entwicklung der Typ VI Trichome spielt, bisher noch unbekannt. Um weitere Anhaltspunkte hierüber zu erhalten, müsste zunächst eine geeignete Methode für die Extraktion und Analyse der betreffenden Substanz aus den jungen Trichomen von *S. habrochaites* und *S. lycopersicum* etabliert werden. Sollte es sich bei der Substanz tatsächlich, wie vermutet, um ein Flavoprotein handeln, an das Riboflavin in Form von FAD oder FMN gebunden ist, müsste dabei eine Proteinanalysemethode zum Einsatz kommen, welche mit sehr geringen Mengen an Material auskommt. Als Grundlage hierfür könnten massenspektrometrische Analysen dienen, mit deren Hilfe in der Vergangenheit bereits Proteinanalysen aus wenigen tausend Zellen durchgeführt werden konnten (ein exzellentes Review über diese Thematik geben Altelaar und Heck 2012).

Des Weiteren konnten im Umfang der vorliegenden Arbeit auch erste Einblicke in die Struktur der Zellwände der Typ VI Trichome gewonnen werden. Die hierbei erhaltenen Daten liefern Hinweise darauf, dass für die Entstehung des sekretorischen Hohlraumes der Trichome von *S. habrochaites* umfangreiche Remodellierungen im Bereich der inneren Zellwände notwendig sind. Die Untersuchung dieses Prozesses steht jedoch erst am Anfang. Weitere Einblicke in diesen Prozess könnten zum Beispiel durch weitere Immunmarkierungsexperimente gewonnen werden. So könnte etwa mit den bereits verwendeten Antikörpern an den Typ VI Trichomen von *S. lycopersicum* überprüft werden, ob die Demethylierung der Pektine bzw. die Bildung von Arabinanen in den inneren Zellwänden tatsächlich in die Entstehung des sekretorischen Hohlraumes involviert sind. Zudem könnten Immunmarkierungsexperimente mit Expansin-bindenden Antikörpern, wie sie bereits bei Abszissionszonen durchgeführt wurden (Tsuchiya *et al.* 2015), an den Trichomen der beiden Tomatenlinien durchgeführt werden, um weitere Hinweise über die Beteiligung dieser Proteine bei der Entstehung des Hohlraumes zu erhalten. Weiterhin könnten auch umfangreichere massenspektrometrische Analysen der

Ausblick

Zellwände zu einem besseren Verständnis der Veränderungen der Zellwandstrukturen im Laufe der Trichomentwicklung beitragen. Dabei sollte die Analyse der Pektinstruktur von jungen und reifen Trichomen bzw. von inneren und äußeren Zellwänden der Typ VI Trichome zu einem besseren Verständnis der Entstehung und des Aufbaus u.a. der Sollbruchstelle der Trichome sowie des sekretorischen Hohlraumes führen. Darüber hinaus stellt die etablierte Methode der massenspektrometrischen Analyse von Pektinstrukturen eine Grundlage für die Untersuchung weiterer Zellwandpolymere, wie etwa der Hemizellulosen, dar, deren Remodellierung auch eine entscheidende Funktion bei der Entstehung des sekretorischen Hohlraumes spielen könnte.

Zudem konnte im Umfang der vorliegenden Arbeit eine Methode zur Ernte und Sortierung junger und reifer Typ VI Trichome entwickelt werden, die erste Einblicke in die Genexpression und den Sekundärmetabolismus der sich-entwickelnden Trichome ermöglichte. Die hierbei erhaltenen Expressionsdaten sollten mit quantitativen, massenspektrometrischen Analysen des Proteoms abgeglichen werden, wodurch wiederum die bereits identifizierten Kandidatengene überprüft werden könnten. Zusätzlich könnten umfangreichere Untersuchungen der Gehalte verschiedener Primär- und Sekundärmetabolite der jungen und reifen Typ VI Trichome durchgeführt werden. Durch diese weiterführenden Untersuchungen würde gemeinsam mit den bereits erhaltenen Daten eine solide Basis für die funktionelle Analyse an der Entwicklung beteiligter Gene geschaffen. Die Funktion von Genen, die potentiell an grundlegenden Prozessen der Trichomentwicklung beteiligt sind, könnte dabei durch das gezielte Ausschalten des jeweiligen Gens in *S. lycopersicum* überprüft werden. Für die Analyse der für *S. habrochaites* spezifischen Entwicklungsprozesse, müsste dagegen zunächst eine geeignete Methode für die stabile Transformation von *S. habrochaites* etabliert werden (siehe 4.3.2.).

Alles in allem konnte in der vorliegenden Arbeit ein umfassender erster Einblick in die Morphologie und die Entwicklung der glandulären Typ VI Trichome der Wildtomate *S. habrochaites* und der Kulturtomate *S. lycopersicum* gewonnen werden. Die hierbei erhaltenen Erkenntnisse und etablierten Methoden legen einen wichtigen Grundstein für die weitere Untersuchung der Trichomentwicklung und stellen daher eine Basis für die Wiedereinführung der durch die Trichome vermittelten natürlichen Resistenzen gegen Schadinsekten in unsere Kulturpflanzen dar.

6. Literatur

- Adato A, Mandel T, Mintz-Oron S, Venger I, Levy D, Yativ M, Domínguez E, Wang Z, De Vos RC, Jetter R, Schreiber L, Heredia A, Rogachev I, Aharoni A. 2009.** Fruit-surface flavonoid accumulation in tomato is controlled by a SIMYB12-regulated transcriptional network. *PLoS Genetics* **5**: e1000777.
- Altelaar AF, Heck AJ. 2012.** Trends in ultrasensitive proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology* **16**: 206-213.
- Angermüller C, Clark SJ, Lee HJ, Macaulay IC, Teng MJ, Hu TX, Krueger F, Smallwood SA, Ponting CP, Voet T, Kelsey G, Stegle O, Reik W. 2016.** Parallel single-cell sequencing links transcriptional and epigenetic heterogeneity. *Nature Methods* **13**: 229-232.
- Arsovski AA, Popma TM, Haughn GW, Carpita NC, McCann MC, Western TL. 2009.** AtBXL1 encodes a bifunctional β -D-xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase required for pectic arabinan modification in *Arabidopsis* mucilage secretory cells. *Plant Physiology* **150**: 1219-1234.
- Ascensão L, Pais MSS. 1987.** Glandular trichomes of *Artemisia campestris* (ssp. Maritima): ontogeny and histochemistry of the secretory product. *Botanical Gazette* **148**: 221-222.
- Aschenbrenner K, Horakh S, Spring O. 2013.** Linear glandular trichomes of *Helianthus* (*Asteraceae*): morphology, localization, metabolite activity and occurrence. *AoB PLANTS* **5**: plt028.
- Aschenbrenner AK, Amrehn E, Bechtel L, Spring O. 2015.** Trichome differentiation on leaf primordia of *Helianthus annuus* (*Asteraceae*): morphology, gene expression and metabolite profile. *Planta* **241**: 837-846.
- Audran JC, Willemse MTM. 1982.** Wall development and its autofluorescence of sterile and fertile *Vicia faba* L. Pollen. *Protoplasma* **110**: 106-111.

Literatur

- Balcke GU, Kolle SN, Kamp H, Bethan B, Looser R, Wagner S, Landsiedel R, van Ravenzwaay B. 2011.** Linking energy metabolism to dysfunctions in mitochondrial respiration--a metabolomics in vitro approach. *Toxicology Letters* **203**: 200-209.
- Balcke GU, Bennewitz S, Zabel S, Tissier A. 2014.** Isoprenoid and metabolite profiling of plant trichomes. *Methods Molecular Biology* **1153**: 189-202.
- Balkunde R, Pesch M, Hülskamp M. 2011.** Trichome patterning in *Arabidopsis thaliana* from genetic to molecular models. *Current Topics in Developmental Biology* **91**: 299-321.
- Beale MH, Birkett MA, Bruce TJ, Chamberlain K, Field LM, Huttly AK, Martin JL, Parker R, Phillips AL, Pickett JA, Prosser IM, Shewry PR, Smart LE, Wadhams LJ, Woodcock CM, Zhang Y. 2006.** Aphid alarm pheromone produced by transgenic plants affects aphid and parasitoid behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 10509-10513.
- Birnbaum K, Shasha DE, Wang JY, Jung JW, Lambert GM, Galbraith DW, Benfey PN. 2003.** A gene expression map of the *Arabidopsis* root. *Science* **302**: 1956-1960.
- Bombo AB, Appezzato-da-Glória B, Aschenbrenner AK, Spring O. 2016.** Capitulate glandular trichomes in *Aldama discolor* (*Heliantheae* - *Asteraceae*): morphology, metabolite profile and sesquiterpene biosynthesis. *Plant biology (Stuttgart, Germany)* **18**: 455-462.
- Božić D, Papaefthimiou D, Brückner K, de Vos RC, Tsoleridis CA, Katsarou D, Papanikolaou A, Pateraki I, Chatzopoulou FM, Dimitriadou E, Kostas S, Manzano D, Scheler U, Ferrer A, Tissier A, Makris AM, Kampranis SC, Kanellis AK. 2015.** Towards elucidating carnosic acid biosynthesis in *Lamiaceae*: Functional characterization of the three first steps of the pathway in *Salvia fruticosa* and *Rosmarinus officinalis*. *PLoS One* **10**: e0124106.
- Bosabalidis AM, Exarchou F. 1995.** Effect of NAA and GA on leaves and

- glandular trichomes of *Origanum x intercedens* Rech.: morphological and anatomical features. *International Journal of Plant Sciences* **156**: 488-495.
- Braybrook SA, Peaucelle A. 2013.** Mechano-chemical aspects of organ formation in *Arabidopsis thaliana*: the relationship between auxin and pectin. *PLoS One* **8**: e57813.
- Brett C, Waldron K. 1990.** Physiology and biochemistry of plant cell walls. Editor: Black M, Chapman J, *Unwin Hyman, London*.
- Brooks C, Nekrasov V, Lippman ZB, Van Eck J. 2014.** Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant Physiology* **166**: 1292-1297.
- Broz AK, Randle AM, Sianta SA, Tovar-Méndez A, McClure B, Bedinger PA. 2017.** Mating system transitions in *Solanum habrochaites* impact interactions between populations and species. *New Phytologist* **213**: 440-454.
- Busch BL, Schmitz G, Rossmann S, Piron F, Ding J, Bendahmane A, Theres K. 2011.** Shoot branching and leaf dissection in tomato are regulated by homologous gene modules. *The Plant Cell* **23**: 3595-3609.
- Cardoso, MZ. 2008.** Herbivore handling of a plant's trichome: The case of *Heliconius charithonia* (L.) (*Lepidoptera: Nymphalidae*) and *Passiflora lobata* (Killip) Hutch. (*Passifloraceae*). *Neotropical Entomology* **37**: 247-252.
- Channarayappa C, Shivashankar G, Muniyappa V, Frist RH. 1992.** Resistance of *Lycopersicon* species to *Bemisia tabaci*, a tomato leaf curl virus vector. *Canadian Journal of Botany* **70**: 2184-2192.
- Claeysens M, Loontjens FG, Kersters-Hilderson H, De Bruyne CK. 1971.** Partial purification and properties of an *Aspergillus niger* beta-D-xylosidase. *Enzymologia* **40**: 177-198.

Literatur

- Cleemput G, Hessing M, Van Oort M, Deconynck M, Delcour JA. 1997.** Purification and characterization of a β -D-xylosidase and an endo-xylanase from wheat flour. *Plant Physiology* **113**: 377-386.
- Clément-Ziza M, Munnich A, Lyonnet S, Jaubert F, Besmond C. 2008.** Stabilization of RNA during laser capture microdissection by performing experiments under argon atmosphere or using ethanol as a solvent in staining solutions. *RNA* **14**: 2698-2704.
- Cosgrove DJ. 2016.** Catalysts of plant cell wall loosening. *F1000 Research* **5**: 119.
- Covello PS. 2008.** Making artemisinin. *Phytochemistry* **69**: 2881-2885.
- Croteau RB, Davis EM, Ringer KL, Wildung MR. 2005.** (-)-Menthol biosynthesis and molecular genetics. *Naturwissenschaften* **92**: 562-577.
- Daher FB, Braybrook SA. 2015.** How to let go: pectin and plant cell adhesion. *Frontiers in Plant Science* **6**: 523.
- Dai X, Mashiguchi K, Chen Q, Kasahara H, Kamiya Y, Ojha S, DuBois J, Ballou D, Zhao Y. 2013.** The biochemical mechanism of auxin biosynthesis by an *arabidopsis* YUCCA flavin-containing monooxygenase. *The Journal of Biological Chemistry* **288**: 1448-57.
- Daimon T, Hirayama C, Kanai M, Ruike Y, Meng Y, Kosegawa E, Nakamura M, Tsujimoto G, Katsuma S, Shimada T. 2010.** The silkworm Green b locus encodes a quercetin 5-O-glucosyltransferase that produces green cocoons with UV-shielding properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 11471-11476.
- David R, Carde JP. 1964.** Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpéniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du réactif Nadi. *Compte Rendu del'Académie des Sciences de Paris* **258**: 1338-1340.
- Dell B, McComb AJ. 1977.** Glandular hair formation and resin secretion in

- Eremophila fraseri* F. Meull (*Myoporaceae*). *Protoplasma* **92**: 71-86.
- Dell B, McComb AJ. 1978.** Plant Resins-their formation, secretion and possible functions. *Advances in Botanical Research* **6**: 227-316.
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. 2013.** STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**: 15-21.
- Dorward DA, Lucas CD, Alessandri AL, Marwick JA, Rossi F, Dransfield I, Haslett C, Dhaliwal K, Rossi AG. 2013.** Technical advance: autofluorescence-based sorting: rapid and nonperturbing isolation of ultrapure neutrophils to determine cytokine production. *Journal of Leukocyte Biology* **94**: 193-202.
- Ehleringer J. 1984.** Ecology and ecophysiology of leaf pubescence in North American desert plants. In: *Biology and chemistry of plant trichomes*. Editor: Rodriguez E, *New York: Plenum Press* 113-132.
- Escobar MA, Civerolo EL, Summerfelt KR, Dandekar AM. 2001.** RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 13437-13442.
- Fahn A. 2000.** Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research* **31**: 37-75.
- Fobes JF, Mudd JB, Marsden MP. 1985.** Epicuticular lipid accumulation on the leaves of *Lycopersicon pennellii* (Corr.) D'Arcy and *Lycopersicon esculentum* Mill. *Plant Physiology* **77**: 567-570.
- Francis KE, Lam SY, Copenhaver GP. 2006.** Separation of *Arabidopsis* pollen tetrads is regulated by QUARTET1, a pectin methylesterase gene. *Plant Physiology* **142**: 1004-1013.
- Frelichowski JE, Juvik JA. 2001.** Sesquiterpene carboxylic acids from a wild Tomato species affect larval feeding behavior and survival of *Helicoverpa zea* and

Literatur

Spodoptera exigua (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* **94**: 1249-1259.

Fu DQ, Zhu BZ, Zhu HL, Jiang WB, Luo YB. 2005. Virus-induced gene silencing in tomato fruit. *The Plant Journal* **43**: 299-308.

Gang DR, Wang J, Dudareva N, Nam KH, Simon JE, Lewinsohn E, Pichersky E. 2001. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. *Plant Physiology* **125**: 539-555.

Gang DR, Lavid N, Zubieta C, Chen F, Beuerle T, Lewinsohn E, Noel JP, Pichersky E. 2002. Characterization of phenylpropene O-methyltransferases from sweet basil: facile change of substrate specificity and convergent evolution within a plant O-methyltransferase family. *The Plant Cell* **14**: 505-519.

Gentile AG, Stoner AK. 1968. Resistance in *Lycopersicon* and *Solanum* species to the potato aphid. *Journal of Economic Entomology* **61**: 1152-1154.

Gershenzon J, McCaskill D, Rajaonarivony JI, Mihaliak C, Karp F, Croteau R. 1992. Isolation of secretory cells from plant glandular trichomes and their use in biosynthetic studies of monoterpenes and other gland products. *Analytical Biochemistry* **200**: 130-138.

Glas JJ, Schimmel BCJ, Alba JM, Escobar-Bravo R, Schuurink RC, Kant MR. 2012. Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. *International Journal of Molecular Sciences* **13**: 17077-17103.

Goffreda JC, Steffens JC, Mutschler MA. 1990. Association of epicuticular sugars with aphid. Resistance in hybrids with wild tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **115**: 161-165.

Goldberg R, Morvan C, Roland JC. 1986. Composition, properties and localisation of pectins in young and mature cells of mung bean hypocotyl. *Plant and Cell Physiology* **27**: 417-429.

- Goodwin RH, Pollock BM. 1954.** Studies on roots. I. Properties and distribution of fluorescent constituents in avena roots. *American Journal of Botany* **41**: 516-520.
- Grininger M, Staudt H, Johansson P, Wachtveitl J, Oesterhelt D. 2009.** Dodecin is the key player in flavin homeostasis of *Archaea*. *The Journal of Biological Chemistry* **284**: 13068-13076.
- Gupta A, Pal RK, Rajam MV. 2013.** Delayed ripening and improved fruit processing quality in tomato by RNAi-mediated silencing of three homologs of 1-aminopropane-1-carboxylate synthase gene. *Journal of Plant Physiology* **170**: 987-995.
- Günl M, Pauly M. 2011.** AXY3 encodes a α -xylosidase that impacts the structure and accessibility of the hemicellulose xyloglucan in *Arabidopsis* plant cell walls. *Planta* **233**: 707-719.
- Hall CL, Kamin H. 1975.** The purification and some properties of electron transfer flavoprotein and general fatty acyl coenzyme A dehydrogenase from pig liver mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry* **250**: 3476-3486.
- Harborne JB. 1962.** Plant polyphenols: 5. Occurrence of azalein and related pigments in flowers of *Plumbago* and *Rhododendron* species. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **96**: 171-178.
- Harborne JB. 1967.** Comparative biochemistry of flavonoids - V: Luteolin 5-glucoside and its occurrence in the umbelliferae. *Phytochemistry* **6**: 1569-1573.
- Hause B, Demus U, Teichmann C, Parthier B, Wasternack C. 1996.** Developmental and tissue-specific expression of JIP-23, a jasmonate-inducible protein of barley. *Plant Cell Physiology* **37**: 641-649.
- Hawthorne DJ, Shapiro JA, Tingey WM, Mutschler MA. 1990.** Trichome-borne and artificially applied acylsugars of wild tomato deter feeding and oviposition of the leafminer *Liriomyza trifolii*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **65**: 65-73.

Literatur

- Heredia A, Jiménez A, Guillén R. 1995.** Composition of plant cell walls. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung* **200**: 24-31.
- Homocianu M, Airinei A, Dorohoi DO. 2011.** Solvent effects on the electronic absorption and fluorescence spectra. *Journal of Advanced Research in Physics* **2**: 011105.
- Hopfgartner G, Tonoli D, Varesio E. 2012.** High-resolution mass spectrometry for integrated qualitative and quantitative analysis of pharmaceuticals in biological matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **402**: 2587-2596.
- Hülskamp M, Misra S, Jürgens G. 1994.** Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. *Cell* **76**: 555-566.
- Hülskamp M, Schnittger A, Folkers U. 1999.** Pattern formation and cell differentiation: trichomes in *Arabidopsis* as a genetic model system. *International Review of Cytology* **186**: 147-178.
- Hülskamp M. 2004.** Plant trichomes: a model for cell differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**: 471-480.
- Ichihashi Y, Aguilar-Martínez JA, Farhi M, Chitwood DH, Kumar R, Millon LV, Peng J, Maloof JN, Sinha NR. 2014.** Evolutionary developmental transcriptomics reveals a gene network module regulating interspecific diversity in plant leaf shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: e2616-2621.
- Ioannidis D, Bonner L, Johnson CB. 2002.** UV-B is required for normal development of oil glands in *Ocimum basilicum* L. (sweet basil). *Annals of Botany* **90**: 453-460.
- Ishida JK, Wakatake T, Yoshida S, Takebayashi Y, Kasahara H, Wafula E, dePamphilis CW, Namba S, Shirasu K. 2016.** Local Auxin Biosynthesis Mediated by a YUCCA Flavin Monooxygenase Regulates Haustorium Development in the Parasitic Plant *Phtheirospermum japonicum*. *The Plant Cell* **28**:1795-1814.

- Iwai H, Terao A, Satoh S. 2013.** Changes in distribution of cell wall polysaccharides in floral and fruit abscission zones during fruit development in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Plant Research* **126**: 427-437.
- Joosten V, van Berkel WJ. 2007.** Flavoenzymes. *Current Opinion in Chemical Biology* **11**: 195-202.
- Jurd L, Horowitz R. 1957.** Spectral studies on flavonols-the structure of azalein. *The Journal of Organic Chemistry* **22**: 1618-1622.
- Kaji A, Tagawa K. 1970.** Purification, crystallization and amino acid composition of alpha-L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. *Biochimica et Biophysica Acta* **207**: 456-464.
- Kaji A, Sato M, Tsutsui Y. 1981.** An α -L-arabinofuranosidase produced by the wild-type *streptomyces* sp. No. 17-1. *Agricultural and Biological Chemistry* **45**: 925-931.
- Kang JH, Shi F, Jones DA, Marks DM, Howe GA. 2010.** Distortion of trichome morphology by the hairless mutation of tomato affects leaf surface chemistry. *Journal of Experimental Botany* **61**: 1053-1064.
- Kang JH, McRoberts J, Shi F, Moreno JE, Jones AD, Howe GA. 2014.** The flavonoid biosynthetic enzyme chalcone isomerase modulates terpenoid production in glandular trichomes of tomato. *Plant Physiology* **164**: 1161-1174.
- Kang JH, Campos ML, Zemelis-Durfee S, Al-Haddad JM, Jones AD, Telewski FW, Brandizzi F, Howe GA. 2016.** Molecular cloning of the tomato Hairless gene implicates actin dynamics in trichome-mediated defense and mechanical properties of stem tissue. *Journal of Experimental Botany* **67**: 5313-5324.
- Kerstens-Hilderson H, Loontjens FG, Claeysens M, De Bruyne CK. 1969.** Partial purification and properties of an induced beta-D-xylosidase of *Bacillus pumilus* 12. *European Journal of Biochemistry* **7**: 434-441.

Literatur

- Kratzmann E. 1910.** Über den Bau und die vermutliche Funktion der “Zwischenwanddrüsen” von *Rhododendron hirsutum*, *intermedium* und *ferrugineum*. *Österreichische Botanische Zeitschrift* **60**: 409-424.
- Krolikowski KA, Victor JL, Wagler TN, Lolle SJ, Pruitt RE. 2003.** Isolation and characterization of the *Arabidopsis* organ fusion gene HOTHEAD. *The Plant Journal* **35**: 501-511.
- Kuhn BM, Errafi S, Bucher R, Dobrev P, Geisler M, Bigler L, Zažímalová E, Ringli C. 2016.** 7-Rhamnosylated flavonols modulate homeostasis of the plant hormone auxin and affect plant development. *The Journal of Biological Chemistry* **291**: 5385-5395.
- Kurdyukov S, Faust A, Trenkamp S, Bär S, Franke R, Efremova N, Tietjen K, Schreiber L, Saedler H, Yephremov A. 2006.** Genetic and biochemical evidence for involvement of HOTHEAD in the biosynthesis of long-chain alpha-,omega-dicarboxylic fatty acids and formation of extracellular matrix. *Planta* **224**: 315-29.
- Leidl BE, Lawson DM, White KK, Shapiro JA, Cohen DE, Carson WG, Trumble JT, Mutschler MA. 1995.** Acylglucoses of the wild tomato *Lycopersicon pennellii* (Corr.) D’Arcy alters settling and reduces oviposition of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology* **88**: 742-748.
- Kennedy GG. 2003.** Tomato, pests, parasitoids, and predators: tritrophic interactions involving the genus *Lycopersicon*. *Annual Review of Entomology* **48**: 51-72.
- Leijdekkers AG, Sanders MG, Schols HA, Gruppen H. 2011.** Characterizing plant cell wall derived oligosaccharides using hydrophilic interaction chromatography with mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A* **1218**: 9227-9235.
- Levesque-Tremblay G, Pelloux J, Braybrook SA, Müller K. 2015.** Tuning of pectin methylesterification: consequences for cell wall biomechanics and development. *Planta* **242**: 791-811.

- Li C, Wang Z, Jones AD. 2013.** Chemical imaging of trichome specialized metabolites using contact printing and laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **406**: 171-182.
- Liakopoulos G, Nikolopoulos D, Klouvatou A, Vekkos KA, Manetas Y, Karabourniotis G. 2006.** The photoprotective role of epidermal anthocyanins and surface pubescence in young leaves of grapevine (*Vitis vinifera*). *Annals of Botany* **98**: 257-265.
- Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP. 2002.** Virus-induced gene silencing in tomato. *The Plant Journal* **31**: 777-786.
- Luckwill LC. 1943.** The genus *Lycopersicon*: A historical, biological and taxonomic survey of the wild and cultivated tomato. *Aberdeen, The University Press* **120**: 1-44.
- Lunn D, Phan TD, Tucker GA, Lycett GW. 2013.** Cell wall composition of tomato fruit changes during development and inhibition of vesicle trafficking is associated with reduced pectin levels and reduced softening. *Plant Physiology and Biochemistry* **66**: 91-97.
- Macheroux P, Kappes B, Ealick SE. 2011.** Flavogenomics--a genomic and structural view of flavin-dependent proteins. *The FEBS Journal* **278**: 2625-2634.
- Mataga N, Chosrowjan H, Shibata Y, Tanaka F, Nishima Y, Shiga K. 2000.** Dynamics and mechanisms of ultrafast fluorescence quenching reactions of flavin chromophores in protein nanospace. *The Journal of Physical Chemistry B* **104**: 10667-10677.
- Marín-Rodríguez MC, Orchard J, Seymour GB. 2002.** Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *Journal of Experimental Botany* **53**: 2115-2119.
- McDowell ET, Kapteyn J, Schmidt A, Li C, Kang JH, Descour A, Shi F, Larson M, Schillmiller A, An L, Jones AD, Pichersky E, Soderlund CA, Gang DR. 2011.** Comparative functional genomic analysis of *Solanum* glandular trichome

Literatur

types. *Plant Physiology* **155**: 524-539.

McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove DJ. 1992. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *The Plant Cell* **4**: 1425-1433.

McQueen-Mason S, Cosgrove DJ. 1994. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 6574-6578.

McQueen-Mason S, Cosgrove DJ. 1995. Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant Physiology* **107**: 87-100.

Misra BB, Assmann SM, Chen S. 2014. Plant single-cell and single-cell-type metabolomics. *Trends in Plant Science* **19**: 637-646.

Moussaieff A, Rogachev I, Brodsky L, Malitsky S, Toal TW, Belcher H, Yativ M, Brady SM, Benfey PN, Aharoni A. 2013. High-resolution metabolic mapping of cell types in plant roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: e1232-1241.

Nakashima T, Wada H, Morita S, Erra-Balsells R, Hiraoka K, Nonami H. 2016. Single-cell metabolite profiling of stalk and glandular cells of intact trichomes with internal electrode capillary pressure probe electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **88**: 3049-3057.

Nawy T, Lee JY, Colinas J, Wang JY, Thongrod SC, Malamy JE, Birnbaum K, Benfey PN. 2005. Transcriptional profile of the *Arabidopsis* root quiescent center. *The Plant Cell* **17**: 1908-1925.

Nemes P, Knolhoff AM, Rubakhin SS, Sweedler JV. 2011. Metabolic differentiation of neuronal phenotypes by single-cell capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **83**: 6810-6817.

Ochoa-Villarreal M, Aispuro-Hernández E, Vargas-Arispuro I, Martínez-Téllez

- MA. 2012.** Plant cell wall polymers: Function, structure and biological activity of their derivatives. Editor: Gomes ADS, *InTech*.
- Ohmiya Y, Takeda T, Nakamura S, Sakai F, Hayashi T. 1995.** Purification and properties of wall-bound endo-1, 4-beta-glucanase from suspension-cultured poplar cells. *Plant and Cell Physiology* **36**: 607-614.
- Orfila C, Dal Degan F, Jørgensen B, Scheller HV, Ray PM, Ulvskov P. 2012.** Expression of mung bean pectin acetyl esterase in potato tubers: effect on acetylation of cell wall polymers and tuber mechanical properties. *Planta* **236**: 185-196.
- Orzaez D, Medina A, Torre S, Fernández-Moreno JP, Rambla JL, Fernández-Del-Carmen A, Butelli E, Martin C, Granell A. 2009.** A visual reporter system for virus-induced gene silencing in tomato fruit based on anthocyanin accumulation. *Plant Physiology* **150**: 1122-1134.
- Pan C, Ye L, Qin L, Liu X, He Y, Wang J, Chen L, Lu G. 2016.** CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations. *Scientific Reports* **6**: 24765.
- Panikashvili D, Shi JX, Schreiber L, Aharoni A. 2009.** The *Arabidopsis* DCR encoding a soluble BAHD acyltransferase is required for cutin polyester formation and seed hydration properties. *Plant Physiology* **151**: 1773-1789.
- Passardi F, Penel C, Dunand C. 2004.** Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science* **9**: 534-540.
- Peaucelle A, Braybrook SA, Le Guillou L, Bron E, Kuhlemeier C, Höfte H. 2011.** Pectin-induced changes in cell wall mechanics underlie organ initiation in *Arabidopsis*. *Current Biology* **21**: 1720-1726.
- Peer WA, Murphy AS. 2007.** Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends in Plant Science* **12**: 556-563.

Literatur

- Petersson SV, Lindén P, Moritz T, Ljung K. 2015.** Cell-type specific metabolic profiling of *Arabidopsis thaliana* protoplasts as a tool for plant systems biology. *Metabolomics* **11**: 1679-1689.
- Pourcel L, Irani NG, Koo AJ, Bohorquez-Restrepo A, Howe GA, Grotewold E. 2013.** A chemical complementation approach reveals genes and interactions of flavonoids with other pathways. *The Plant Journal* **74**: 383-397.
- Puterka GJ, Farone W, Palmer T, Barrington A. 2003.** Structure-function relationships affecting the insecticidal and miticidal activity of sugar esters. *Journal of Economic Entomology* **96**: 636-644.
- Qiu S, Luo S, Evgrafov O, Li R, Schroth GP, Levitt P, Knowles JA, Wang K. 2012.** Single-neuron RNA-Seq: technical feasibility and reproducibility. *Frontiers in Genetics* **3**: 124.
- Ralet MC, Cabrera JC, Bonnin E, Quéméner B, Hellin P, Thibault JF. 2005.** Mapping sugar beet pectin acetylation pattern. *Phytochemistry* **66**: 1832-1843.
- Ramsköld D, Luo S, Wang YC, Li R, Deng Q, Faridani OR, Daniels GA, Khrebtukova I, Loring JF, Laurent LC, Schroth GP, Sandberg R. 2012.** Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nature Biotechnology* **30**: 777-782.
- Rani SH, Krishna TH, Saha S, Negi AS, Rajasekharan R. 2010.** Defective in cuticular ridges (DCR) of *Arabidopsis thaliana*, a gene associated with surface cutin formation, encodes a soluble diacylglycerol acyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry* **285**: 38337-38347.
- Remoroza C, Cord-Landwehr S, Leijdekkers AG, Moerschbacher BM, Schols HA, Gruppen H. 2012.** Combined HILIC-ELSD/ESI-MS(n) enables the separation, identification and quantification of sugar beet pectin derived oligomers. *Carbohydrate Polymers* **90**: 41-48.
- Ringli C, Bigler L, Kuhn BM, Leiber RM, Diet A, Santelia D, Frey B, Pollmann**

- S, Klein M. 2008.** The modified flavonol glycosylation profile in the *Arabidopsis rol1* mutants results in alterations in plant growth and cell shape formation. *The Plant Cell* **20**: 1470-1481.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2010.** edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**: 139-140.
- Romashko DN, Marban E, O'Rourke B. 1998.** Subcellular metabolic transients and mitochondrial redox waves in heart cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 1618-1623.
- Roshchina VV. 2012.** Vital autofluorescence: Application to the study of plant living cells. Editor: Zhang J, *International Journal of Spectroscopy*.
- Roshchina VV. 2014.** Model systems to study the excretory function of higher plants. *Springer Science+Business Media Dordrecht*.
- Sallaud C, Rontein D, Onillon S, Jabès F, Duffé P, Giacalone C, Thoraval S, Escoffier C, Herbette G, Leonhardt N, Causse M, Tissier A. 2009.** A novel for sesquiterpene biosynthesis from Z,Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites*. *The Plant Cell* **21**: 301-317.
- Sallaud C, Giacalone C, Töpfer R, Goepfert S, Bakaher N, Rösti S, Tissier A. 2012.** Characterization of two genes for the biosynthesis of the labdane diterpene Z-abienol in tobacco (*Nicotiana tabacum*) glandular trichomes. *The Plant Journal* **72**: 1-17.
- Sallets A, Beyaert M, Boutry M, Champagne A. 2014.** Comparative proteomics of short and tall glandular trichomes of *Nicotiana tabacum* reveals differential metabolic activities. *Journal of Proteome Research* **13**: 3386-3396.
- Sampedro J, Pardo B, Gianzo C, Guitián E, Revilla G, Zarra I. 2010.** Lack of α -xylosidase activity in *Arabidopsis* alters xyloglucan composition and results in growth defects. *Plant Physiology* **154**: 1105-1115.

Literatur

- Santi S, De Marco F, Polizzotto R, Grisan S, Musetti R. 2013.** Recovery from stolbur disease in grapevine involves changes in sugar transport and metabolism. *Frontiers in Plant Science* **4**: 171.
- Sarret G, Harada E, Choi YE, Isaure MP, Geoffroy N, Fakra S, Marcus MA, Birschwilks M, Clemens S, Manceau A. 2006.** Trichomes of tobacco excrete zinc as zinc-substituted calcium carbonate and other zinc-containing compounds. *Plant Physiology* **141**: 1021-1034.
- Scheler U, Brandt W, Porzel A, Rothe K, Manzano D, Božić D, Papaefthimiou D, Balcke GU, Henning A, Lohse S, Marillonnet S, Kanellis AK, Ferrer A, Tissier A. 2016.** Elucidation of the biosynthesis of carnosic acid and its reconstitution in yeast. *Nature Communications* **7**: 12942.
- Schijlen EG, de Vos CH, Martens S, Jonker HH, Rosin FM, Molthoff JW, Tikunov YM, Angenent GC, van Tunen AJ, Bovy AG. 2007.** RNA interference silencing of chalcone synthase, the first step in the flavonoid biosynthesis pathway, leads to parthenocarpic tomato fruits. *Plant Physiology* **144**: 1520-1530.
- Schillmiller AL, Last RL, Pichersky E. 2008.** Harnessing plant trichome for the production of useful compounds. *The Plant Journal* **54**: 702-711.
- Schillmiller AL, Miner DP, Larson M, McDowell E, Gang DR, Wilkerson C and Last RL. 2010.** Studies of a biochemical factory: Tomato trichome deep expressed dequence tag sequencing and proteomics. *Plant Physiology* **153**: 1212-1223.
- Shanker S, Paulson A, Edenberg HJ, Peak A, Perera A, Alekseyev YO, Beckloff N, Bivens NJ, Donnelly R, Gillaspay AF, Grove D, Gu W, Jafari N, Kerley-Hamilton JS, Lyons RH, Tepper C, Nicolet CM. 2015.** Evaluation of commercially available RNA amplification kits for RNA sequencing using very low input amounts of total RNA. *The Journal of Biomolecular Techniques* **26**: 4-18.
- Shepherd RW, Bass WT, Houtz RL, and Wagner GJ. 2005.** Phylloplanins of

tobacco are defensive proteins deployed on aerial surfaces by short glandular trichomes. *The Plant Cell* **17**: 1851-1861.

Simmons AT, Gurr GM, McGrath D, Martin PM, Nicol HI. 2004.

Entrapment of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (*Lepidoptera: Noctuidae*) on glandular trichomes of *Lycopersicon* species. *Australian Journal of Entomology* **43**: 196-200.

Sinlapadech T, Stout J, Ruegger MO, Deak M, Chapple C. 2007. The hyper-fluorescent trichome phenotype of the *brt1* mutant of *Arabidopsis* is the result of a defect in a sinapic acid: UDPG glucosyltransferase. *The Plant Journal* **49**: 655-668.

Smyk B. 2003. Fluorescence study of sinapic acid interaction with bovine serum albumin and egg albumin. *Journal of Fluorescence* **13**: 349-356.

Snyder JC, Guo Z, Thacker R, Goodman JP, Pyrek JS. 1993. 2,3-

Dihydrofarnesoic acid, a unique terpene from trichomes of *Lycopersicon hirsutum*, repels spider mites. *Journal of Chemical Ecology* **12**: 2981-2997.

Spurr AR. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* **26**: 31-43.

Starr MP, Moran F. 1962. Eliminative split of pectic substances by phytopathogenic soft-rot bacteria. *Science* **135**: 920-921.

Stenvik GE, Butenko MA, Urbanowicz BR, Rose JK, Aalen RB. 2006.

Overexpression of INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION activates cell separation in vestigial abscission zones in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **18**: 1467-1476.

Stitt M, Wirtz W, Heldt HW. 1980. Metabolite levels during induction in the chloroplast and extrachloroplast compartments of spinach protoplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* **593**: 85-102.

Literatur

- Stracke R, Werber M, Weisshaar B. 2001.** The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 447-56.
- Talamond P, Verdeil JL, Conéjéro G. 2015.** Secondary metabolite localization by autofluorescence in living plant cells. *Molecules* **20**: 5024-5037.
- Tateishi A, Mori H, Watari J, Nagashima K, Yamaki S, Inoue H. 2005.** Isolation, characterization, and cloning of α -l-arabinofuranosidase expressed during fruit ripening of japanese pear. *Plant Physiology* **138**: 1653–1664.
- Thipyapong P, Hunt MD, Steffens JC. 2004.** Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. *Planta* **220**: 105-117.
- Tissier A. 2012.** Glandular trichomes: what comes after expressed sequence tags? *The Plant Journal* **70**: 51-68.
- Tredwell GD, Edwards-Jones B, Leak DJ, Bundy JG. 2011.** The development of metabolomic sampling procedures for *Pichia pastoris*, and baseline metabolome data. *PLoS One* **6**: e16286.
- Tsuchiya M, Satoh S, Iwai H. 2015.** Distribution of XTH, expansin, and secondary-wall-related CesA in floral and fruit abscission zones during fruit development in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Frontiers in Plant Science* **6**: 323.
- Turner EMC. 1960.** The nature of the resistance of oats to the take-all fungus III. Distribution of the inhibitor in oat seedlings. *Journal of Experimental Botany* **11**: 403-412.
- Turner GW, Gershenzon J, Croteau RB. 2000a.** Development of peltate glandular trichomes of peppermint. *Plant Physiology* **124**: 665-680.
- Turner GW, Gershenzon J, Croteau RB. 2000b.** Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. *Plant Physiology* **124**: 655-664.

- Unzelman JM, Healey PL. 1974.** Development, structure, and occurrence of secretory trichomes of *Pharbitis*. *Protoplasma* **80**: 285-230.
- Urbanowicz BR, Catalá C, Irwin D, Wilson DB, Ripoll DR, Rose JKC. 2007.** A tomato endo- β -1,4-glucanase, SlCel9C1, represents a distinct subclass with a new family of carbohydrate binding modules (CBM49). *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 12066-12074.
- Verhertbruggen Y, Marcus SE, Haeger A, Verhoef R, Schols HA, McCleary BV, McKee L, Gilbert HJ, Knox JP. 2009.** Developmental complexity of arabinan polysaccharides and their processing in plant cell walls. *The Plant Journal* **59**: 413-425.
- Wagner G, Wang E, Shepherd RW. 2004.** New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany* **93**: 3-11.
- Walker BN, Antonakos C, Retterer ST, Vertes A. 2013.** Metabolic differences in microbial cell populations revealed by nanophotonic ionization. *Angewandte Chemie International Edition* **52**: 3650-3653.
- Weathers PJ, Arsenault PR, Covello PS, McMickle A, Teoh KH, Reed D. 2011.** Artemisinin production in *Artemisia annua*: studies in planta and results of a novel delivery method for treating malaria and other neglected diseases. *Phytochemistry Reviews* **10**: 173-183.
- Weinhold A, Baldwin IT. 2011.** Trichome-derived O-acyl sugars are a first meal for caterpillars that tags them for predation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 7855.
- Werker E, Fahn A. 1981.** Secretory hairs of *Inula viscosa* (L.) Ait.-Development, ultrastructure, and secretion. *Botanical Gazette* **142**: 461-476.
- Werker E. 1993.** Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of the *Lamiaceae* - a review. *Flavour and Fragrance Journal* **8**: 249-255.

Literatur

- Werker E. 2000.** Trichome diversity and development. In: Advances in Botanical Research, **31**: Plant Trichomes. Editor: Hallahan D, Gray JC, *Academic Press*.
- Weston PA, Johnson DA, Burton HT, Snyder JC. 1989.** Trichome secretion composition, trichome densities, and spider mite resistance of ten accessions of *Lycopersicon hirsute*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **114**: 492-498.
- Xiao Y, Savchenko T, Baidoo EE, Chehab WE, Hayden DM, Tolstikov V, Corwin JA, Kliebenstein DJ, Keasling JD, Dehesh K. 2012.** Retrograde signaling by the plastidial metabolite MEcPP regulates expression of nuclear stress-response genes. *Cell* **149**: 1525-1535.
- Yamamoto K, Takahashi K, Mizuno H, Anegawa A, Ishizaki K, Fukaki H, Ohnishi M, Yamazaki M, Masujima T, Mimura T. 2016.** Cell-specific localization of alkaloids in *Catharanthus roseus* stem tissue measured with Imaging MS and single-cell MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**: 3891-3896.
- Yoshida K, Komae K. 2006.** A rice family 9 glycoside hydrolase isozyme with broad substrate specificity for hemicelluloses in type II cell walls. *Plant and Cell Physiology* **47**: 1541-1554.
- Zenobi R. 2013.** Single-cell metabolomics: analytical and biological perspectives. *Science* **342**: 1243259.
- Zhang XM, Thacker RR, Snyder JC. 2008.** Occurrence of 2,3-dihydrofarnesoic acid, a spidermite repellent, in trichome secretions of *Lycopersicon esculentum* x *L-hirsutum* hybrids. *Euphytica* **162**: 1-9.
- Zhao Q, Yuan S, Wang X, Zhang Y, Zhu H, Lu C. 2008.** Restoration of mature etiolated cucumber hypocotyl cell wall susceptibility to expansin by pretreatment with fungal pectinases and EGTA in vitro. *Plant Physiology* **147**: 1874-1885.
- Zhao Y. 2014.** Auxin biosynthesis. *Arabidopsis Book* **12**: e0173.

Zirak P, Penzkofer A, Mathes T, Hegemann P. 2009. Photo-dynamics of roseoflavin and riboflavin in aqueous and organic solvents. *Chemical Physics* **358**: 111-122.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben.

An erster Stelle möchte ich mich dabei bei **Prof. Alain Tissier** für die Möglichkeit bedanken in seiner Arbeitsgruppe diese interessante Arbeit anfertigen zu dürfen, die mir neben einem tiefen Einblick in die Morphologie der Typ VI Trichome auch das Erlernen eines breiten Spektrums an Methoden ermöglichte. Ebenfalls danke ich ihm für die stetige Unterstützung und die Bereitschaft zur Diskussion fachlicher Fragestellungen.

Weiterhin bedanke ich mich bei **Prof. Klaus Humbeck** und **Prof. Martin Hülskamp** für die Begutachtung meiner Arbeit.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich auf diesem Wege an **Anja Henning** richten, die mich bei der Arbeit im Labor und im Besonderen bei den unzähligen Stunden der Trichomernte tatkräftig unterstützte.

Für den angeregten Austausch von Ideen und die fachliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit sei mein Dank weiterhin auch an **Dr. habil. Gerd Balcke**, **Prof. Bettina Hause** und **Dr. Thomas Vogt** gerichtet.

Des Weiteren möchte ich mich auch bei allen anderen Mitarbeitern der Abteilung Stoffwechsel- und Zellbiologie des Leibniz-Institutes für Pflanzenbiochemie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft bedanken. Besonders hervorheben möchte ich dabei **Kira Lätari** und **Mandy Dorn** für ihre Hilfe im Labor, **Hagen Stellmach** für die Hilfestellung beim Mikroskopieren, **Dr. Stefan Bennowitz** für die Hilfe bei der Erstellung der Primersequenzen und **Dr. Benedikt Athmer** für die Bearbeitung der RNA-Seq-Daten. Darüber hinaus möchte ich auch unserem Gärtnerteam, insbesondere **Petra Jansen** und **Dagmar Martin** für die Anzucht und Pflege der tausenden Tomatenpflanzen danken, die ich im Laufe meiner Arbeit benötigt habe. Ich weis, ihr werdet mich und meine LA1777 sicher vermissen. ☺

Ebenso möchte ich mich auch bei allen Kooperationspartnern bedanken. Besonders gilt dieser Dank **Dr. Alexander Navarrete Santos** vom Uniklinikum Halle. Sein sonniges

Gemüt und sein Enthusiasmus haben möglich gemacht, was anfänglich aussichtslos erschien und einen entscheidenden Beitrag zur Etablierung der Methode zur Sortierung junger und reifer Trichome geleistet. Darüber hinaus danke ich an dieser Stelle auch **Dr. Gerd Hause** vom Biozentrum Halle für seine Geduld bei der teils sehr zeitaufwändigen Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Weiterhin danke ich Herrn **Frank Syrowatka** vom Interdisziplinärem Zentrum für Materialwissenschaften Halle für die Anfertigung der ESEM Bilder und **Dr. Vesselin Christov** vom Uniklinikum Halle für die Durchführung der RNA-Qualitätsanalyse sowie **Prof. Klaus Theres** vom MPI Köln für die Bereitstellung der Samen der *bli1* RNAi-Linie.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner **Familie** und meinen **Freunden** bedanken die mir bei allen Höhen und Tiefen immer zur Seite standen. Besonders sei dieser Dank an meine **geliebte Frau Carolin Bernholz** und meine **kleine Tochter Amalia** sowie meine **Eltern** und meine Großmutter **Rosemarie Großmann** gerichtet, die mir durch ihre Liebe und Unterstützung die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben. Abschließend sei mein Dank auch an meinen verstorbenen Großvater **Helmut Großmann** und an meine verstorbene Urgroßmutter **Hildegard Bergau** gerichtet, die mich zur Beschreitung dieses Weges motivierten.

8. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit noch nicht als Abschlussarbeit an anderer Stelle eingereicht wurde.

Datum, Unterschrift

9. Anhang

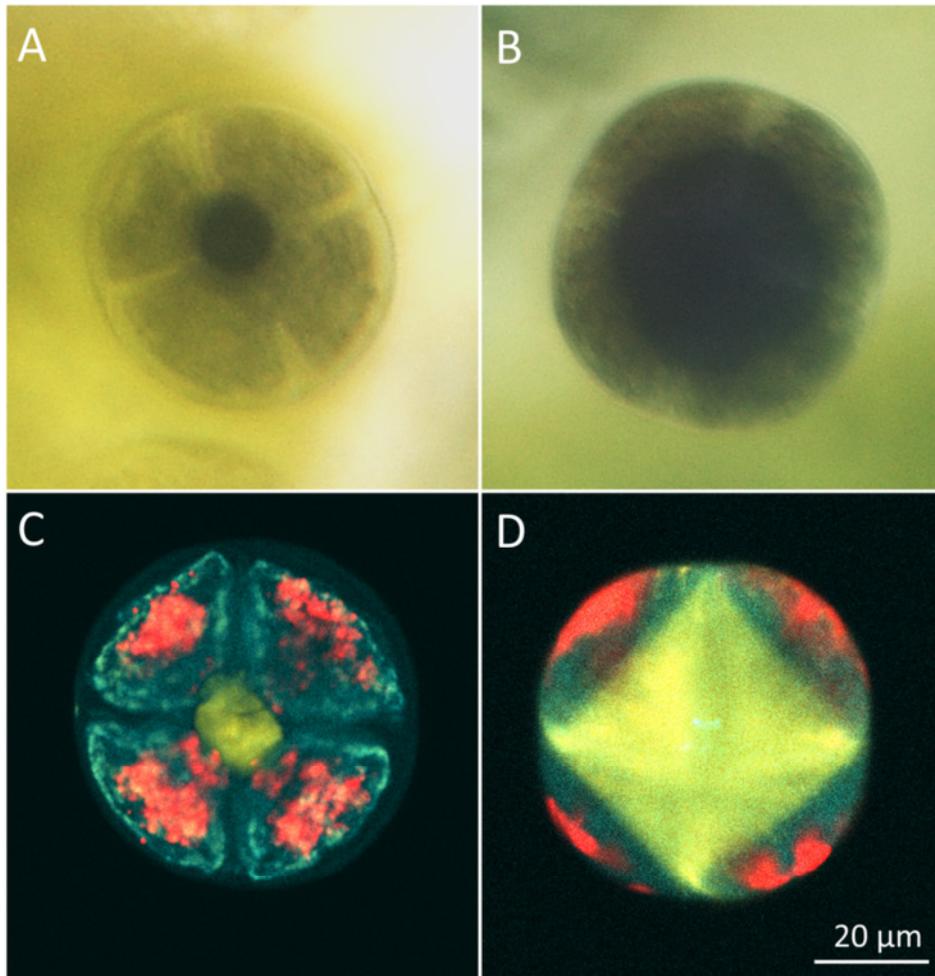


Abbildung A1: Lagerstätte der Sekundärmetabolite in den Typ VI Trichomen von *S. habrochaites* LA1777: Hellfeld- (A, B) und Fluoreszenzmikroskopie (C, D) von NADI- (A, B) und Nilrot-Färbungen (C, D) intakter Typ VI Trichome auf der Oberfläche junger Blätter mit beginnender (A, C) und fortgeschrittener (B, D) Akkumulation von Sekundärmetaboliten. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 405 und 488 nm, die einzelnen Fluoreszenzsignale wurde bei 410-520 nm (cyan), 553-642 nm (gelb) und 645-735 nm (rot) aufgenommen.

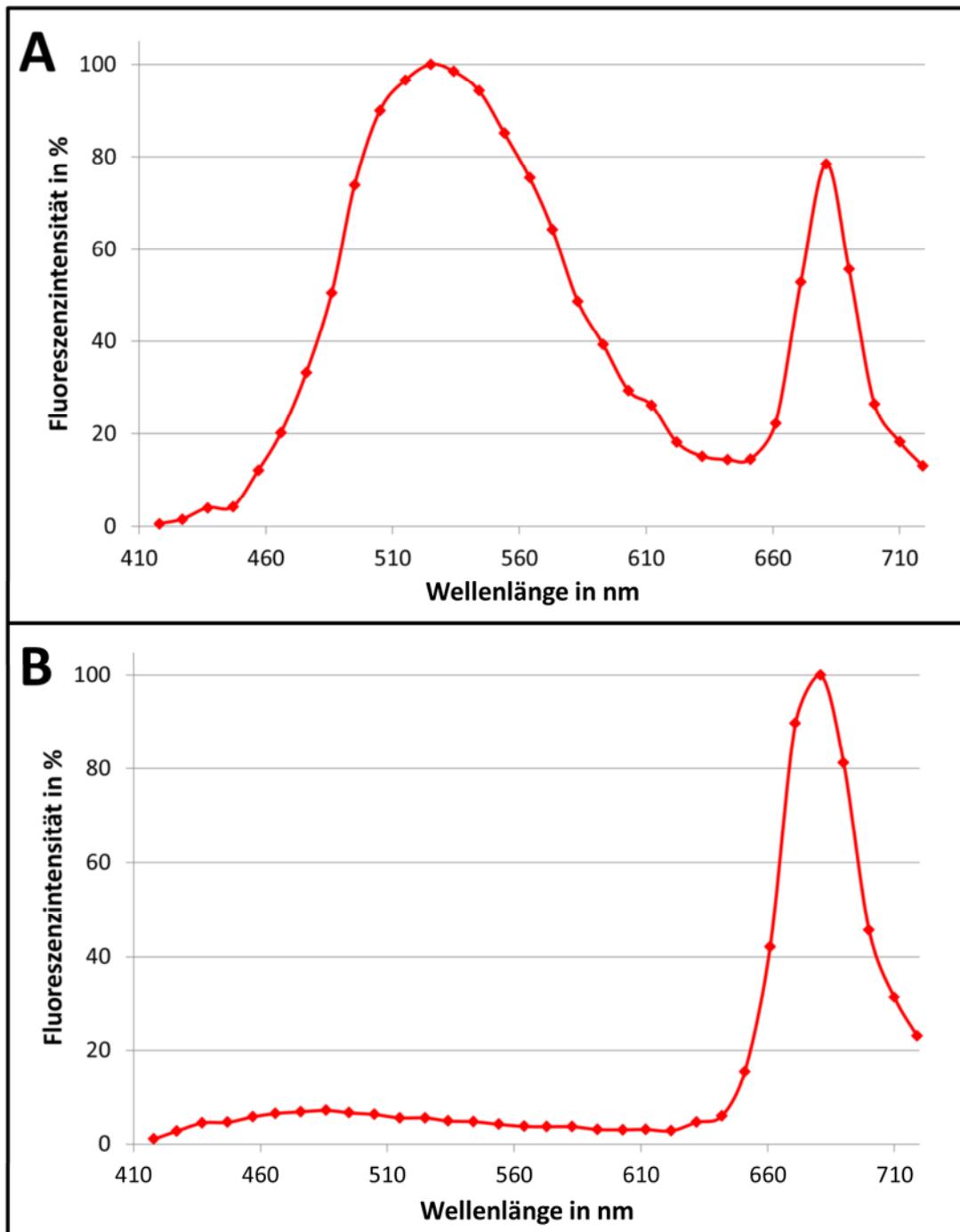


Abbildung A2: Fluoreszenzspektren isolierter Trichome von *S. habrochaites*: Konfokalmikroskopisch aufgenommenes Fluoreszenzspektrum eines jungen (A) und reifen (B) Typ VI Trichoms von *S. habrochaites* LA1777, Ex.: 405 nm, Em.: 418–715 nm.

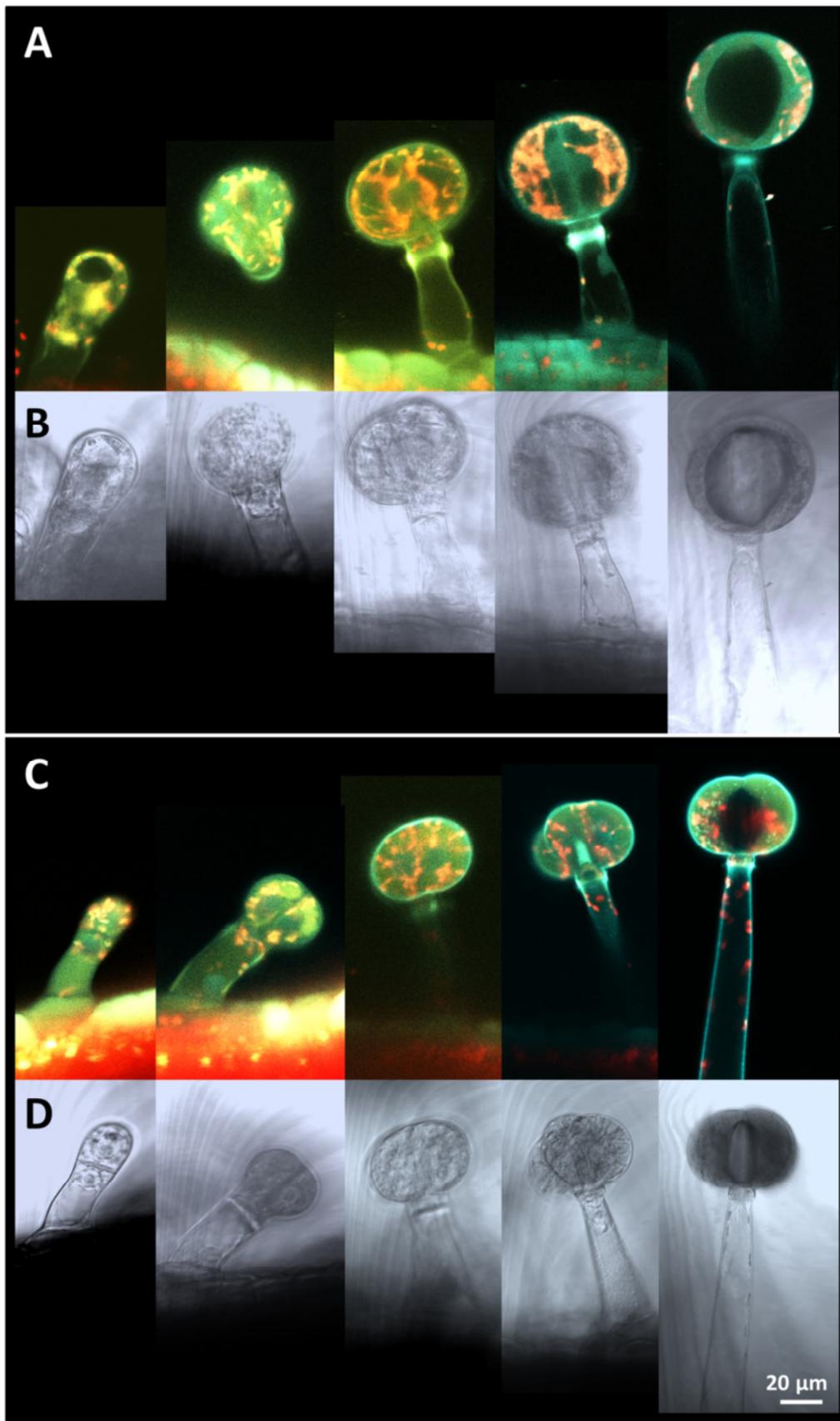


Abbildung A3: Entwicklungsstadien intakter glandulärer Typ VI Trichome: Konfokal- (A, C) und Hellfeldmikroskopie (B, D) von sich-entwickelnden Typ VI Trichomen von *S. habrochaites* LA1777 (A, B) und *S. lycopersicum* LA4024 (C, D). Die Anregung der Autofluoreszenz erfolgte bei 405 nm, die einzelnen Fluoreszenzsignale wurde bei 410-480 nm (cyan), 490-580 nm (gelb) und 645-735 nm (rot) aufgenommen.

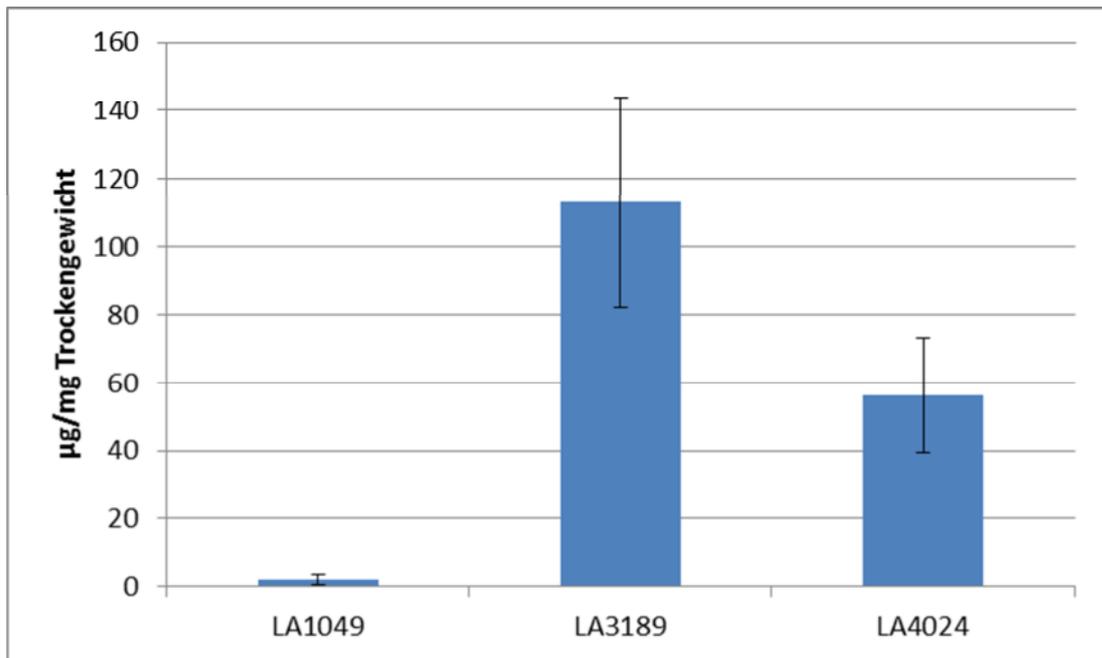


Abbildung A4: Rutinhalt der Trichome verschiedener Tomatenlinien: Gehalte des Flavonoid-Konjugates Rutin in isolierten Trichomen der Mutantenlinien LA1049 und LA3189 sowie der Wildtyplinie LA4024 von *S. lycopersicum*, n=3.

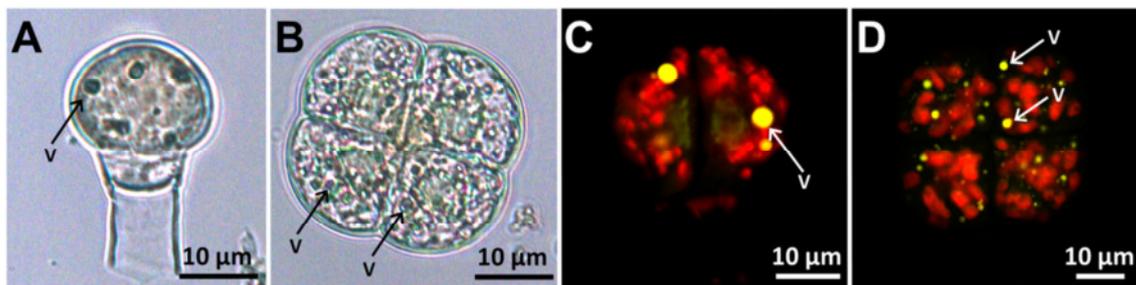


Abbildung A5: Vesikelförmige Strukturen in den Typ VI Trichomen von LA1049: Hellfeld- (A, B) und Konfokalmikroskopische Aufnahmen (C, D) der gelb-grün fluoreszierenden Vesikel (V) in den jungen (A, C) und reifen (B, D) Typ VI Trichomen der Chalconisomerase-Mutantenlinie LA1049.

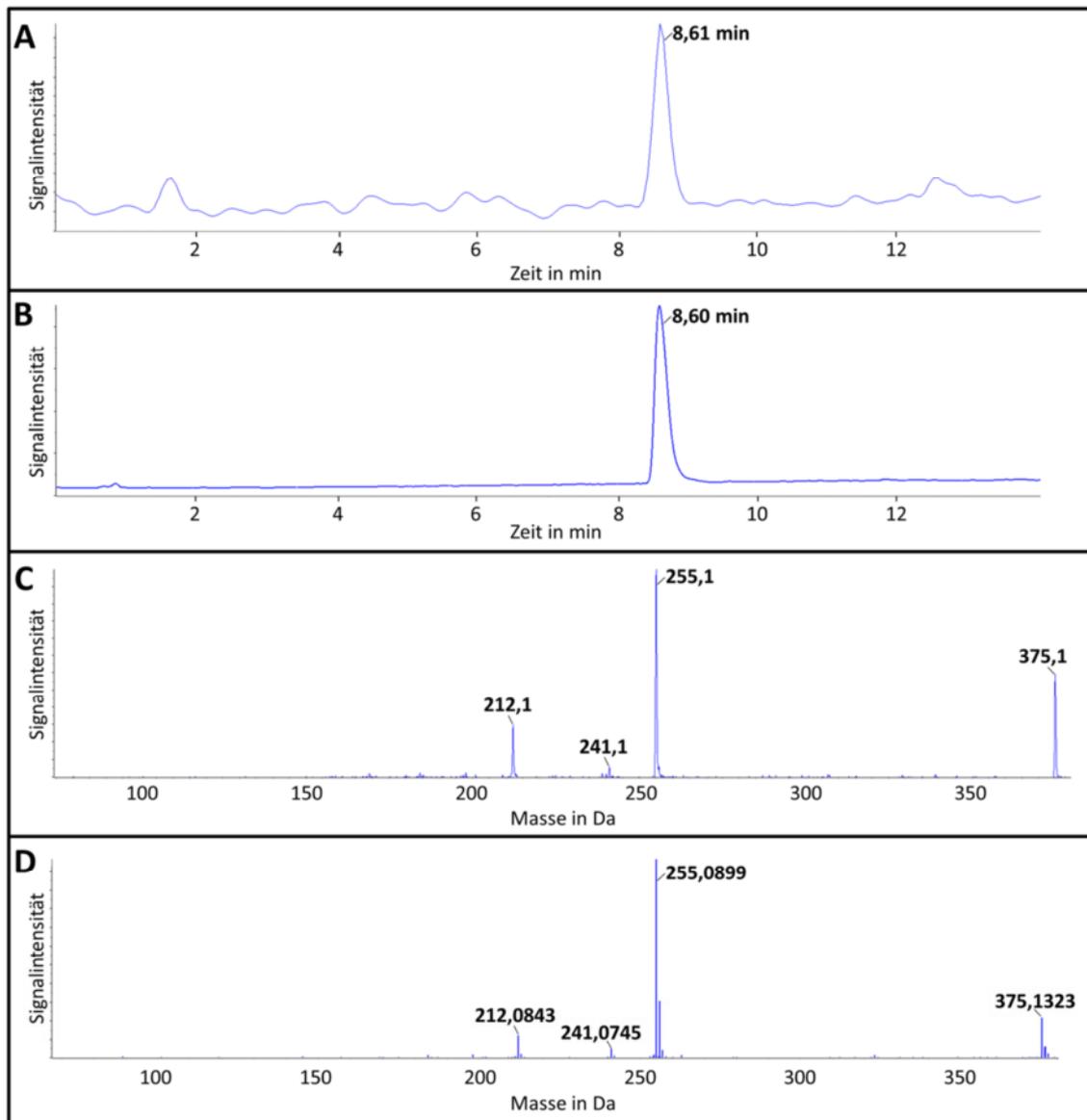


Abbildung A6: Massenspektrometrischer Abgleich der fluoreszierenden Substanz aus LA1049 Trichomen mit Riboflavin: Extrahierte Ionenchromatogramme der Massen $375,1 \pm 0,1$ Da (A) und $375,13 \pm 0,025$ Da (B) sowie deren MS²-Fragmentspektren (C, D) eines methanolischen LA1049 Trichomextraktes (A, C) und eines Riboflavinstandards (B, D). Die Analyse des Trichomextraktes wurde an einem QTrap 6500 Massenspektrometer im EPI-Modus durchgeführt. Die Analyse des Riboflavinstandards wurde an einem QTOF 5600 Massenspektrometer im SWATH-Modus durchgeführt.

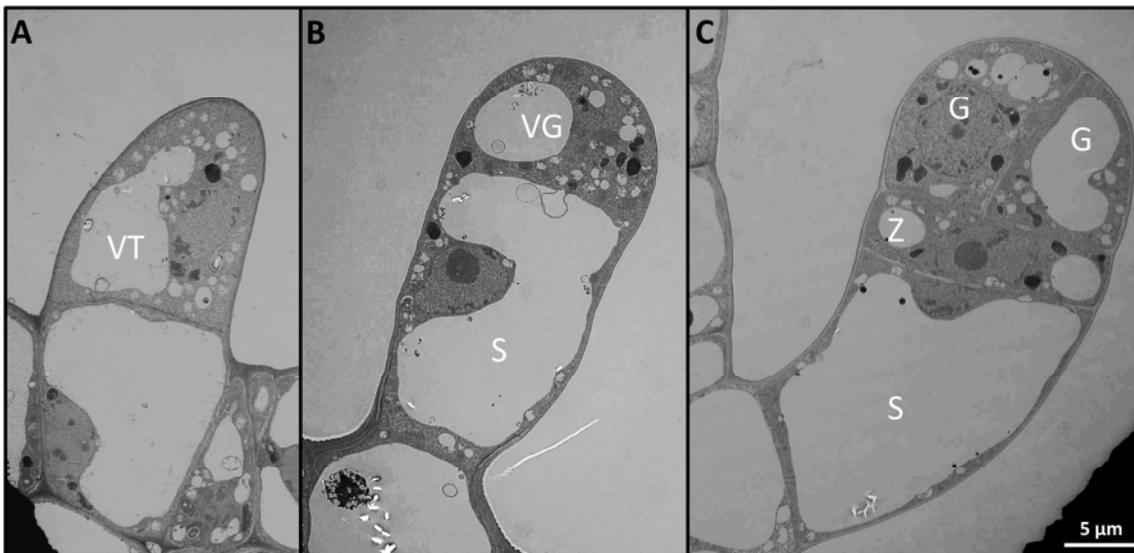


Abbildung A7: Frühe Entwicklungsstadien der Typ VI Trichome von *S. habrochaites*: TEM Aufnahmen junger Trichome von *S. habrochaites* LA1777. Möglicher Vorläufer eines Typ VI Trichoms (VT; A) sowie Differenzierung eines jungen Typ VI Trichoms in Stiel (S) und Vorläufer des glandulären Köpfchen (VG; B), bzw. in Stiel (S), Zwischenzelle (Z) und glanduläre Zellen (G; C).

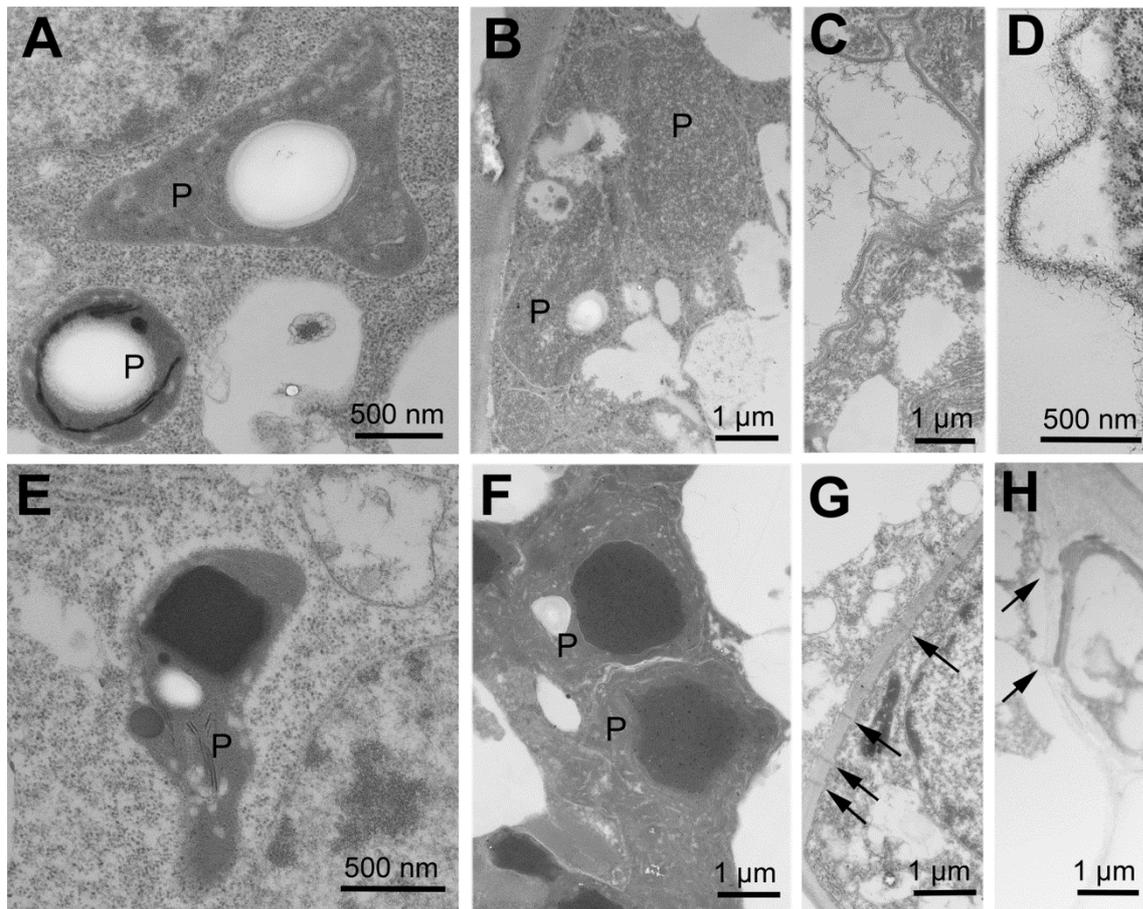


Abbildung A8: Elektronenmikroskopische (TEM) Detailaufnahmen des sekretorischen Köpfchens der Typ VI Trichome: Nahaufnahmen der Plastiden (P) von jungen (A, E) und reifen (B, F) Typ VI Trichomen von *S. habrochaites* (A, B) und *S. lycopersicum* (E, F). Aufnahme des Randbereiches des entstehenden Hohlraumes in sich entwickelnden Typ VI Trichomen von *S. habrochaites* (C) mit einer Nahaufnahme der sich auflösenden Zellwände (D). Detailaufnahme der Plasmodesmata (Pfeile) zwischen Stielzelle und Zwischenzelle (G) bzw. zwischen Zwischenzelle und einer Zelle des glandulären Köpfchens (H) bei *S. habrochaites*.

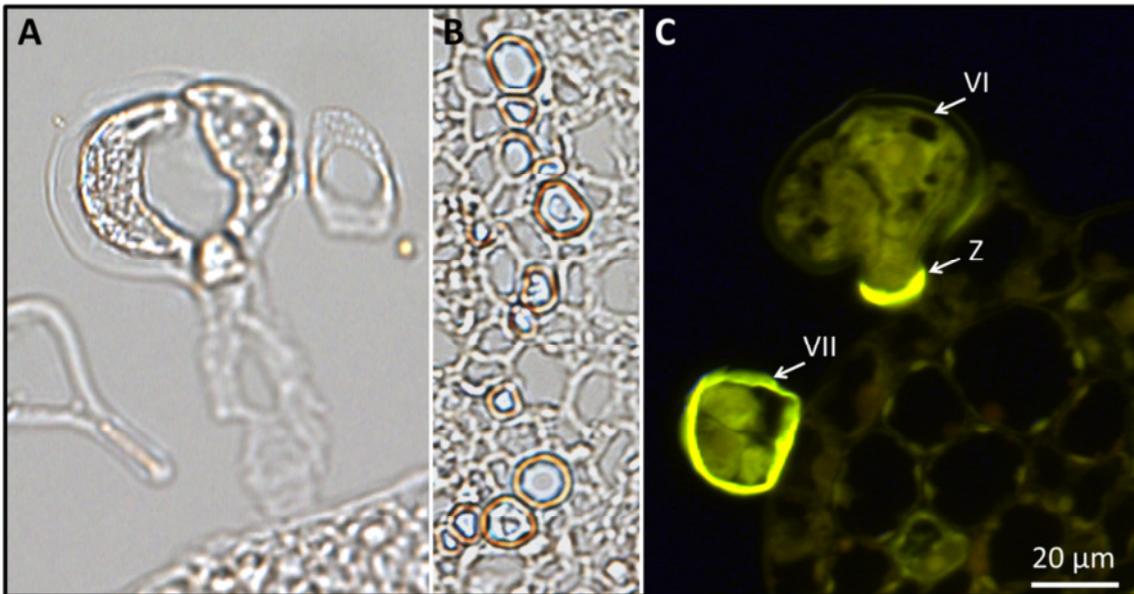


Abbildung A9: Anfärbung von Lignin und Suberin: Färbung von Lignin mittels Phloroglucinol von einem Typ VI Trichom (A) und dem Xylem (Positivkontrolle; B) eines jungen *S. habrochaites* LA1777 Blattes. Färbung von Suberin mittels Fluorol yellow 088 (C) eines Typ VI Trichoms (VI) mit Zwischenzelle (Z) sowie eines Typ VII Trichoms (VII).

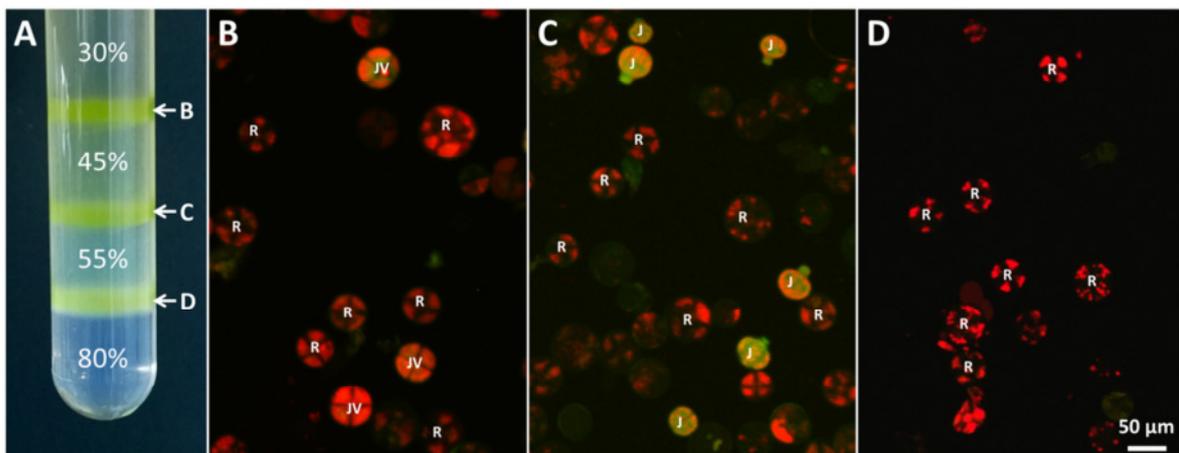


Abbildung A10: Sortierung junger und reifer Typ VI Trichome von *S. habrochaites* LA1777 mittels Percoll®-Dichtegradient: Auftrennung der Trichome in einem Percoll®-Sorbitol-Gradienten nach der Zentrifugation (A). Anreicherung junger vierzelliger Trichome ohne sekretorischen Hohlraum (JV) in der obersten Bande (B). Anreicherung junger ein- und zweizelliger Trichome (J) in der mittleren Bande (C). Reine Fraktion von reifen Typ VI Trichomen (R) in der untersten Bande (D).

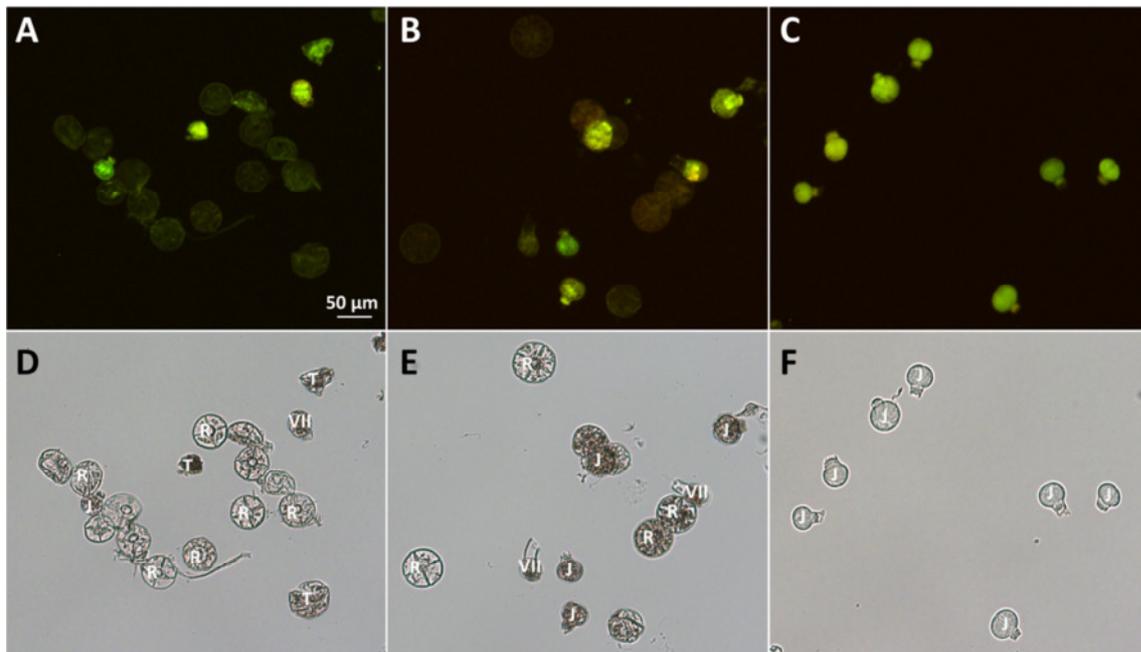


Abbildung A11: Anreicherung junger Typ VI Trichome von *S. habrochaites* in Ethanol/ RNAlater®: Autofluoreszenz (A-C) und Hellfeldmikroskopie (D-F) von jungen (J) und reifen (R) Typ VI Trichomen, Typ VII Trichomen (VII) und Zelltrümmern (T) von Trichomfraktionen nach Sieben (A, D), Dichtegradientenzentrifugation (B, E) und Durchflusszytometrie (C, F).

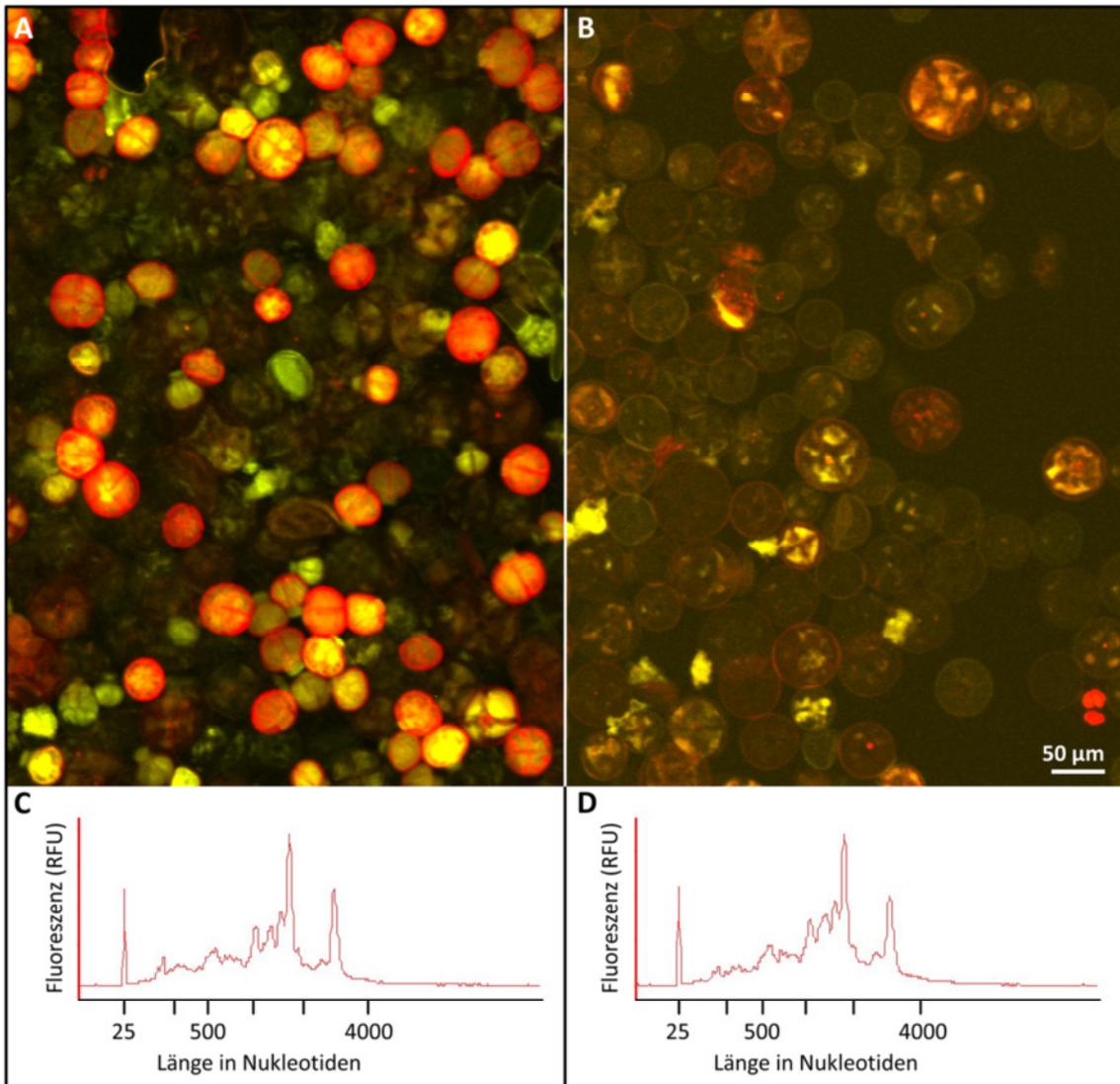


Abbildung A12: Anreicherung von jungen Typ VI Trichomen von *S. habrochaites* für die RNA-Seq-Analyse: Autofluoreszenzmikroskopie einer angereicherten Fraktion junger (A) bzw. reifer (B) Typ VI Trichome sowie Kapillarelektrophoresechromatogramme von Gesamt-RNAs, die aus jungen (C) und reifen (D) Trichomen isoliert wurden, RFU - *Relative Fluorescent Units*.

Lebenslauf

Zur Person:

Name: Bergau, Nick
 Geboren am: 23.05.1989
 Geburtsort: Annaberg- Buchholz
 Familienstand: ledig, 2 Kinder
 Anschrift: Lindenweg 10
 06120 Halle (Saale)

Ausbildung:

10/2013 - dato **Doktorarbeit** am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB) in der Arbeitsgruppe Glanduläre Trichome und Isoprenoidbiosynthese zum Thema "Die Entwicklung der glandulären Typ VI Trichome von wilden (*Solanum habrochaites*) und kultivierten Tomaten (*Solanum lycopersicum*)"

02/2013 - 09/2013 **Masterarbeit** am IPB in der Arbeitsgruppe Glanduläre Trichome und Isoprenoidbiosynthese zum Thema "Vergleichende Metabolomik von glandulären Trichomen und Blättern von wilden (*Solanum habrochaites*) und kultivierten Tomaten (*Solanum lycopersicum*)"

10/2011 - 09/2013 **Masterstudium** Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg
 Abschluss: Master of Science Biochemie

10/2008 - 09/2011 **Bachelorstudium** Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg
 Abschluss: Bachelor of Science Biochemie

Schulbildung:

2000 - 2008 Landkreisdgymnasium Sankt Annen Annaberg-Buchholz
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1996 - 2000 Grundschule Sehma

Spezielle Fertigkeiten:

Führerschein Klasse B
 Englisch Fachsprachenzertifikat Unizert Stufe 2

Halle, 27.04.2017

Publikationsliste:

Balcke GU, Bennewitz S, Bergau N, Athmer B, Henning A, Majovsky P, Jiménez-Gómez JM, Hoehenwarter W, Tissier AF. 2017. Multiomics of tomato glandular trichomes reveals distinct features of central carbon metabolism supporting high productivity of specialized metabolites. *Plant Cell* (im Druck).

Bergau N, Santos AN, Henning A, Balcke GU, Tissier A. 2016. Autofluorescence as a signal to sort developing glandular trichomes by flow cytometry. *Frontiers in Plant Science* **7**: 949.

Bergau N, Bennewitz S, Syrowatka F, Hause G, Tissier A. 2015. The development of type VI glandular trichomes in the cultivated tomato *Solanum lycopersicum* and a related wild species *S. habrochaites*. *BMC Plant Biology* **15**: 289.

Nagel R, Bernholz C, Vranová E, Košuth J, Bergau N, Ludwig S, Wessjohann L, Gershenzon J, Tissier A, Schmidt A. 2015. *Arabidopsis thaliana* isoprenyl diphosphate synthases produce the C25 intermediate, geranylarnesyl diphosphate. *The Plant Journal* **84**: 847-859.

Balcke GU, Handrick V, Bergau N, Fichtner M, Henning A, Stellmach H, Tissier A, Hause B, Frolov A. 2012. An UPLC-MS/MS method for highly sensitive high-throughput analysis of phytohormones in plant tissues. *Plant Methods* **8**: 47.