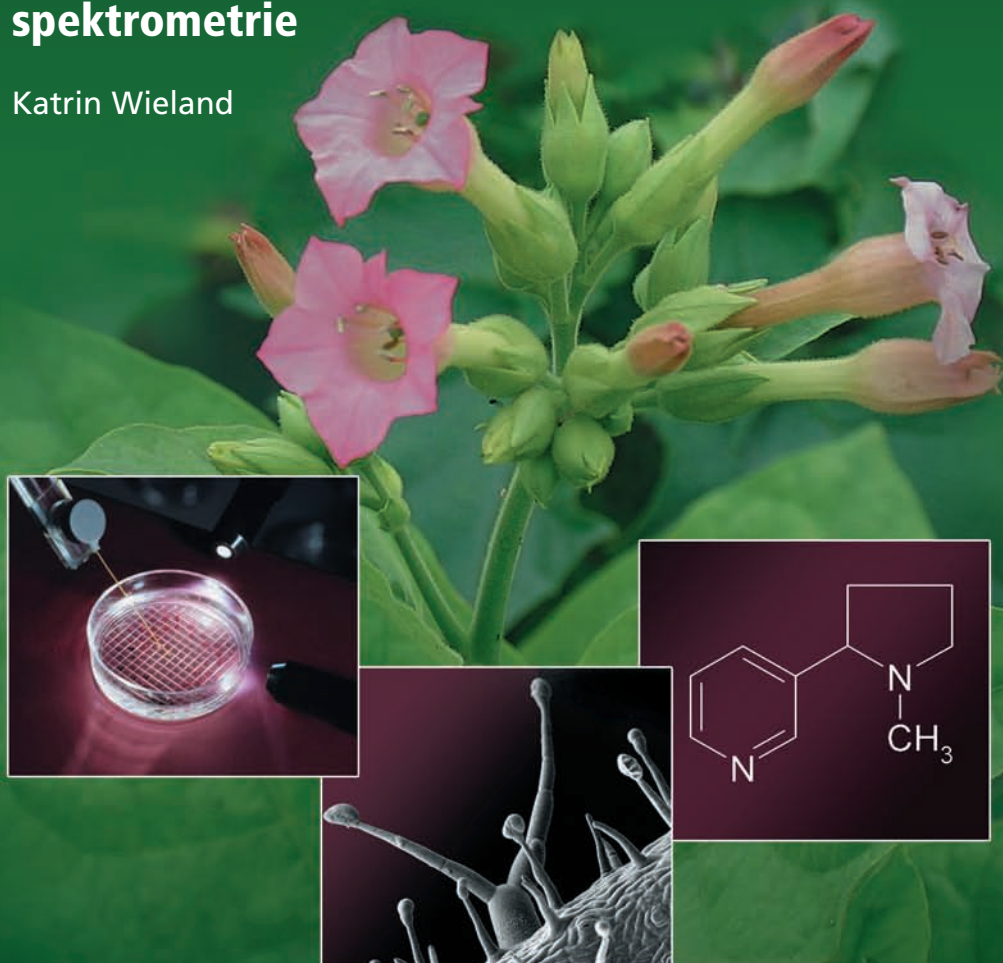


Bestimmung der Nicotinverteilung und anderer Stickstoffverbindungen in den Blattgeweben von *Nicotiana tabacum* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen durch Einzelzellanalyse, Kapillarelektrophorese und der Massenspektrometrie

Katrin Wieland



Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre III: Phytosphäre

**Bestimmung der Nicotinverteilung und anderer
Stickstoffverbindungen in den Blattgeweben
von *Nicotiana tabacum* unter verschiedenen
Wachstumsbedingungen durch Einzelzellanalyse,
Kapillarelektrophorese und der Massen-
spektrometrie**

Katrin Wieland

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Umwelt/Environment

Band/Volume 68

ISSN 1433-5530

ISBN 3-89336-458-7

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten sind im Internet
über <<http://dnb.d-nb.de>> abrufbar.

Herausgeber
und Vertrieb: Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralbibliothek, Verlag
D-52425 Jülich
Telefon: 02461 61-5368 · Telefax: 02461 61-6103
e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de
Internet: <http://www.fz-juelich.de/zb>

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2006

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Umwelt/Environment Band/Volume 68

D 91 (Diss., TU München, 2005)

ISSN 1433-5530
ISBN-10: 3-89336-458-7
ISBN-13: 978-3-89336-458-9

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Druck, Fotokopie oder
in einem anderen Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder unter
Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Meinen Großeltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Aufgabenstellung	3
1.3	Grundlagen	4
1.3.1	Analytische Grundlagen	4
	Anforderungen an ein analytisches System für pflanzliche Mikroproben	4
	Anwendung von Trenntechniken für pflanzliche Mikroproben	6
	Kapillarelektrophorese	8
	Phytochemische Analyse mit der CE	23
	Einzelzellanalytik mit der CE	25
	Bestimmung von Tabakalkaloiden mit der CE	31
	Massenspektrometrie	32
	Elektronenmikroskopie	43
1.3.2	Biologische Grundlagen	46
	Anatomie eines Blattes	46
	Morphologie der Pflanzenzelle	49
	Stickstoffhaushalt der Pflanzen	52
	Sekundärstoffwechsel von Pflanzen	54
	Synthese und Bedeutung von Alkaloiden in Pflanzen	56
2	Experimenteller Teil	67
2.1	Material	67
2.1.1	Verwendete Geräte	67
2.1.2	Chemikalien	72
2.1.3	Pflanzenmaterial	73
2.2	Methoden	76
2.2.1	Trennung der Tabakalkaloide mit der CE	76
2.2.2	Methode zur Probennahme und Handhabung von Proben aus Einzelzellen	78
	Probennahme aus einzelnen Vakuolen	78
	Probenvorbereitung	81
	Injektion in die Trennkapillare der Kapillarelektrophorese	87
	Kontamination der Probe	89
	Extraktion der Analyten durch das Paraffinöl	91
2.2.3	Pflanzliche Extrakte	92
3	Ergebnisse und Diskussion	93
3.1	Untersuchung der Tabakalkaloide von <i>Nicotiana tabacum</i> mittels Einzelzellanalyse und Kapillarelektrophorese	94
3.1.1	Bestimmung der Tabakalkaloide und deren Verteilung innerhalb einer Pflanze bei Ernährung unter normalen Bedingungen	98
	Obere und untere Epidermis	98
	Epidermis und Mesophyll	102
	Trichome	103
3.1.2	Bestimmung der Tabakalkaloide und deren Verteilung innerhalb einer Pflanze bei Ernährung unter Stickstoffmangel	117
	Obere und untere Epidermis	117
	Epidermis und Mesophyll	121
	Trichome	122
3.1.3	Vergleich der Tabakalkaloide und deren Verteilung innerhalb einer Pflanze bei normaler Ernährung und unter Stickstoffmangel	129
	Epidermis und Mesophyll	129

Inhaltsverzeichnis

	Trichome	130
3.2	Untersuchung der Nicotinverteilung über die Blattetagen von <i>Nicotiana tabacum</i> durch Extraktion von Blattsegmenten	141
3.2.1	Nicotinverteilung bei Ernährung unter normalen Bedingungen	142
3.2.2	Nicotinverteilung bei Ernährung unter Stickstoffmangel	143
3.3	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Nicotiana tabacum</i>	145
3.4	Untersuchung stickstoffhaltiger Verbindungen in <i>Nicotiana tabacum</i> mittels Kapillarelektrophorese/Massenspektrometrie	152
4	Ausblick	167
5	Zusammenfassung	169
6	Literaturverzeichnis	174

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung einer Kapillarelektrophoreseapparatur	8
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Wanderung der Ionen	10
Abbildung 3:	Ursachen des Elektroosmotischen Flusses (EOF)	13
Abbildung 4:	Strömungsprofile	14
Abbildung 5:	Abhängigkeit der elektroosmotischen Mobilität vom pH-Wert des Trennelektrolyten	17
Abbildung 6:	Auswirkung der Elektrodispersion auf die Konzentrationsverteilung der Ionen in der Analytzone	21
Abbildung 7:	Der ESI-Prozess, makroskopisch	34
Abbildung 8:	Der ESI-Prozess, mikroskopisch	35
Abbildung 9:	Schematische Darstellung eines Blattes	46
Abbildung 10:	Kompartimente einer Pflanzenzelle	49
Abbildung 11:	Kreislauf des Stickstoffs	53
Abbildung 12:	Alkaloid als stickstoffhaltiges Ringsystem und der Fähigkeit zur Anlagerung von H^+ -Ionen	57
Abbildung 13:	Die drei mengenmäßig hauptsächlich vorkommenden Alkaloide des Tabaks – Nicotin, Nornicotin und Anabasin	59
Abbildung 14:	Biosynthese der Nicotinsäure	61
Abbildung 15:	Biosynthese des <i>N</i> -Methyl- Δ' -pyrrolium-Salzes	62
Abbildung 16:	Bildung von (-)-2'- <i>S</i> -Nicotin, Nornicotin und Myosmin aus Nicotinsäure und <i>N</i> -Methyl- Δ' -pyrrolium-Salz	63
Abbildung 17:	Elektropherogramm der Trennung eines Tabakalkaloidstandards	77
Abbildung 18:	Schematische Darstellung der Apparatur zur Probenahme aus Einzelzellen	80
Abbildung 19:	Schematische Darstellung der Anordnung zur Probenahme	80
Abbildung 20:	Visualisierung eines Tropfens im pl Bereich	82
Abbildung 21:	Konstriktionskapillare mit Aliquoten vakuolärer Proben mit identischem Volumen	84
Abbildung 22:	Probenvorbereitung der vakuolären Proben vor der Injektion in das CE-System	86
Abbildung 23:	Experimenteller Aufbau der zur Injektion präparierten Einzelzellenproben in die Kapillarelektrophorese	87

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 24:	Injektion des Probetropfens in die Trennkapillare der Kapillarelektrophorese	87
Abbildung 25:	Injektion von nl Tropfen mit einer normalen CE-Kapillare (A) und einer am Ende konisch geschliffenen Kapillare (B)	88
Abbildung 26:	Elektropherogramm einer Einzelzellprobe	90
Abbildung 27:	Bestimmung der Tabakalkaloide in einer Einzelzellprobe	95
Abbildung 28:	Vergleich der Nicotinverteilung in der oberen und unteren Epidermis von Blattspitze sowie Blattgrund eines ausdifferenzierten Blattes vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung des Blattes	99
Abbildung 29:	Vergleich der Nicotinverteilung in der oberen und unteren Epidermis an der Blattspitze eines ausdifferenzierten Blattes vor und bis zu 4 Tage nach der Verwundung des Blattes	100
Abbildung 30:	Vergleich der Nicotinverteilung in der oberen Epidermis jeweils an der Blattspitze zweier benachbarter Blätter vor und bis zu 7 Tage nach der Verwundung des älteren Blattes	101
Abbildung 31:	Vergleich der Nicotinverteilung in den verschiedenen Geweben an der Blattspitze eines ausdifferenzierten Blattes vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung des Blattes	102
Abbildung 32:	Verteilung der Tabakalkaloide in Trichomen der Blattspitze eines ausdifferenzierten Blattes	104
Abbildung 33:	Verlauf der Nicotinkonzentration in Trichomen auf der Blattoberseite eines ausdifferenzierten Blattes	105
Abbildung 34:	Verlauf der Nornicotinkonzentration in Trichomen auf der Blattoberseite eines ausdifferenzierten Blattes	106
Abbildung 35:	Verlauf der Anabasinkonzentration in Trichomen auf der Blattoberseite eines ausdifferenzierten Blattes	107
Abbildung 36:	Vergleich der Verteilung von Nicotin in Trichomen der Blattoberseite über mehrere Blattetagen	108
Abbildung 37:	Vergleich der Verteilung von Nornicotin in Trichomen der Blattoberseite über mehrere Blattetagen	109
Abbildung 38:	Verteilung von Anabasin in Trichomen der Blattoberseite über mehrere Blattetagen	110
Abbildung 39:	Vergleich der Nicotinverteilung über das ganze Blatt in Trichomen auf der Blattoberseite	112

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 40:	Vergleich der Nornicotinverteilung über das ganze Blatt in Trichomen auf der Blattoberseite	113
Abbildung 41:	Vergleich der Anabasinverteilung über das ganze Blatt in Trichomen auf der Blattoberseite	114
Abbildung 42:	Vergleich der Nicotinkonzentration in Trichomen von jeweils einem ausdifferenzierten Blatt und einem jungen Blatt von drei verschiedenen Pflanzen	115
Abbildung 43:	Vergleich der Nicotinkonzentration in Trichomen von einem ausdifferenzierten Blatt und einem jungen Blatt vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung	116
Abbildung 44:	Vergleich der Nicotinverteilung in der oberen und unteren Epidermis von Blattspitze sowie Blattgrund eines ausdifferenzierten Blattes vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung des Blattes	118
Abbildung 45:	Vergleich der Nicotinverteilung in der oberen und unteren Epidermis an der Blattspitze eines ausdifferenzierten Blattes vor und bis zu 4 Tage nach der Verwundung des Blattes	119
Abbildung 46:	Vergleich der Nicotinverteilung in der oberen Epidermis jeweils an der Blattspitze zweier benachbarter Blätter vor und bis zu 7 Tage nach der Verwundung des älteren Blattes	120
Abbildung 47:	Vergleich der Nicotinverteilung in den verschiedenen Geweben an der Blattspitze eines ausdifferenzierten Blattes vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung des Blattes	121
Abbildung 48:	Vergleich der Verteilung von Nicotin in Trichomen der Blattoberseite über mehrere Blattetagen	122
Abbildung 49:	Vergleich der Verteilung von Nornicotin in Trichomen der Blattoberseite über mehrere Blattetagen	123
Abbildung 50:	Vergleich der Verteilung von Nicotin in Trichomen der Blattoberseite über mehrere Blattetagen	124
Abbildung 51:	Vergleich der Nicotinverteilung über das ganze Blatt in Trichomen auf der Blattoberseite	126
Abbildung 52:	Vergleich der Nornicotinverteilung über das ganze Blatt in Trichomen auf der Blattoberseite	127
Abbildung 53:	Vergleich der Anabasinverteilung über das ganze Blatt in Trichomen auf der Blattoberseite	128

- Abbildung 54: Vergleich der Nicotinverteilung in den verschiedenen Geweben an der Blattspitze eines ausdifferenzierten Blattes vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung des Blattes; blaue Darstellung: Pflanzen unter normalen Bedingungen kultiviert; rote Darstellung: Pflanzen unter Stickstoffmangel 129
- Abbildung 55: Vergleich der Nicotinverteilung in Trichomen der Blattoberseite über mehrere Blattetagen, jeweils auf der Blattspitze, vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung von Blatt 6 bei normaler Ernährung (blaue Darstellung) und bei Stickstoffmangel (rote Darstellung) ; Blatt 6 stellt ein voll ausdifferenziertes Blatt dar, Blatt 15 das jüngste aus der Knospe herausgetretene Blatt 131
- Abbildung 56: Vergleich der Nicotinverteilung in Trichomen der Blattoberseite über mehrere Blattetagen, jeweils auf der Blattspitze, vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung von Blatt 6 bei normaler Ernährung (blaue Darstellung) und bei Stickstoffmangel (rote Darstellung); Blatt 6 stellt ein voll ausdifferenziertes Blatt dar, Blatt 15 das jüngste aus der Knospe herausgetretene Blatt 132
- Abbildung 57: Vergleich der Anabasinverteilung in Trichomen der Blattoberseite über mehrere Blattetagen, jeweils auf der Blattspitze, vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung von Blatt 6 bei normaler Ernährung (blaue Darstellung) und bei Stickstoffmangel (rote Darstellung); Blatt 6 stellt ein voll ausdifferenziertes Blatt dar, Blatt 15 das jüngste aus der Knospe herausgetretene Blatt 133
- Abbildung 58: Vergleich der Nicotinverteilung über das ganze Blatt in Trichomen auf der Blattoberseite, jeweils in einem ausdifferenzierten Blatt und einem jungen Blatt vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung von dem ausdifferenzierten Blatt; links: bei normaler Ernährung; rechts: bei Ernährung unter Stickstoffmangel 135
- Abbildung 59: Vergleich der Nicotinverteilung über das ganze Blatt in Trichomen auf der Blattoberseite, jeweils in einem ausdifferenzierten Blatt und einem jungen Blatt vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung von dem ausdifferenzierten Blatt; links: bei normaler Ernährung; rechts: bei Ernährung unter Stickstoffmangel 136

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 60:	Vergleich der Anabasinverteilung über das ganze Blatt in Trichomen auf der Blattoberseite, jeweils in einem ausdifferenzierten Blatt und einem jungen Blatt vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung von dem ausdifferenzierten Blatt; links: bei normaler Ernährung; rechts: bei Ernährung unter Stickstoffmangel	137
Abbildung 61:	Nicotinverteilung über jeweils die einzelnen Blattregionen und Blattetagen einer Pflanze; angefangen bei einer Pflanze ohne mechanische Verwundung bis hin zu einer Pflanze am 7. Tag nach einer mechanischen Verwundung; normale Ernährung	142
Abbildung 62:	Nicotinverteilung über jeweils die einzelnen Blattregionen und Blattetagen einer Pflanze; angefangen bei einer Pflanze ohne mechanische Verwundung bis hin zu einer Pflanze am 7. Tag nach einer mechanischen Verwundung; Stickstoffmangel	143
Abbildung 63:	Blattausschnitt mit den verschiedenen Typen von Trichomen	146
Abbildung 64:	Kurze Trichome bzw. Hydathoden, die kleine Wassertropfen absondern	147
Abbildung 65:	Langes, drüsenhaltiges Trichom mit einem Sekrettropfen	147
Abbildung 66:	Drüsenhaltiges, zweiarmliges Trichom	148
Abbildung 67:	Kopf eines langen drüsenhaltigen Trichoms mit Kristallen	148
Abbildung 68:	Blattader mit einer Vielzahl von Trichomen	149
Abbildung 69:	Links: junges Blatt mit sehr vielen Trichomen; rechts: ausdifferenziertes Blatt mit deutlich weniger Trichomen als bei dem jungen Blatt	150
Abbildung 70:	Blattausschnitt mit teilweise geschlossenen bzw. leicht geöffneten Stomata	150
Abbildung 71:	Totalionenstrom-Elektropherogramm (TIC) der untersuchten Probe A	157
Abbildung 72:	Totalionenstrom-Elektropherogramm (TIC) der Doppelbestimmung der untersuchten Probe A	157
Abbildung 73:	Analyse der Probe A. A: Total Ion Current (TIC) Elektropherogramm; B - F: Elektropherogramme auf den Ionenspuren von: m/z 163 (B), m/z 264 (C), m/z 205 (D), m/z 203 (E), m/z 246 (F)	160

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 74: Übereinander gelegte Elektropherogramme auf den jeweiligen 161
Ionenspuren der beiden Messungen von Probe A; A: Nicotin, B:
Subaphyllin, C: 1,4 Dihydro-6-hydroxy-4-oxo-2quinolinonsäure, D:
6,7-Dihydro-1,3,6,6-tetramethyl-isoquinolinon, E: N-Hexanoyl-
nornicotin
- Abbildung 75: Spektrum des anhand der Molmasse 163 identifizierten Nicotins 162
(siehe Abbildung 73)
- Abbildung 76: Spektrum des anhand der Molmasse 264 identifizierten Subaphyllins 163
(siehe Abbildung 73)

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Kapillartrennverfahren für pflanzliche Mikroproben	7
Tabelle 2:	Die verschiedenen Techniken der Kapillarelektrophorese	9
Tabelle 3:	Mögliche Modifikationen zur Beeinflussung des EOF	17
Tabelle 4:	Analyse pflanzlicher Proben mit der Kapillarelektrophorese	24
Tabelle 5:	Kapillar- und Injektionsvolumina für CE-Kapillaren verschiedener Innendurchmesser	25
Tabelle 6:	Analyse von Einzelzellen mit der CE	27
Tabelle 7:	Alkaloide in Pflanzen	58
Tabelle 8:	Abhängigkeit der Ionenformen der Tabakalkaloide vom pH-Wert	60
Tabelle 9:	Programm zum Ziehen der Glasmikrokapillaren: Zug in 2 Schritten	69
Tabelle 10:	Stammlösung A	75
Tabelle 11:	Stammlösung B	75
Tabelle 12:	Im Tabak vorkommende Alkaloide	153
Tabelle 13:	Übersicht über die Verteilung der Alkaloide in den verschiedenen Proben	166

Abkürzungsverzeichnis

α	Ionisierungsgrad
A.D.	Außendurchmesser Ionisation
API	Atmospheric Pressure
APCI	chemische Ionisation unter Atmosphärendruck
ATP	Adenosintriphosphat
°C	Grad Celsius
c	Konzentration
ca.	circa
CE	Kapillarelektrophorese
CEC	Kapillarelektrochromatographie
CFFAB	Continuos Flow Fast Atom Bombardment
CGE	Kapillargelelektrophorese
CI	chemische Ionisation
CID	Collision-Induced Dissociation
CIEF	Isoelektrische Fokussierung
CITP	Kapillar-Isotachophorese
cm	Zentimeter
CRM	Charged Residue Model
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
d	Innendurchmesser der Kapillare
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
e	Elementarladung
E	elektrische Feldstärke
ε	Säulenporosität
ε_0	Dielektrizitätskonstante
EI	Electron Impact
EDX	Energiedispersive Röntgenanalyse
EOF	Elektroosmotischer Fluss
ESI-MS	Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie
etc.	und so weiter
eV	Elektronenvolt
FAB	Fast Atom Bombardment

Abkürzungsverzeichnis

F.D.	Filamentdurchmesser
fl	Femtoliter
g	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie / Gaschromatograph
h	Höhendifferenz
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
η	Viskosität
I	Stromstärke
I.D.	Innendurchmesser
IEM	Ion Evaporation Model
ISTD	Interner Standard
kV	Kilovolt
l	Kapillarlänge
LC-MS	Flüssigkeitsmassenspektrometrie
LD ₅₀	letale Dosis, bei der die Hälfte aller Versuchstiere gestorben ist
LIF	laserinduzierte Fluoreszenz
MALDI	matrixunterstützte Laserdesorptionsionisation
MEKC	Micellare Elektrokinetische Chromatographie
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
Mol	Einheit der Stoffmenge
MS	Massenspektrometrie / Massenspektrometer
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
μ	Ionenbeweglichkeit
μ_{eof}	Mobilität des Elektroosmotischen Flusses
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
N	Trennstufenzahl
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
nm	Nanometer
nl	Nanoliter
OD	Optimal Defence Theorie
IX	

Abkürzungsverzeichnis

OTLC	open tubular Flüssigkeitschromatographie
p	Druck
pl	Picoliter
pmol	Picomol
r	Radius
REM	Rasterelektronenmikroskop
RSD	relative Standardabweichung
SEM	Scanning electron Mikroskop
SIM	Selected Ion Monitoring
SRM	Selected Reaction Monitoring
t	Zeit, Migrationszeit
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TOF-MS	Flugzeit-Massenspektrometer
U	Spannung
v	Geschwindigkeit
V	Volumen
z	Ladungszahl
zmol	zeptomol
ζ	Zetapotential

1 Einleitung

1.1 Einleitung

„The structural complexity of the plant body results from variation and function of cells....”

(Kathrine Esau 1953, zitiert nach Edwards und Coruzzi 1990)

Pflanzen stellen einen wesentlichen Teil der Biosphäre unserer Erde dar. Als Primärproduzenten von Biomasse, auf die alle anderen Lebewesen angewiesen sind, kommt den grünen autotrophen Pflanzen eine besondere Bedeutung zu. Obwohl in den letzten dreißig Jahren intensiv an den Stoffwechselvorgängen in Pflanzen geforscht wurde und zur Aufklärung der grundlegenden Prozesse der Photoassimilation und der metabolischen Kreisläufe geführt haben, mangelt es jedoch immer noch an einem tieferen Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und ihrer Umwelt.

Höhere Pflanzen, zeigen als vielzellige Organismen eine starke Differenzierung der Zellen, welches ganz im Unterschied zu einzelligen und niederen Pflanzen steht. In einem Verbund gleichartiger Zellen werden diese als Gewebe definiert, wie z.B. das Palisaden- oder Schwammparenchym, wobei verschiedene Zelltypen und Gewebe unterschiedliche Aufgaben übernehmen. Je genauer die Analyse einzelner Zellen eines Gewebes ist, desto mehr Unterschiede werden ersichtlich, auch zwischen gleichartigen Zellen eines Gewebes [Fricke et al, 1994c; Kehr et al, 1998].

Um ein ganzheitliches Bild von den physiologischen Prozessen in höheren Pflanzen zu bekommen, ist es notwendig, sowohl makroskopische als auch mikroskopische Betrachtungen durchzuführen. Dazu müssen einerseits ganze Pflanzen oder alle Zellen eines Organs oder Gewebes untersucht werden. Andererseits müssen auch die kleinsten funktionellen Einheiten des Organismus, die Zellen, und wenn möglich, sogar ihre einzelnen Komponenten, analysiert werden [Tomos et al, 2001]. Erst die hieraus gewonnenen Erkenntnisse über die lokale Verteilung von Nährstoffen und Metaboliten, wie organische Säuren oder Kohlenhydrate, als auch die über Genexpression und Proteinmuster ermöglichen ein ganzheitlicheres Verständnis [Edwards et al, 1990]. Die Analyse der Kompartimentierung von Nährstoffen und Metaboliten ist die Grundlage für das Verständnis der Regulation des Metabolismus und der räumlich differenzierten Antwort der Pflanze auf äußere Faktoren. Durch gezielte Veränderung von Umwelteinflüssen können auf diese Weise Vorgänge wie

Metabolitensynthese, -transport und -speicherung oder auch die interzelluläre Kommunikation besser verstanden werden [Fricke et al, 1994b; Fricke et al, 1994d; Fricke et al, 1994e].

Hierzu zählen bei höheren Pflanzen neben den Vorgängen des Primärstoffwechsels auch die des Sekundärstoffwechsels. Die Anpassung der Pflanze an äußere Faktoren erfolgt durch eine sowohl zeitliche als auch teils komplexe räumliche Regulation dieser Stoffwechselwege. Dies führt zu einer unterschiedlichen Verteilung der Nährstoffe, Metabolite und den in der Pflanze gebildeten Assimilaten in verschiedenen Stoffwechselkompartimenten. Und gerade die Kenntnis dieser lokalen Stoffwechselverteilungen zwischen verschiedenen Zellen innerhalb eines Gewebes und zwischen verschiedenen Geweben ist eine notwendige Voraussetzung zum Verständnis interzellulärer Kommunikation und der Reaktion der Pflanze auf einen Umweltreiz.

Letztlich ist über den Stofftransport, Stofftransport sowie die Regulation des Stoffverbrauchs in den Pflanzen in Hinsicht auf die Verknüpfung von Primär- und Sekundärstoffwechsel und welchen Regulationsmechanismen die Koordination der beiden Stoffwechselwege unterliegt, noch Klärungsbedarf vorhanden.

Ganz konkret auf die sekundären Pflanzenstoffe von *Nicotiana tabacum* bezogen ist insbesondere sehr viel über das Tabakalkaloid Nicotin bekannt [Baldwin, 1988]. Aber es gibt nach wie vor auch diesbezüglich offene Fragen zur Verteilung der Sekundärstoffe als Abwehrstoffe insbesondere unter Stressfaktoren, wie limitierter Nährstoffzufuhr in Verbindung mit Verwundung.

Mittels Methoden, die das Beprobieren von individuellen Zellen erlauben, ist es möglich, eine sehr hohe räumliche Auflösung zur Untersuchung genannter Verteilungen zu erhalten. Hierzu könnten neben klassischen mikroskopischen Techniken auch neuere analytische Techniken, wie beispielsweise ionenselektive Mikroelektroden oder mikrofluorimetrische Verfahren, zum Einsatz kommen, jedoch haben diese alle den entscheidenden Nachteil, dass sie meist nur auf einen Analyt beschränkt sind.

Die Einzelzellanalyse in der Verbindung mit der Kapillarelektrophorese bietet hier viel weitergehende Möglichkeiten [Lochmann et al, 1998; Bazzanella et al, 1998b].

1.2 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit sollte die räumliche Verteilung von Alkaloiden als Sekundärmetabolite in der Tabakpflanze „*Nicotiana tabacum*“ untersucht werden. Diese Pflanze diente im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen als Modellsystem zur Aufklärung grundlegender Fragen bezüglich der Regulation der Alkaloidsynthese und deren Verteilung.

Die durchzuführenden Experimente sollten zum Verständnis der Wechselwirkung zwischen variierendem Ressourcenangebot (insbesondere Nährstoffmangel) und der Bildung von Sekundärmetabolite sowie deren Verteilung auf Zellebene beitragen. Neben der damit verbundenen Untersuchung der Verknüpfung von Primär- und Sekundärstoffwechsel, sollte der Pflanze noch ein zusätzlicher Stressfaktor in Form von mechanischer Verwundung zugefügt werden.

Unter Berücksichtigung dieser Bedingungen wurden die Experimente mit Hilfe der Einzelzellanalytik durchgeführt. Nach dem Aufbau und der Etablierung der Methode der Einzelzellbeprobung sollten Zellen der verschiedenen Gewebe, der oberen und unteren Epidermis, des Mesophylls und Trichome beprobt werden. Die Analyse der Kleinstproben musste mit einer an dieses Problem adaptierten Kapillarelektrophorese erfolgen. Da die Einzelzellanalyse mit der dafür geeigneten Kapillarelektrophorese auf die Analyse der drei Hauptalkaloide des Tabaks, nämlich Nicotin, Nornicotin und Anabasin beschränkt war, sollte eine Möglichkeit gefunden werden, auch andere Tabakalkaloide in Einzelzellproben zu bestimmen. Hierzu kam eine Kapillarelektrophorese in der Kopplung mit einem Massenspektrometer zum Einsatz.

Zur besseren Einordnung der Einzelzellergebnisse sollte durch Extraktion von Blattsegmenten ein Überblick über die Verteilung von Nicotin über die Höhe der Blätter einer Pflanze erstellt werden.

Die Elektronenmikroskopie sollte zur strukturellen Veranschaulichung der Untersuchungsobjekte dienen.

1.3 Grundlagen

1.3.1 Analytische Grundlagen

Anforderungen an ein analytisches System für pflanzliche Mikroproben

Biologische Proben, hier im besonderen pflanzliche Proben, beinhalten eine Menge an verschiedenen Inhaltsstoffen wie anorganische Kationen und Anionen, sowie Kohlenhydrate, Aminosäuren, Carbonsäuren, Phenole, Proteine, Nucleotide usw.. Aufgrund der Vielzahl an Komponenten, die sich teilweise in ihren Konzentrationen um mehrere Größenordnungen unterscheiden können, sind die Proben, die einer Pflanze direkt entnommen wurden, wie beispielsweise Phloemexsudat oder Vakuoleninhalt, keine verdünnten Lösungen, sondern weisen vielmehr hohe Ionenstärken bis mehrere hundert millimolar auf. Bei einer solchen Probe erfordert die Quantifizierung einzelner Komponenten in der Probe Analysenmethoden mit hoher Selektivität für die zu bestimmenden Substanzen, um keine Beeinträchtigung durch Interferenzen durch Substanzen mit ähnlichen Eigenschaften bzw. höheren Konzentrationen zu erhalten. Insbesondere Matrixsubstanzen können zu einer direkten Überlagerung oder Störung des analytischen Signals führen, womit das resultierende Analysenergebnis verfälscht würde. Darüber hinaus müssen die eigentlich zu bestimmenden Analyte noch mit ausreichender Empfindlichkeit und Wiederholgenauigkeit detektiert werden können.

Daher werden chromatographische Techniken wie HPLC, Gaschromatographie, Ionenchromatographie etc. sehr häufig zur Bestimmung der Inhaltsstoffe in pflanzlichen Proben verwendet und mit Hilfe dessen eine Trennung der gesuchten Substanzen von Matrixkomponenten und gekoppelt mit einem leistungsstarken Detektor, deren Quantifizierung ermöglicht. Die Flüssigkeitschromatographie kann auch als Probenvorbereitungstechnik eingesetzt werden, wobei sich in so einem Fall Detektionsverfahren wie Enzymassays oder Immunoassays anschließen.

Darüber hinaus bestehen zusätzliche Einschränkungen für die Wahl einer geeigneten Analyseverfahren bei pflanzlichen Mikroproben, da die Volumina derartiger Proben im nl- bis pl-Bereich liegen können. Solche geringen Volumina treten bei Phloem- oder Xylemproben und vakuolären Proben auf. Die Stoffmengen der Komponenten, die in einer Vakuolenprobe enthalten sind, liegen im pmol bis zmol-Bereich, womit analytische Mikromethoden mit niedrigen absoluten Nachweisgrenzen erforderlich sind. In der Literatur sind für solche Proben Methoden wie die direkte Ionenmessung in Einzelzellen mit ionenselektiven Mikroelektroden [Felle et al, 1986; Zhen et al, 1991; Walker et al, 1995], die

energiedispersive Röntgenanalyse (EDX) gefrorener Gewebsektionen [Harvey et al, 1986; Huang et al, 1989; Williams et al, 1993a] oder von Vakuolensaft [Fricke et al, 1994a; Fricke et al, 1995e; Pritchard et al, 1996] sowie mikrofluorometrische Enzymassays (basierend auf NADH- oder NADPH-Fluoreszenz) von Zellsaft [Koroleva et al, 1997] beschrieben.

Die genannten Methoden haben jedoch alle entscheidende Nachteile. So sind ionenselektive Mikroelektroden zur Messung von zeitabhängigen Prozessen vorteilhaft, aber ihr Anwendungsbereich ist auf eine relativ kleine Anzahl von Ionen begrenzt und die Bestimmung mehrerer Ionen die schwierige Konstruktion von Multikammer-Elektroden erfordert. Bei mikrofluorometrischen Analysen sind enzymatische Assays für eine Reihe von Verbindungen bekannt, jedoch ist hier ebenfalls eine simultane Bestimmung mehrerer Analyte in einer Probe nicht möglich. Darüber hinaus sind häufig Kreuzreaktionen zu beobachten. Außerdem erhält man bei solchen Analysen, trotz spezifischen Einsatz von Derivatisierungsreagenzien für bestimmte funktionelle Gruppen, lediglich einen unspezifischen, wenig aussagekräftigen Summenparameter.

Mit Hilfe von EDX-Analysen kann nur die Bestimmung von Elementen erfolgen, nicht jedoch die pflanzenphysiologisch entscheidende Differenzierung der verschiedenen chemischen Spezies, in denen Elemente wie z.B. Stickstoff und Schwefel vorliegen. Außerdem ist eine Unterscheidung zwischen löslichen und unlöslichen Formen nicht möglich.

Anwendung von Trenntechniken für pflanzliche Mikroproben

Bei pflanzlichen Mikroproben liegt das Probenvolumen weit unter den Injektionsvolumina normal dimensionierter Chromatographiesysteme, weshalb für solche Proben nur Kapillartechniken in Frage kommen. Für die Flüssigchromatographie zeigt Gleichung 1 [Chervet et al, 1992b], dass die Konzentration einer gegebenen Analytmenge am Peakmaximum ($c_{\max}$) umgekehrt proportional zum Quadrat des Säulendurchmessers und proportional der Wurzel der Trenneffizienz N ist:

$$C_{\max} = \frac{2 \cdot \sqrt{2m_A} \cdot \sqrt{N}}{d^2 \cdot L \cdot \varepsilon \cdot (1 + k') \cdot \pi^{3/2}} \quad \text{Gleichung 1}$$

L	Länge der Säule
N	Trennstufenzahl
E	Porosität
m_A	gegebene Analytmenge
d	Säulendurchmesser

Reduziert man beispielsweise den Säulendurchmesser von den üblichen 4,6 mm auf 320 μm , führt das bei gleicher Länge L , Trennstufenzahl N und Porosität ε zu einer ca. 200fach geringeren Verdünnung des Analyten während des Elutionsprozesses. Oft weisen die Kapillartechniken aber eine höhere Trenneffizienz auf, womit die erreichten Werte für $c_{\max}$ dann meist sogar noch höher liegen.

Eine Miniaturisierung eines Trennsystems ist jedoch nur dann sinnvoll, wenn das vorliegende Probenvolumen in der Größenordnung des Injektionsvolumens der Kapillartechnik (nl-Bereich) liegt. Im diesem Fall kann die gesamte Probe injiziert werden mit entsprechend sehr niedrigen absoluten Nachweisgrenzen.

Stehen allerdings für die Analyse großvolumige Proben (z.B. 100 μl) zur Verfügung, führt das entsprechend kleinere maximale Injektionsvolumen $V_{I,\max}$ bei der Kapillartechnik nach Gleichung 2 [Chervet et al, 1992a] zur vollständigen Kompensierung des Vorteils in $c_{\max}$.

$$V_{I,\max} = \frac{d^2 \cdot L \cdot \varepsilon \cdot \pi \cdot (1 + k')}{\sqrt{N}} \quad \text{Gleichung 2}$$

Bei einer Miniaturisierung resultiert dann meist zusätzlich noch eine Verschlechterung der relativen Nachweisgrenzen für optische Detektionssysteme, da der durchstrahlte Lichtweg durch die Miniaturisierung verringert wurde.

Kapillartechniken bieten somit große Vorteile für die Analyse kleinster Volumina mit den damit verbundenen geringen Absolutmengen der zu bestimmenden Komponenten. Bei großvolumigen Proben müsste eine entsprechende Anreicherungstechnik oder eine besondere Detektionstechnik angewendet werden.

Kapillargaschromatographische Verfahren kommen für pflanzliche Mikroproben nicht in Frage, denn sie würden aufwendigere Probenvorbereitungsschritte erfordern, wie Derivatisierungen polarer Komponenten zur Erhöhung der Flüchtigkeit und die Abtrennung einer Vielzahl an nicht- oder schwerflüchtigen Substanzen, was für Proben im Subnanoliterbereich schwierig erscheint. Darüber hinaus wäre ein reproduzierbarer Transfer von Mikrovolumina auf die GC-Säule ein weiterer problematischer Arbeitsschritt.

In Tabelle 1 sind die für pflanzliche Mikroproben in Frage kommenden Techniken und ihre Charakteristika zusammengefasst.

Tabelle 1: Kapillartrennverfahren für pflanzliche Mikroproben

Bezeichnung	Trennmechanismus	I.D. [μm]
Kapillar-HPLC	Verteilung zwischen mobiler und gepackter stationärer Phase	ca. 25 - 1000
OTLC (open tubular)	Verteilung zwischen mobiler und stationärer Phase als Schicht oder Film an der Kapillarwand	2 - 25
CE	unterschiedliche Mobilität im elektrischen Feld	2 - 75

Die in Tabelle 1 aufgeführten Methoden sind zwar prinzipiell alle für die Analyse von Mikroproben geeignet, aber die Kapillarelektrophorese weist bei identischem Kapillardurchmesser die bei weitem größte Trenneffizienz und die niedrigeren Nachweisgrenzen auf. Auf Grund dessen, dass Kapillarelektrophorese-Apparaturen modular aufgebaut sein können, wird eine hohe Flexibilität erreicht, die dadurch die Handhabung kleinster Volumina auf der Injektionsseite ermöglicht. Der modulare Aufbau erlaubt außerdem einen schnellen Methodenwechsel. Darüber hinaus zeigt die Kapillarelektrophorese eine vergleichsweise geringe Matrixanfälligkeit, so dass größtenteils auf eine aufwendige Probenvorbereitung verzichtet werden kann. Wegen der genannten Vorteile und basierend auf der wachsenden Zahl der Veröffentlichungen zu phytochemischen Analysen und Analysen

tierischer Einzelzellen unter Verwendung der Kapillarelektrophorese wurde diese Methode für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen angewendet.

Kapillarelektrophorese

Kapillarelektrophorese ist ein Oberbegriff über eine Reihe von Techniken, bei denen Analyten durch Anlegen eines elektrischen Feldes in einer mit Elektrolyt gefüllten Kapillare getrennt werden. In Abbildung 1 ist der schematische Aufbau einer Kapillarelektrophoreseapparatur dargestellt. Tabelle 2 zeigt die Trennprinzipien in der CE und deren zugrundeliegenden Mechanismus sowie die anwendbaren Applikationen.

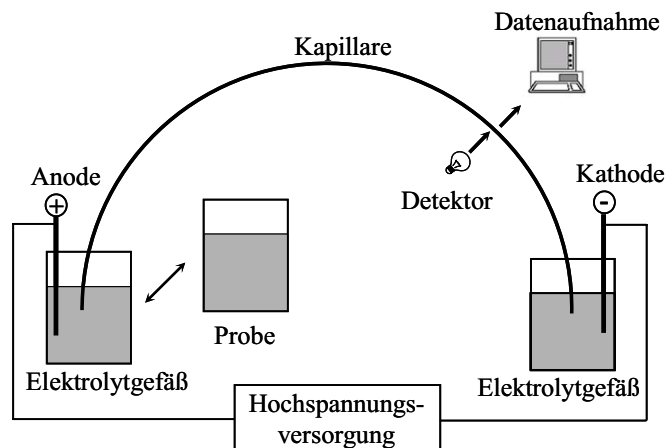


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Kapillarelektrophoreseapparatur

Tabelle 2: Die verschiedenen Techniken der Kapillarelektrophorese

Analysenmethode	Trennung	Triebkraft	Anwendung
CZE Kapillarzonenelektrophorese	durch unterschiedliche Mobilitäten in einem kontinuierlichen Elektrolyten	elektrisches Feld	ionische Verbindungen
CITP Kapillar-Isotachophorese	durch unterschiedliche Mobilitäten und zwischen Elektrolyt hoher Mobilität und Elektrolyt niedriger Mobilität	elektrisches Feld	ionische Verbindungen
CGE Kapillargelelektrophorese	nach Molekülgröße durch Migration und Siebeffekt in gelgefüllter Kapillare	Gelstruktur, Siebeffekt	Makromoleküle
MEKC Micellare elektrokinetische Kapillarchromatographie	durch Verteilung zwischen Elektrolyt und pseudostationärer Phase, Wechselwirkung mit Mizelle	Verteilungs-gleichgewicht, elektrisches Feld	Ionische und neutrale Verbindungen
CIEF Isoelektrische Fokussierung	von zwitterionischen Molekülen durch isoelektrische Punkte	pH-Gradient	Ampholyte, z.B. Proteine
CEC Kapillarelektrochromatographie	Wechselwirkung mit der stationären Phase (gepackte Kapillare), mobile Phase wird durch EOF angetrieben	Verteilungs-gleichgewicht, elektrisches Feld	ionische und neutrale Verbindungen (je nach stationärer Phase)

Die Kapillarelektrophorese ist eine analytische Methode, mit der geladene Verbindungen (Analyte) aus extrem kleinen Probenvolumina rasch und effizient getrennt werden können.

Das Prinzip der Trennung beruht bei allen Trennmechanismen auf Unterschieden in den Ladungen der einzelnen Ionen und den daraus resultierenden Mobilitätsunterschieden in einem elektrischen Feld (siehe Abbildung 2).

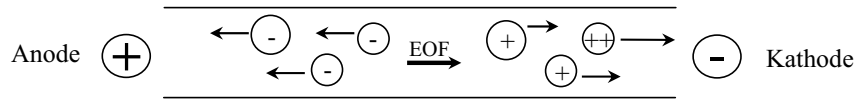


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Wanderung der Ionen

Im Vergleich zu anderen analytischen Trennverfahren hat die CE einen relativ einfachen instrumentellen Aufbau (siehe Abbildung 1). Die Standardkonfiguration besteht aus einer Hochspannungsquelle, zwei Puffergefäßen, einer Trennkapillare und einem Detektor. Je nach Ausführung kann die Apparatur noch mit einem Autosampler und/oder einem Thermostat ausgestattet sein.

Wie die Abbildung 1 zeigt, wird die Probe durch Anlegen eines Druckes oder durch Anheben des Probengefäßes in die mit Elektrolyt gefüllte Trennkapillare injiziert. An die Trennkapillare mit einem Innendurchmesser von typischerweise 50 oder 75 µm und einer Länge von 30 bis 100 cm wird eine Hochspannung von bis zu 30 kV angelegt. Die Analytione besitzen idealerweise unterschiedliche Geschwindigkeiten im elektrischen Feld und werden auf diese Weise aufgetrennt.

Die Geschwindigkeit eines Ions im elektrischen Feld resultiert nach Gleichung 3 aus dem Gleichgewicht der Kraft auf das Ion durch das angelegte elektrische Feld und der Reibungskraft, die für ein kugelförmiges Teilchen durch das Stokessche Gesetz beschrieben wird.

$$V = \frac{z \cdot e \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad \text{Gleichung 3}$$

Der Proportionalitätsfaktor zwischen Wanderungsgeschwindigkeit und Feldstärke ist die substanzspezifische Größe μ , die Ionenbeweglichkeit (Mobilität) des Ions (Gleichung 4).

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{z \cdot e}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad \text{Gleichung 4}$$

Die Mobilität eines Ions ist somit bei gegebener Viskosität der Lösung abhängig von dem Verhältnis der Ladung zu Radius des solvatisierten Ions und ist damit eine geräteunabhängige

Stoffkonstante. Gleichung 4 beschreibt die Ionengrenzmobilität, die nur bei unendlicher Verdünnung gegeben ist. In realen Elektrolytlösungen ist die Mobilität aufgrund der Wechselwirkungen der Ionen meist kleiner und nimmt mit zunehmender Ionenstärke der Lösung ab.

Darüber hinaus wird die eigentliche Mobilität noch von dem elektroosmotischen Fluss (EOF) beeinflusst. Der EOF ist ein Phänomen, welches auf die in der CE verwendeten Kapillaren aus amorphem Glas („fused silica“) zurückzuführen ist (Kapitel ‘Der elektroosmotische Fluss’).

Ausgehend von den substanzspezifischen Eigenschaften der Analyten haben sich verschiedene Arten der Kapillarelektrophorese entwickelt (Tabelle 2).

Hier soll nur auf die Kapillarzonenoelektrophorese näher eingegangen werden.

Grundlagen der CZE

In der Kapillarzonenoelektrophorese werden die einzelnen geladenen Analyte aufgrund ihrer Ladung und der Teilchengröße getrennt. Durch die unterschiedliche Ladung, die wiederum durch den pH-Wert des Elektrolyt-Puffers bestimmt wird, kommt es zu Unterschieden in den elektrophoretischen Mobilitäten.

In der CZE ist zwar die Migrationsgeschwindigkeit der Ionen in erster Linie von deren Ladung abhängig, aber dennoch ist die Wahl des Elektrolytsystems von entscheidender Bedeutung. So werden in der CZE sowohl anorganische Puffer, wie z.B. Natrium-Phosphat, als auch organische Puffer, wie z.B. Tris oder Triethanolamin, verwendet. Die Art des Puffers wird vor allem durch den gewünschten pH-Wert bestimmt, welcher sowohl den elektroosmotischen Fluss als auch die Ladung der einzelnen Analyte beeinflusst. Der pH-Wert stellt somit einen der wichtigsten Parameter für die Trenncharakteristik eines Systems dar.

Der elektroosmotische Fluss beeinflusst ebenso maßgeblich die Trennung der Analyte. Ist der EOF größer als die Beweglichkeit aller Anionen im Puffer, wandern sämtliche Ionen in dieselbe Richtung. Kationen, die zusätzlich durch die Migration mit dem EOF durch die Kathode angezogen werden, wandern am schnellsten. Neutrale Verbindungen wandern mit elektroosmotischer Geschwindigkeit und sind deshalb langsamer als die Kationen. Am langsamsten wandern die Anionen, da sie durch ihre Ladung von der Anode angezogen werden und eigentlich in die andere Richtung wandern würden. Sie werden aber mit Hilfe der durch den EOF entstehenden ‘Strömung’ der Elektrolytlösung in Richtung Kathode

transportiert. Durch EOF Modifier kann jedoch Einfluss auf den EOF genommen werden (siehe Kapitel 'Der elektroosmotische Fluss'). Neutrale Moleküle lassen sich aber dennoch nicht trennen.

Eine weitere Möglichkeit, die Trennung zu beeinflussen, bietet die Änderung des Elektrolyten durch Pufferzusätze. So kann die Selektivität einer Trennung auch durch die Ausnützung sekundärer Gleichgewichte, die die Mobilität verändern, erzielt werden. Hierzu werden den Elektrolyten Komplexbildner zugesetzt. So können beispielsweise Borationen mit Zuckermolekülen Komplexe bilden. Die Zuckermoleküle erhalten dadurch eine negative Ladung und können elektrophoretisch wandern. Das Komplexgleichgewicht wird durch den pH-Wert und die Boratkonzentration bestimmt.

Die Trennung von Metallionen kann durch den Zusatz von Chelatbildnern wie z.B. Citronensäure oder Milchsäure optimiert werden. Zusätze von Cyclodextrinen oder Kronenethern ermöglichen eine sehr selektive Komplexierung und werden häufig zur Trennung von optischen Isomeren eingesetzt. Die Selektivität lässt sich beeinflussen durch die Ringgröße der Cyclodextrine und durch Derivatisieren der äußeren Hydroxylgruppen.

Darüber hinaus kann eine Trennung noch durch den Zusatz von Ionenpaarbildnern und vor allem Mizellbildnern optimiert werden. Der Einsatz von Mizellbildnern stellt eine eigene Trenntechnik dar, die micellare elektrokinetische Kapillarchromatographie (MEKC), die auch die Trennung von Neutramolekülen ermöglicht. Auf diese Trenntechnik soll hier aber nicht näher eingegangen werden (siehe auch Tabelle 2).

Andere Pufferzusätze können Polymere sein, die entweder die Kapillarwand dynamisch belegen oder als Siebmedium wirken, organische Lösungsmittel, die einerseits die Löslichkeit verbessern, andererseits den EOF, die pK-Werte und Mobilitäten der Analyte beeinflussen und Harnstoff, um die Solubilisierung von Proteinen zu verbessern.

Der elektroosmotische Fluss

Der *elektroosmotische Fluss* ist ein wichtiges Transport-Phänomen, das auf die verwendeten Kapillaren aus amorphem Quarz ('fused silica') zurückzuführen ist. Die Kapillaren tragen an der Innen-Oberfläche freie Silanolgruppen, die je nach pH-Wert der angrenzenden Lösung als SiOH_2^+ ($\text{pH} < 2,5$), neutrale SiOH oder SiO^- -Gruppen ($\text{pH} > 2,5$) an der Oberfläche vorliegen. Da bei den meisten Elektrolyten die pH-Werte im Bereich von 4-10 liegen, ist die Kapillaroberfläche negativ geladen, was zur Folge hat, dass bevorzugt Kationen an die Kapillarwand assoziiert werden, um die Oberflächenladung auszugleichen. Diese monomolekulare Schicht wird durch elektrostatische Kräfte starr an der Kapillarwand festgehalten, wo sich noch eine diffuse Doppelschicht anschließt. Der nun innerhalb der diffusen Doppelschicht vorhandene Potentialunterschied wird als zeta-Potential ζ bezeichnet und ist der eigentliche Grund für die Ausbildung des EOF (Abbildung 3).

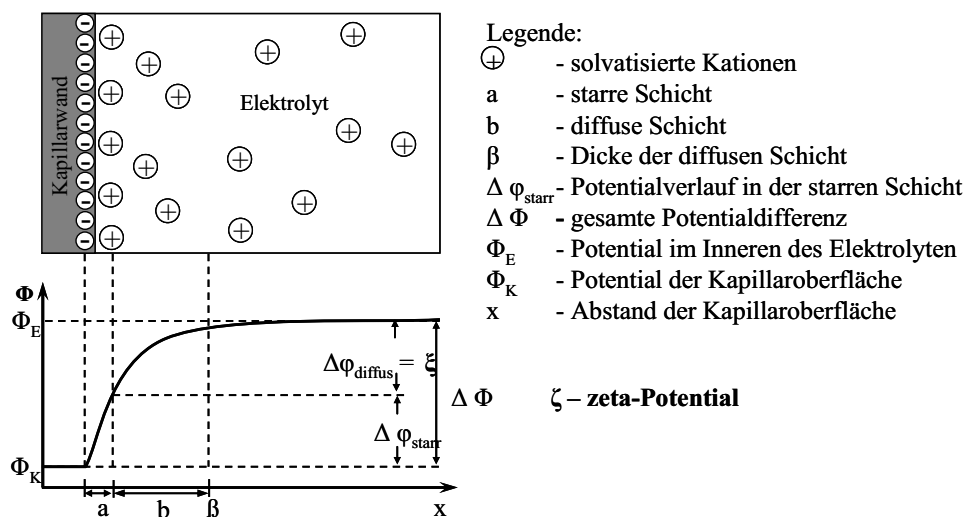


Abbildung 3: Ursachen des Elektroosmotischen Flusses (EOF) – Potentialverlauf durch die elektrische Doppelschicht

Das zeta-Potential ist vom pH-Wert der Elektrolytlösung abhängig und liegt zwischen einigen 10 bis über 100 mV, entsprechend der Gleichung 5:

$$\zeta = \frac{4 \cdot \pi \cdot \eta \cdot \mu_{eo}}{\varepsilon} \quad \text{Gleichung 5}$$

η Viskosität

μ_{eo} Koeffizient für den elektroosmotischen Fluss

ε Dielektrizitätskonstante

Wird nun ein elektrisches Feld an die Kapillare gelegt, wandern die mobilen Ionen in der diffusen Schicht in Richtung der entgegengesetzt geladenen Elektrode. Dabei werden Lösungsmoleküle in dieselbe Richtung mitbewegt, es entsteht also eine Strömung der gesamten Pufferlösung. Dieses Phänomen wird als *Elektroosmose* bezeichnet.

Der einheitliche Fluss der Pufferlösung über die gesamte Kapillarlänge zeigt ein kolbenförmiges radiales Strömungsprofil, dass im Gegensatz zu einem hydrodynamischen Fluss mit parabolischem Strömungsprofil keinen Einfluss auf die Zonenbreite ausübt und daher nicht zu einer Verschlechterung der Trenneffizienz führt (siehe Abbildung 4 und Kapitel ‘Trenneffizienz und Peakverbreiterung’).

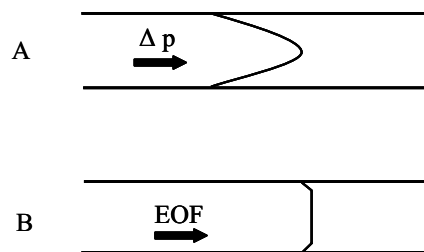


Abbildung 4: Strömungsprofile – A: Fluss durch Druckgradient (z.B. HPLC);

B: Fluss durch EOF (z.B. elektrophoretische Trennverfahren)

Im Falle der meist eingesetzten Quarzglas kapillaren resultiert durch die Deprotonierung von Oberflächensilanolgruppen eine negativ geladene Kapillaroberfläche, die Kationen der mobilen Grenzschicht migrieren zur Kathode, so dass ein kathodisch gerichteter EOF auftritt. Die Geschwindigkeit des EOF wird durch die Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung (Gleichung 6) beschrieben.

$$v_{EOF} = \frac{\varepsilon \cdot \varepsilon_0 \cdot \zeta \cdot E}{\eta} \quad \text{Gleichung 6}$$

In der Praxis wird allerdings überwiegend der Begriff ‘elektroosmotische Mobilität’ μ_{EOF} verwendet, der definiert ist als die Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses v_{EOF} normiert auf die wirkende Feldstärke E (Gleichung 7).

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon \cdot \varepsilon_0 \cdot \zeta}{\eta} \quad \text{Gleichung 7}$$

Die Gleichung 7 zeigt, dass die Größe des EOF bei gegebener Viskosität und Dielektrizitätszahl der Elektrolytlösung durch das Zetapotential der Lösungsgrenzschicht bestimmt wird, welches von der Oberflächenladungsdichte an der Kapillarwand und der Dicke der diffusen Doppelschicht abhängt.

Für die Analytione ergibt sich durch die Überlagerung der eigenen Migration mit dem EOF eine effektive Migrationsgeschwindigkeit, die sich additiv aus den Geschwindigkeitsvektoren der einzelnen Ionen und des EOF zusammensetzt (Gleichung 8).

$$v_i = v_i + v_{EOF} \quad \text{Gleichung 8}$$

Das hat zur Folge, dass sich die Analysenzeiten für Kationen verkürzen, während Anionen aufgrund des gegenläufigen EOF drastisch verlangsamt oder bei ausreichend großem EOF sogar in ihrer Bewegungsrichtung umgekehrt werden können und doch noch am Detektor vorbei transportiert werden. Anionen mit sehr hoher Mobilität wie z.B. Chlorid oder Oxalsäure migrieren jedoch so schnell, dass sie die Kapillare auf der Injektionsseite verlassen und den Detektor nicht erreichen. Der elektroosmotische Fluss nimmt mit steigendem pH-

Wert zu. Oberhalb von pH 8 sind alle Silanolgruppen deprotoniert und es ist keine weitere Steigerung des EOF zu beobachten (siehe Abbildung 5). Eine Trennung stellt somit immer eine Balance zwischen Mobilität des Analyten einerseits und Mobilität des EOF andererseits dar, wobei beide Parameter pH-Wert abhängig sind. Darüber hinaus kann der EOF durch Zusatz sogenannter EOF-Modifier, die die Oberflächenladung der Kapillarwand beeinflussen, auf null reduziert oder sogar das Ladungsvorzeichen vertauscht werden. Entsprechend resultiert ein verlangsamer, ausgeschalteter oder umgedrehter EOF. Durch Zusatz von kationischen Tensiden kann der EOF verlangsamt oder eine Umkehr erreicht werden. Durch chemische Umsetzung der Silanolgruppen der Kapillarenwand mit beispielsweise Trimethylchlorsilan oder durch dynamische Belegung der Silanolgruppen mit Polymeren (z.B. Polyethylenglycol, Cellulosederivate, Polyvinylalkohol) kann der EOF nahezu vollständig unterdrückt werden. Um die Silanolgruppen chemisch zu modifizieren, wurden eine Reihe von Derivatisierungsmöglichkeiten beschrieben, die sehr hydrophile bis hydrophobe Coatings ergeben, wobei ein wesentlicher Faktor die Hydrolysebeständigkeit ist, die entscheidend für die Langzeitstabilität der Kapillaren ist. Eine Abnahme des EOF mit zunehmender Ionenstärke des Trennelektrolyten ist in der damit einhergehenden Verringerung des elektrokinetischen Potentials begründet (Gleichung 7).

Durch Umpolen ist der EOF anodisch gerichtet und die Anionen hoher Mobilität migrieren gegen den EOF in Richtung Detektor. Um sowohl 'schnelle' Anionen wie Chlorid und Oxalsäure als auch 'langsame' Anionen wie z.B. Phosphat in einem Lauf bestimmen zu können, ist es notwendig, die EOF Mobilität selektiv zu beeinflussen.

Einflussgrößen zur Steuerung des EOF sind die Ladung an der Kapillarenwand, die Dicke der sich ausbildenden Doppelschicht und die Viskosität des Trennelektrolyten. Die verschiedenen Modifikationen, die den elektroosmotischen Fluss beeinflussen, sind in Tabelle 3 noch mal zusammengefasst aufgelistet.

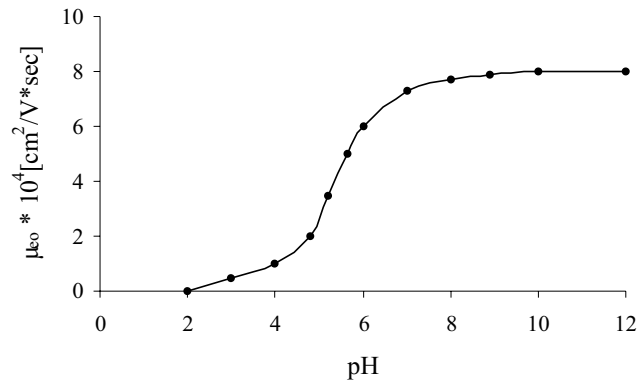


Abbildung 5: Abhängigkeit der elektroosmotischen Mobilität μ_{EO} vom pH-Wert des Trennelektrolyten

Tabelle 3: Mögliche Modifikationen zur Beeinflussung des EOF

Modifikation	Auswirkung auf den EOF
pH-Wert des Puffers	v nimmt mit dem pH-Wert zu (Abbildung 5)
Pufferkonzentration	v nimmt mit abnehmender Ionenstärke zu
Zugabe von Kationen	Verringerung der Geschwindigkeit
Zugabe von kationischen Tensiden	Verringerung der Geschwindigkeit und Möglichkeit der Umkehr des EOF
Chemische Modifikation	Änderung des EOF
Temperatur	Verändert die Viskosität und damit v
Organische Lösungsmittel	Verändern die Viskosität und die Dielektrizitätskonstante und damit v

Injektion in der Kapillarelektrophorese

An die Probenaufgabe werden bei der Kapillarelektrophorese hohe Anforderungen gestellt, da es sich beim Kapillarvolumen nur um wenige μl handelt und deshalb das System leicht überladen wird. Von entscheidender Bedeutung für die Auflösung und Effizienz ist die Injektionslänge, welche deutlich kleiner als die Zone sein sollte, die durch Diffusion entsteht. Die Länge des mit Probe gefüllten Kapillarabschnitts wird Injektionslänge genannt und sollte weniger als 1-2 % der Gesamtlänge der Kapillare betragen.

Bei dem Gesamtvolumen der Kapillare im Bereich von wenigen μl darf das Injektionsvolumen nur einige nl betragen. Prinzipiell ist nur bei Einsatz von Konzentrierungstechniken mit größeren Volumina zu arbeiten.

Es existieren zwei prinzipielle Injektionsmodi:

- Hydrodynamische Injektion
- Elektrokinetische Injektion

Hydrodynamische Injektion

Die Hydrodynamische Injektion ist die am häufigsten verwendete Anwendung zur Probenaufgabe, die mittels Druckdifferenz ausgeführt wird. Die Druckdifferenz kann auf die folgenden drei verschiedenen Arten erzeugt werden. Zum einen durch Anlegen von Druck auf der Einlassseite, Vakuum auf der Detektionsseite und durch die Gravitationskraft, die beim Anheben auf der Einlassseite wirkt.

Die aufgebrauchte Probenmenge (V_i) ist bei allen hydrodynamischen Modi abhängig von den variablen Größen Druckdifferenz (Δp), Injektionszeit (t), sowie den festen Größen Innendurchmesser der Kapillare (d), Viskosität des Puffers (η) und vor allem Gesamtlänge der Kapillare (L), so dass das aufgegebene Volumen nach der Hagen-Poiseuille-Gleichung (Gleichung 9) berechnet werden kann.

$$V_i = \frac{\Delta p \cdot \pi \cdot d^4 \cdot t}{128 \cdot \eta \cdot L} \quad \text{Gleichung 9}$$

Δp	Druckdifferenz (siehe Gleichung 10)
d	Innendurchmesser der Kapillare
t	Injektionszeit
η	Viskosität
L	Gesamtlänge der Kapillare

Bei größeren Innendurchmessern (ungefähr 100 µm I.D.) muss die Injektionszeit entsprechend gering gewählt werden, um das Volumen klein zu halten, wodurch die Reproduzierbarkeit verschlechtert werden kann.

Die Druckinjektion setzt sich unter den diskriminierenden Injektionsarten als Methode der Wahl durch. Änderungen im Injektionsdruck können meistens geräteseitig durch automatische Korrektur der Injektionsdauer kompensiert werden, wodurch eine RSD von ca. 1 % erreicht werden kann.

Die Vakuuminjektion erfolgt durch Anlegen eines Unterdrucks an der Auslassseite. Hier können bei Puffermischungen mit niedrigsiedenden organischen Lösungsmitteln Probleme durch Gasblasenbildung auftreten.

Die Injektion durch Gravitation benötigt oft längere Injektionszeiten als Druck- bzw. Vakuuminjektion. Die Druckdifferenz (Δp) ergibt sich aus der Höhendifferenz (Δh):

$$\Delta p = \rho \cdot g \cdot \Delta h \quad \text{Gleichung 10}$$

ρ	Probendichte
g	Erdbeschleunigung
h	Höhendifferenz

Elektrokinetische Injektion

Bei der elektrokinetischen Injektion erfolgt die Probenaufgabe durch Anlegen einer Hochspannung an das Probengefäß. Es wird eine kurzzeitige Spannung, die 3 – 6 mal niedriger ist als die Spannung für die Trennung angelegt. Die Analyten gelangen auf grund der elektrophoretischen Wanderung und des elektroosmotischen Flusses in die Kapillare. Somit ist die aufgegebene Probenmenge sowohl von der Höhe der angelegten Spannung und der Zeit, in der die Spannung anliegt, als auch von der Mobilität der Ladungsträger abhängig. Dies führt zur Diskriminierung der geladenen Probenkomponenten, falls sich diese in ihrer Mobilität unterscheiden. Die Diskriminierung bringt sowohl Vorteile als auch Nachteile mit sich. Negativ sind die damit verbundene geringere Reproduzierbarkeit und der Verlust der Quantifizierbarkeit. Zusätzlich machen sich Variationen der Leitfähigkeit der Probelösung bemerkbar. Bei hohen Widerständen des Analyten ist die Mobilität der verschiedenen Ionen entscheidend und es kommt zur Anreicherung der Probenkomponenten mit großer Beweglichkeit. Hingegen verliert bei guter Leitfähigkeit der Probelösung und vorhandenem elektroosmotischem Fluss die elektroosmotische Wanderung an Bedeutung und die Ionen werden hauptsächlich durch den Transport der Probelösung injiziert. Positiv ist jedoch die

Möglichkeit, besonders bewegliche Ionen anzureichern und damit die Nachweisgrenze zu verbessern. Darüber hinaus benötigt die elektrokinetische Injektion keine zusätzlichen Apparaturen und funktioniert selbst bei viskosen Medien oder Gelen.

Trenneffizienz und Peakverbreiterung in der CZE

In der Kapillarelektrophorese ist die Trenneffizienz eines Systems vom Elektrolyten und den apparativen Gegebenheiten abhängig. Hierbei ist es wichtig eine genaue Abstimmung der Geräteparameter und der Elektrolytparameter zu treffen, denn die Balance beider Parameter ist wesentlich für die Leistungsfähigkeit und die Stärken des Gesamtsystems verantwortlich.

In der Kapillarzonenlektrophorese können Trenneffizienzen von $N = 10^9 \text{ m}^{-1}$ erreicht werden. Hierbei bezeichnet die Trennstufenzahl N das Maß der Verbreiterung einer Analytzone. Im Idealfall wird die Peakverbreiterung nur durch longitudinale Ausdehnung der Substanzzonen durch Diffusion verursacht, und ist damit sehr gering. Darüber hinaus treten aber meist noch andere Beiträge zur Peakdispersion auf. Ein elektrospezifischer Verbreiterungsmechanismus ist die Elektrodispersion. Der bei Anlegen einer Spannung resultierende gleichmäßige Ladungstransport führt bei Unterschieden in der Mobilität von Analyt- und Elektrolytionen zu Zonen unterschiedlicher Leitfähigkeit und Feldstärke. Die daraus resultierende unterschiedliche Geschwindigkeit der Analytionen in Analyt- und Elektrolytzone verursachen asymmetrische Analytzone, die entweder ein 'leading' oder ein 'tailing' aufweisen (siehe Abbildung 6). Ein 'leading' der Analytzone tritt auf, wenn die Mobilität des Analyten kleiner ist als die des Elektrolyten. Es herrscht dann in der Probenzone eine geringere Leitfähigkeit und damit eine höhere Feldstärke als im Trägerelektrolyten. Die Vorderfront des Peaks ist deshalb scharf, während das Ende des Peaks diffus ist, da Ionen, die durch Diffusion im Trägerelektrolyten zurückbleiben, durch geringere Feldstärke noch weiter abgebremst werden. Nach der Migration durch das Detektorfenster resultiert im Elektropherogramm ein 'tailing'. Im Falle einer höheren Probenmobilität kehren sich die Verhältnisse um und nach der Migration durch das Detektorfenster resultiert im Elektropherogramm ein 'leading' des aufgezeichneten Signals. Ein symmetrisches Signal wird nur für den Analyten erhalten, dessen Mobilität exakt mit der des Elektrolyten übereinstimmt, da in diesem Fall eine einheitliche Feldstärke über die gesamte Kapillarlänge resultiert. Der Effekt der Elektrodispersion ist um so ausgeprägter, je höher die Analytkonzentration im Vergleich zur Elektrolytkonzentration ist, da der Beitrag des Analyten zur Leitfähigkeit in der Analytzone entsprechend zunimmt. Nach Mikkers et al. tritt die Verbreiterung durch Elektrodispersion gegenüber der durch Diffusion in den Hintergrund, wenn das Verhältnis von

Elektrolytkonzentration zu Analytkonzentration 10^2 deutlich übersteigt [Mikkers et al. 1979]. Auf grund dessen ist für eine hohe Trenneffizienz eine relativ hohe Ionenstärke des Elektrolyten vorteilhaft, sofern keine Analyse stark verdünnter, wässriger Proben durchzuführen ist. Die Elektrolytstärke ist jedoch nach oben begrenzt, da bei hohen Konzentrationen Peakverbreiterung durch Joulesche Wärme auftritt (Joulesche Wärme siehe unten).

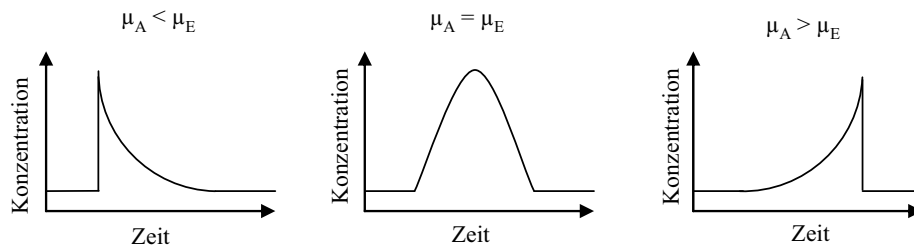


Abbildung 6: Auswirkung der Elektrodipersion auf die Konzentrationsverteilung der Ionen in der Analytzone

Der EOF ist ebenso an der Trenneffizienz beteiligt. Denn im Gegensatz zu druckbetriebenen chromatographischen Systemen weist die Strömung des EOF ein kolbenförmiges Profil statt eines parabolischen Strömungsprofils auf (siehe Abbildung 4 und Kapitel 'Der elektroosmotische Fluss'). Außerdem verursachen die während der elektrophoretischen Trennung auf das Ion wirkenden Kräfte eine Reibung, durch die Joulesche Wärme entwickelt wird. Die Wärmeabfuhr erfolgt über die Kapillarwand, woraus ein radialer Temperaturgradient von innen nach außen resultiert und auch ein Viskositäts- und Mobilitätsgradient (Zerstörung des kolbenförmigen Strömungsprofils) auftritt. Somit migrieren die Ionen einer Ionensorte nicht mehr mit einheitlicher Geschwindigkeit und es resultiert eine Bandenverbreiterung. Die Temperaturdifferenz zwischen der Mitte der Kapillare und der Wand kann mehrere Kelvin betragen und ist proportional dem Quadrat des Kapillarinneendurchmessers. Um maximale Trenneffizienz zu erhalten, ist es äußerst wichtig, die Temperaturgradienten sehr klein zu halten.

So haben die experimentellen Parameter immer mehrere teils gegenläufige Effekte. So beeinflusst eine zu hohe Ionenstärke die Trennung dahingehend, dass diese auf Grund des

Zeta-Potentials langsamer wird und damit der Diffusionsanteil an der Zonenverbreiterung zunimmt. Da aber wegen der höheren Leitfähigkeit der Lösung auch mehr Ionen transportiert werden, entsteht mehr Joulesche Wärme wodurch es wiederum durch den radialen Temperatur- bzw. Viskositätsgradienten in der Kapillare zur Peakverbreiterung kommt.

Die gesamte Peakverbreiterung wird durch die Standardabweichung der Konzentrationsverteilung (σ^2_{ges}) beschrieben und setzt sich aus den Einzelbeiträgen (Diffusion, Injektion, Temperaturgradient, Elektrodipersion, Adsorption) entsprechend der Addition der Varianzen zusammen:

$$\sigma^2_{\text{ges}} = \sigma^2_{\text{Diffusion}} + \sigma^2_{\text{Wärme}} + \sigma^2_{\text{Injektion}} + \sigma^2_{\text{Detektion}} + \sigma^2_{\text{Elektrodipersion}} \dots \quad \text{Gleichung 11}$$

Phytochemische Analyse mit der CE

Die Kapillarelektrophorese hat sich in den letzten Jahren auf Grund ihrer hohen Trennleistung, Geschwindigkeit und der geringen Matrixempfindlichkeit als leistungsstarke Technik für phytochemische Analysen etabliert. Die bei der Analyse von pflanzlichen Proben häufig zu Problemen führenden Matrixkomponenten, die in der HPLC zum Verlust an Trenneffizienz durch irreversible Adsorption an die stationäre Phase oder zur Überlagerung von Analytsignalen führen, stellen in der Kapillarelektrophorese wegen des orthogonalen Trennmechanismus keine Schwierigkeiten dar. Die irreversible Adsorption ist in der Kapillarelektrophorese (ausgenommen CEC) nahezu kein Problem, da keine stationäre Phase mit hoher Oberfläche vorhanden ist. Sollte jedoch die zur Trennung eingesetzte Kapillare dennoch verunreinigt sein, so kann sie durch kurze Spülschritte regeneriert werden. Die Adsorption von Matrixbestandteilen an der Kapillarwand kann in der Kapillarelektrophorese aber auch grundsätzlich durch organische Modifier, Elektrolyten mit hoher Ionenstärke oder Oberflächenmodifizierung des Kapillarmaterials verringert werden.

Im direkten Vergleich zwischen der HPLC und der CE zeigt sich, dass die Kapillarelektrophorese eine wesentlich höhere Trenneffizienz besitzt. Für eine Reihe verschiedener Analyte wurden Trennstufenzahlen ermittelt, die von 11 über 65 [Steuer et al, 1990b; Williams et al, 1993b] bis zu 110 fach [Jimidar et al, 1993a] über den mit der HPLC gefundenen Werten lagen. Die HPLC sowie auch die CE zeigen beide exzellente Wiederholgenauigkeiten und Linearität der Kalibrierung über mindestens zwei Größenordnungen [Chiari et al, 1993]. Allerdings ist die Kapillarelektrophorese mit ihrer hohen Trenneffizienz besonders für komplexe Trennprobleme vorteilhaft, wie es bei biologischen Proben mit einer Vielzahl von Komponenten meistens der Fall ist [Steuer et al, 1990a]. Aufgrund dessen findet die Kapillarelektrophorese häufig in der pharmazeutischen Analytik [Rabel et al, 1993; Lunte et al, 1994], Lebensmittelanalytik [Jimidar et al, 1993b] und der klinischen Diagnostik Anwendung [Chen et al, 1991] [Shihabi, 1992].

In der Literatur sind mittlerweile eine Vielzahl an Applikationen für phytochemische Analysen mit der Kapillarelektrophorese beschrieben. In Tabelle 1 sind eine Auswahl von Literaturstellen zusammengefasst, die einen Überblick über die Bandbreite an Komponenten gibt, die mit der Kapillarelektrophorese in pflanzlichen Proben bestimmt werden können.

Tabelle 4: Analyse pflanzlicher Proben mit der Kapillarelektrophorese

Analyten / Probe	Methode	Literatur
Oligosaccharide in Pflanzen	CZE	Arentoft et al., 1993
Phenolische Säuren in Pflanzenextrakten	MEKC	Morin und Dreux, 1993
Polyphenole und Tannine in Pflanzenextrakten	CZE	Harms, Schwedt, 1994
Flavonoide in <i>Scutellariae Radix</i>	MEKC	Lui und Sheu, 1994
DNA-Restriktionsfragmente und PCR-Produkte aus Pflanzen	CGE	Williams et al., 1994
Cumarine in <i>Chrysanthemum segetum</i>	CZE, MEKC	Ochocka et al., 1995
Anorganische Kationen in Extrakten von <i>Arabidopsis</i>	CZE	Bazzanella et al., 1996
Saccharose und Glutamin in Phloemsaft von <i>Ricinus communis</i>	CZE	Bazzanella et al., 1996
Nicotin und andere Alkaloide in <i>Nicotiana tabacum</i>	CZE, MEKC	Yang et al., 1996
Carbonsäuren und Aminosäuren in Phloemsaft von <i>Ricinus communis</i>	CZE, MEKC	Bazzanella et al., 1997
Aminosäuren in <i>Zea mays</i>	MEKC	Skocir et al., 1997
Niacin in <i>Lens culinaris</i> und <i>Vicia faba</i>	MEKC	Diaz-Pollan und Vidal-Valverde, 1998
Cyanogene Glycoside in Äpfeln und Pfirsichen	MEKC	Campa et al., 2000
Phenolische Säuren in <i>Arabidopsis</i>	CZE	Shapiro et al., 2001
Betaine in Pflanzen	CE	Nishimura et al, 2001
Aminosäuren in Pflanzen	CE	Arlt et al., 2001
Aminosäuren in <i>Lens culinaris</i>	CZE	Rozan et al., 2001
Phytochelatine in Pflanzen	CZE-MS-MS	Mounicou et al., 2001
Alkaloide in Pflanzen	CE-MS	Stöckigt et al., 2002
Aromatische Aminosäuren in <i>Mimosa pudica</i> Linne	CZE, MEKC	La et al., 2002
Anorganische Anionen und Carbonsäuren in Boden – und Pflanzenextrakten	CZE	Xu et al., 2002
Glycoside in <i>Pedicularis</i> Spezies	CZE	Jiang et al., 2003
Glycoalkaloide in <i>Solanum tuberosum</i>	NACE-ESI-MS	Bianco et al., 2003
Glucosinolate in <i>Arabidopsis thaliana</i>	CZE ESI-TOF-MS	Bringmann et al., 2005

Einzelzellanalytik mit der CE

Die Kapillarelektrophorese ist eine Trennmethode, bei der die Trennkapillare bei normaler Probeninjektion (ausgenommen Anreicherungstechniken wie Samplestacking [Chien et al, 1992] oder online-Vorkonzentrierung [Tomlinson et al, 1995]) bis zu 5 % befüllt werden darf. Anderenfalls tritt eine Peakverbreiterung durch die zu breite Probenzone auf [Aebersold et al, 1990].

Bei einer Probeninjektion von 0,5 % des gesamten Kapillarvolumens ist dies bei einer Kapillare von 100 cm Länge und einem Durchmesser von 75 µm ein Volumen von 22 nl. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Injektionsvolumina verschiedener Kapillaren. Es lässt sich erkennen, dass die Injektionsvolumina mit nl sehr klein sind, womit sich die Kapillarelektrophorese hervorragend für die Analyse von Mikroproben eignet.

Tabelle 5: Kapillar- und Injektionsvolumina für CE-Kapillaren (Länge 100 cm) verschiedener Innendurchmesser

I.D. [µm]	Kapillarvolumen [µl]	V _{inj.} (0,5%) [nl]	max. V _{inj.} (4%) [nl]
75	4,4	20	160
50	2	10	80
25	0,49	2,4	19,2

Somit erlaubt die Kapillarelektrophorese die quantitative Bestimmung zahlreicher Substanzen in Kleinstproben mit Nachweisgrenzen, die teilweise im Femtomol- bis Zeptomol-Bereich liegen können. Dies ist mit Hilfe leistungsstarker Detektoren möglich. Neben der konventionellen UV-Detektion können in der Kapillarelektrophorese auch sehr empfindliche optische (laserinduzierte Fluoreszenz) und elektrochemische (Amperometrie, Leitfähigkeit) Detektoren eingesetzt werden.

Für die Analyse von Proben mit kleinstem Volumen wurde die Kapillarelektrophorese bereits erfolgreich eingesetzt, so beispielsweise zur on-line *in vivo* Messung von Mikrodialysaten [Lunte et al, 1991; Zhou et al, 1999], Analyse einzelner Regen- und Nebeltropfen [Tenberken et al, 1996; Tenberken et al, 1997] und zur Bestimmung von Insulin in einzelnen Langerhansschen Inseln (Langerhanssche Inseln sind Zellagglomerate in der Bauchspeicheldrüse, die sowohl die Höhe des Blutzuckers registrieren, als auch die Insulinausschüttung vornehmen sowie als solches produzieren) [Schultz et al, 1995].

Die Kapillarelektrophorese hat sich auch im Bereich der Einzelzellanalytik als Analysemethode etabliert. Die ersten Anwendungen in diesem Bereich bezogen sich noch auf tierische und menschliche Einzelzellen, wo auf Grund der Abwesenheit von Zellwänden und Turgordrücken eine Probenahme im Vergleich zu Pflanzenzellen relativ einfach ist. Hierbei wurden in der Literatur zwei grundsätzlich verschiedene Ansätze beschrieben. Zum einen die subzelluläre Injektion von Cytoplasma und zum anderen die Injektion ganzer isolierter Zellen. Mittlerweile findet die Kapillarelektrophorese auch im Bereich der pflanzlichen Einzelzellanalytik große Anwendung [Kehr et al, 1999; Arlt et al, 2001]. Im Folgenden sollen die Ansätze der Einzelzellanalytik menschlicher bzw. tierischer und pflanzlicher Zellen mit der Kapillarelektrophorese beschrieben werden.

Injektion von Cytoplasma

Die beiden Forscher Wallingford und Ewing haben 1988 erstmals eine Anwendung der CE für die Analyse tierischer Einzelzellen beschrieben [Wallingford et al, 1988; Ewing et al, 1988]. Sie untersuchten Einzelzellen der Schneckenart *Planorbis corneus*. Hierzu verwendeten sie eine CE-Kapillare von 12,7 µm I.D. und einen selbst konstruierten elektrochemischen Detektor zur Detektion leicht oxidierbarer Neurotransmitter im Cytoplasma eines großen Neurons der Schneckenart. Die Probenahme erfolgte mit einer mit Puffer gefüllten Glasmikrokapillare, deren Spitze in die Zelle eingeführt wurde. Die Injektion von Cytoplasma erfolgte elektrokinetisch, d.h. durch Anlegen des elektrischen Feldes und Migration der Analyten in die Kapillare. Dazu wurde das anodische Ende der Trennkapillare in die Mikrokapillare platziert, wobei ein Platindraht, der in Kontakt mit der die Schnecke enthaltende Ringerlösung stand, als Anode diente. Olefirowicz und Ewing erreichten mit der gleichen Detektionsanordnung die Bestimmung von Dopamin und Serotonin in nur 270 fl injiziertem Cytoplasma mit Trennkapillaren von 2 und 5 µm I.D. [Olefirowicz et al, 1990a; Olefirowicz et al, 1990b; Olefirowicz et al, 1991a]. Hier erfolgte die Probenahme nicht mehr mit einer zusätzlichen Mikrokapillare, sondern direkt mit der Trennkapillare, deren A.D. an der Injektionsseite mit Fluorwasserstofflösung reduziert wurde, so dass eine konische Spitze entstand.

Injektion ganzer Zellen

Die Injektion einer kompletten Zelle stellt die einfachste und am häufigsten verwendete Möglichkeit zur Einzelzellanalyse mit der CE dar. Hierbei wird die CE-Trennkapillare an einem Ende so zugespitzt, dass sie gezielt an die entsprechende Zelle herangeführt werden kann. Die Injektion der Zelle erfolgt entweder durch Anlegen eines Unterdrucks am anderen Kapillarende oder durch den EOF. Olefirowicz und Ewing beschreiben, dass der Durchmesser der Zelle den Innendurchmesser der Kapillare um das Dreifache übersteigen kann, ohne dass die Zelle bei der Injektion beschädigt wird [Olefirowicz et al, 1991b]. Nach der Injektion der Zelle in die Trennkapillare wird die Zelle durch den Kontakt mit dem Trennpuffer oder durch Zugabe eines Lysierungsreagenz lysiert. Das Lysierungsreagenz bewirkt die Zerstörung der Zellmembran, so dass die Inhaltsstoffe der Zelle freigesetzt und analysiert werden können. In der Literatur ist bislang eine Vielzahl an Applikationen auf diesem Gebiet veröffentlicht. Ein Überblick über die Veröffentlichungen ist in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Analyse von Einzelzellen mit der CE

Zelle	Analyten	Detektion	Literatur
Neuronen von <i>Planorbis corneus</i>	Dopamin, Serotonin	elektrochemisch	Olefirowicz und Ewing, 1991
Erythrocyten	Glutathion	direkte LIF nach <i>in vitro</i> -Derivatisierung	Hogan und Yeung, 1992
Erythrocyten	Lactat, Pyruvat	indirekte LIF	Xue und Yeung, 1994b
Lymphocyten	Catecholamine	elektrochemisch	Bergquist et al., 1994
Zellkulturen (Ratte)	Aminosäuren, Amine	direkte LIF, nach on-column Derivatisierung	Gilman und Ewing, 1995b
Erythrocyten	Aminosäuren, Amine	Nachsäulenderivatisierung und direkte LIF	Zhang und Yeung, 1996
Schneckenneuronen	Nitrit, Nitrat	direkte UV	Cruz et al., 1997
Neuronen von <i>Pleurobranchaea californica</i>	Arginin, Citrullin	Derivatisierung in Mikrogefäßen und LIF-Detektion	Floyd et al., 1998
Lymphocyten	Catecholamine, Dopamin	elektrochemisch	Shaner und Brown, 2000
Erythrocyten	Hämoglobin	native Fluoreszenz	Zabzdyr und Lillard, 2001
Erythrocyten	Aminosäuren	indirekte LIF, native Fluoreszenz	Xiao et al., 2004

Wie aus dem Literaturüberblick hervorgeht, beruhen die eingesetzten Detektionsstrategien, insbesondere bei Kapillaren mit kleinem I.D. (für die Injektion sehr kleiner Zellen, z.B. Erythrocyten mit ca. 90 fl Volumen), meist auf elektrochemischer Detektion oder laserinduzierter Fluoreszenz. Eine Miniaturisierung der Detektionszelle führt bei der elektrochemischen Detektion zu einem wesentlich geringeren Verlust an Sensitivität als bei den optischen Detektionsmethoden [Ewing et al., 1994]. Bei den optischen Detektionsmethoden hängt die Empfindlichkeit von der durchstrahlten Weglänge ab. Dieser Nachteil kann bei der laserinduzierten Fluoreszenzdetektion durch die hohe Intensität und räumliche Kohärenz eines Laserstrahls kompensiert werden. Die in der CE am häufigsten verwendeten Laser sind HeCd-Laser (Ex. 325 nm und 442 nm) und Ar-Ionenlaser (Ex. 488 und 514 nm). Bei der laserinduzierten Fluoreszenzdetektion ist häufig eine Derivatisierung der Analyten notwendig, da nur wenige Substanzen eine native Fluoreszenz besitzen, die jedoch bei indirekter Detektion entfällt. Bei der Einzelzellanalyse wird die Derivatisierung meist direkt in der Kapillare (on-column) durchgeführt. Hierzu wird die Derivatisierungslösung zusammen mit dem Lysierungsagens zur Zelle injiziert und die Trennung erst nach entsprechender Reaktionszeit eingeschaltet [Gilman und Ewing, 1995b]. Xue und Yeung derivatisieren durch Ausnutzen einer enzymatischen Reaktion im CE-Elektrolyten [Xue und Yeung, 1994a]. Für sehr große Zellen (Neuronen) wurde eine pre-column Derivatisierung beschrieben [Floyd et al., 1998]. Die Zelle wurde in einem Mirkogefäß mit 2 µl Puffer homogenisiert und mit 2 µl Derivatisierungslösung versetzt. Die Größe der Zelle und die Analytkonzentration waren trotz der extremen Verdünnung für eine Bestimmung ausreichend. Eine weitere sehr einfache Möglichkeit der pre-column Derivatisierung lässt sich für Zellkulturen und -suspensionen mit lipophilen Derivatisierungsreagenzien realisieren [Hogan und Yeung, 1992]. Hier wird das Derivatisierungsreagenz der Suspension zugesetzt und gelangt durch die semipermeablen Zellmembranen in die Zellen, wo die enthaltenen Komponenten derivatisiert werden. So fungiert die Zelle selbst als Reaktionsgefäß und die derivatisierte Zelle kann in die CE injiziert werden.

Analyse einzelner Pflanzenzellen mit der CE

Im Bereich der tierischen und menschlichen Analyse von Einzelzellen mit der Kapillarelektrophorese existiert eine Vielzahl an Veröffentlichungen. Im Gegensatz dazu beschäftigen sich mit der Analyse pflanzlicher Einzelzellen nur wenige Arbeitsgruppen und die Zahl an Veröffentlichungen ist im Vergleich sehr klein. Als Gründe hierfür sind u.a. die erschwerte Probenahme durch die Zellwände und den Zellturgor bei pflanzlichen Zellen zu nennen. Auf Grund des Zellturgors, der bis zu 10 bar betragen kann, ist es nicht möglich, analog den Cytoplasmainjektionen tierischer Zellen, eine kontrollierte, elektrokinetische oder hydrodynamische Direktinjektion von Zellsaft (Vakuoleninhalt) in die Trennkapillare der Kapillarelektrophorese durchzuführen. Stattdessen würde beim Anstechen der Zelle mit der CE-Kapillare eine Spontaninjektion eines Aliquots mit unbekanntem Volumen in die Trennkapillare gelangen. Damit wäre in diesem Fall eine Konzentrationsbestimmung wegen des unbekannten Volumens nicht möglich. Um dennoch eine quantitative Analyse der Inhaltsstoffe einer einzelnen Vakuole durchführen zu können, muss die eigentliche Probennahme von der Injektion der Probe in die Trennkapillare der Kapillarelektrophorese getrennt werden. Darüber hinaus muss nach der Extraktion des unbekannten Volumens von Zellsaft aus der Vakuole eine Volumenbestimmung der gewonnenen Probe stattfinden, damit eine Quantifizierung der Komponenten der Vakuole erreicht wird.

Die Analyse des Inhalts einer einzelnen Vakuole mit der Kapillarelektrophorese erfordert somit eine Probenvorbereitung bzw. eine Volumenabmessung der Probe. Für großvolumige Proben stellt eine solche Probenvorbereitung einen routinemäßigen Arbeitsschritt dar, der für jede Analyse durchgeführt wird. Aber bei Mikroproben im nl- bis pl-Bereich ist eine solche Probenvorbereitung mit einer besonderen Handhabung verbunden. Im Folgenden sind die Besonderheiten, die zu beachten sind, aufgeführt:

- Eine exakte Abmessung von Volumina im pl-Bereich ist nicht mit kommerziell erhältlichem Laborbedarf möglich. Ein Pipettieren von Subnanoliterproben muss mit selbst hergestellten Pipetten durchgeführt werden.
- Proben im Subnanoliterbereich sind wegen des hohen Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis gefährdet, sehr schnell zu verdampfen. Ein Tropfen im unteren nl-Bereich verdampft innerhalb weniger Sekunden vollständig. Somit muss die aus einer einzelnen Vakuole extrahierte Probe sehr schnell in ein inertes Medium unter Luftabschluss gebracht werden.
- Bei der Handhabung von nl- bzw. pl-Tropfen besteht eine hohe Kontaminationsgefahr durch die umgebene Raumluft. Auf Grund dessen sind besonders hohe Anforderungen

an die verwendeten Materialien und Geräte, insbesondere auch an das inerte Medium zu stellen. Darüber hinaus sollten die Probenvorbereitungsschritte auf ein Minimum reduziert werden, um die Zahl möglicher Kontaminationsquellen zu verringern.

Mit den erwähnten Anforderungen an die Analyse von Proben aus pflanzlichen Einzelzellen unterscheidet sich die Technik vollständig von der Analyse ganzer tierischer Zellen oder der direkten Injektion von Cytoplasma in die Trennkapillare der Kapillarelektrophorese. Außerdem beschränken die relativ schwierige Manipulation von pI-Volumina sowie die beschriebene Kontaminationsproblematik die zur Analyse von Einzelzellproben geeigneten Kapillarelektrophoresesysteme. Auf zusätzliche Arbeitsschritte wie Vorsäulen-derivatisierungen o.ä. sollte zudem verzichtet werden

Es ist auch nicht möglich, eine ganze Pflanzenzelle in die CE-Kapillare zu injizieren, da Pflanzenzellen von einer stabilen Zellwand umgeben sind, die wiederum fest in den Zellverband integriert ist. Eine Isolierung von Protoplasten ist zwar durch den Abbau der Zellwand (der Mittellamelle) mit Enzymen wie Pectinase oder Cellulase möglich [Giersch et al, 1980; Kaiser et al, 1982], doch müssen diese isolierten Protoplasten zu deren osmotischer Stabilisierung in ein isotonisches Medium überführt werden. Dieses würde aber zu einer starken Veränderung der Konzentrationsverhältnisse in der Zelle führen. Auf diese Weise isolierte Protoplasten oder auch daraus präparierte Vakuolen [Kaiser et al, 1982] können zu grundsätzlichen Untersuchungen des Stoffaustausches über das Plasmalemma und den Tonoplasten mit der Umgebung [Giersch et al, 1980; Day et al, 1981] und auch für die Charakterisierung von Membran-Ionenkanälen mit der patch-clamp Technik verwendet werden. Es ist jedoch nicht möglich, in den isolierten Protoplasten und Vakuolen *in vivo*-Konzentrationen der Inhaltsstoffe zu bestimmen. Darüber hinaus kann den aus dem Gewebe herausgelösten Protoplasten keine räumliche Zuordnung im ursprünglichen Zellverband mehr zugewiesen werden, womit die pflanzenphysiologisch wichtige Ortsinformation verloren geht.

Bestimmung von Tabakalkaloiden mit der CE

In Tabakpflanzen kommen eine Reihe von Tabakalkaloiden vor. Die am häufigsten vorhandenen Alkaloide sind Nicotin, Nornicotin und Anabasin. Im Hinblick auf die Bestimmung der Alkaloide in kleinen Volumina bis hin zur einzelnen Pflanzenzelle, in der nur einige μl Probe erhalten werden (die Injektionsvolumina aber im nl Bereich liegen), ist bei der Betrachtung der Trennungen von Alkaloiden die absolute Nachweigrenze und hohe Trennstufenzahlen bei einer optimalen Auflösung ein entscheidendes Auswahlkriterium. Eine geeignete Wahl des Pufferions und ein eventueller Einsatz von organischen Modifiern sollen möglichst kurze Migrationszeiten und damit schnelle Analysenzeiten ermöglichen. Um letztendlich ein geeignetes nachweisstarkes Elektrolytsystem auswählen zu können, ist es notwendig sowohl die elektrophoretischen als auch die spektroskopischen Eigenschaften der Alkaloide zu kennen.

Spektroskopische Eigenschaften:

Nicotin, Nornicotin und Anabasin zeigen eine UV-Absorption im UV-Bereich zwischen 220 und 280 nm. Das Absorptionsmaximum von allen drei Alkaloiden liegt bei 260 nm. Das Absorptionsmaximum ändert sich bei der Variation des pH-Wertes nicht, jedoch variiert der Extinktionskoeffizient. Der Grund hierfür ist die pH-Wert abhängige Ionenform der Alkaloide (siehe Kapitel 'Alkaloide in der Tabakpflanze'). Die UV-Absorption der diprotonierten Form (pH 2,7) ist sowohl bei Nicotin als auch bei Nornicotin doppelt so groß wie die der monoprotonierten Form (pH 5,0).

Massenspektrometrie

Grundlagen der Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie bezeichnet eine Analysetechnik zur Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum [Lehmann, 1991; Lehmann, 1996; Eckerskorn, 1998]. Jedes Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor. Die Ionenquelle hat die Funktion einen Strahl gasförmiger Ionen zu erzeugen. Diese Ionen werden dann von dem Massenanalysator nach ihrem Masse/Ladungs-Quotienten (m/z) aufgetrennt.

Bezüglich der Nomenklatur werden häufig verschiedene Synonyme für einen bestimmten Zusammenhang benutzt. Bezüglich der Masseneinheit beispielsweise gibt es die Bezeichnungen μ (IUPAC), amu oder Dalton (Da), wobei jedoch stets $1/12$ der Masse von ^{12}C gemeint ist. Hier ist jedoch eine Standardisierung angestrebt.

Ionisationstechniken

Es gibt verschiedene Techniken, um die Ionisation von Analytmolekülen herbei zu führen. Das klassische Verfahren ist die Elektronenstossionisation (EI, Electron Impact). Hierbei wird die Probe über ein Einlasssystem in den gasförmigen Aggregatzustand überführt und mit Elektronen beschossen, wobei zunächst Radikal-Kationen ($M^{\cdot+}$) und in geringerem Ausmaß Kationen (M^{2+}) entstehen. In der Regel wird hierzu eine Energie von 70 eV verwendet, für die Bildung von Molekülionen jedoch nur etwa 10 – 15 eV benötigt, wodurch die überschüssige Energie zur Fragmentierung des Moleküls führt. Damit ist es möglich, unter standardisierten Bedingungen reproduzierbare Fragmentspektren zu erhalten, die zur Identifizierung von Substanzen verwendet werden können. Diese Besonderheit ist nur der Elektronenstossionisation vorbehalten und macht sie insofern von besonderem Interesse, als dass mittlerweile die Möglichkeit besteht, die Fragmentspektren mit sehr umfangreichen Spektrenbibliotheken zu vergleichen. Allerdings kann es auf Grund der Vielzahl der Fragmente und Umlagerungsreaktionen (z.B. Retro-Diels-Alder-Reaktionen, McLafferty-Umlagerung) mitunter schwierig sein, die Struktur einer unbekannten Verbindung aus dem EI-Spektrum abzuleiten.

Bei der chemischen Ionisation (CI) wird die gasförmige Substanz zusammen mit einem großen Überschuss an Hilfsgas einem Elektronenstrahl ausgesetzt. Hierbei wird zunächst das Hilfsgas ionisiert, bevor über Ionen-Molekül-Reaktionen in der Gasphase die Substanz selbst ionisiert wird.

Fast Atom Bombardment (FAB) bezeichnet ein Verfahren, bei dem die Probensubstanz auf einem Kupferstab mit schnellen Argon- oder Xenonatomen ($v \sim 100 \text{ km/s}$) beschossen wird. Dadurch entstehen im Wesentlichen Quasi-Molekülionen und keine Fragmente. Als Continuos Flow Fast Atom Bombardment (CFFAB) kann das Verfahren auch an die HPLC gekoppelt werden, was aber inzwischen technisch überholt ist.

In der Proteinanalytik, beispielsweise zur Bestimmung des Molekulargewichts, hat die Technik der matrixunterstützten Laserdesorption/ionisation (MALDI) an große Bedeutung gewonnen. Hierbei handelt es sich um eine sehr schonende Ionisation, die deshalb auch für thermisch labile Makromoleküle angewendet werden kann. Die Analytprobe wird auf einem metallischen Probenteller zusammen mit einem großen Überschuss einer geeigneten Matrixsubstanz (meist kleine organische Moleküle) auskristallisiert und anschließend im Hochvakuum einem kurzzeitigen, intensiven Impuls kurzwelliger Laserstrahlung ausgesetzt. Zunächst absorbieren die Matrixmoleküle die Energie, aber geben diese schnell wieder an das Festkörperraster ab, wodurch explosionsartig gasförmige Moleküle (Analyt und Matrix) freigesetzt werden. Die Ionisation erfolgt auch über die Matrix. Bei dieser Methode ist von Nachteil, dass die verschiedenen Matrices, Ionisationsbedingungen und Diskriminierungseffekte zunächst ausgetestet werden müssen. Außerdem handelt es sich um eine reine Offline-Methode, die nicht mit chromatographischen oder elektrophoretischen Verfahren koppelbar ist.

Die vorgenannten Ionisationsmethoden benötigen zur Durchführung ein Vakuum, aber es gibt auch Verfahren, die unter Atmosphärendruck arbeiten und daher als Atmospheric Pressure Ionisation (API) bezeichnet werden.

Die Elektrospray-Ionisation (ESI) soll ausführlicher beschrieben werden, da diese Technik im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurde und in den letzten Jahren mehr an Bedeutung gewonnen hat [Cole, 1997]. Das Elektrospray-Phänomen wurde schon vor langer Zeit entdeckt, aber erst nach den Arbeiten von Fenn et al. in der Massenspektrometrie eingesetzt [Yamashita et al, 1984; Whitehouse et al, 1985; Fenn, 2002]. Bei der ESI-MS werden die in Lösung vorliegenden Analytmoleküle unter dem Einfluss einer Hochspannung (1-8 kV) sowie, bei einem pneumatisch unterstützten Elektrospray, eines Stickstoffstroms versprüht. Dabei bilden sich zunächst kleine geladene Tröpfchen, die durch Verdampfung des Lösungsmittels kleiner werden. Erreicht der Radius das sogenannte Rayleigh-Limit, zerfallen die Tröpfchen wegen der Abstossungskräfte zwischen gleichnamigen Ladungen in Coulomb-Explosionen zu kleineren Tröpfchen [Kearle et al, 1993]. Die Rayleigh-Gleichung

(Gleichung 12) gibt einen Zusammenhang zwischen der Ladung der Tröpfchen (Q), der Oberflächenspannung (σ) und dem Radius (r):

$$Q^2 = 64 \pi^2 \cdot \epsilon_0 \cdot \sigma \cdot r^3 \quad \text{Gleichung 12}$$

Q	Ladung der Tröpfchen
ϵ_0	Dielektrizitätskonstante im Vakuum
σ	Oberflächenspannung
r	Radius

Es kommt schließlich zur Bildung freier gasförmiger Ionen, ein Phänomen, für dessen Erklärung derzeit zwei Modellvorstellungen diskutiert werden. Zum einen das Modell des geladenen Rückstands (Charged Residue Model, CRM), wo letztlich winzige Tröpfchen von ca. 1 nm Radius entstehen, die nur noch ein Analytmolekülion enthalten, das durch den Stickstoffstrom vollständig desolvatisiert wird. Zum anderen das Ionenemissionsmodell (Ion Evaporation Model, IEM) [Iribarne et al, 1976], das davon ausgeht, dass bereits aus größeren, hoch geladenen Tröpfchen ($r \sim 8$ nm) freie Ionen in die Gasphase emittiert werden. Einige experimentelle Befunde lassen sich schlüssiger mit der CRM-Theorie erklären, andere mit der IEM-Theorie [Lehmann, 1996; Eckerskorn, 1998]. In Abbildung 7 und 8 ist der ESI-Prozess schematisch dargestellt.

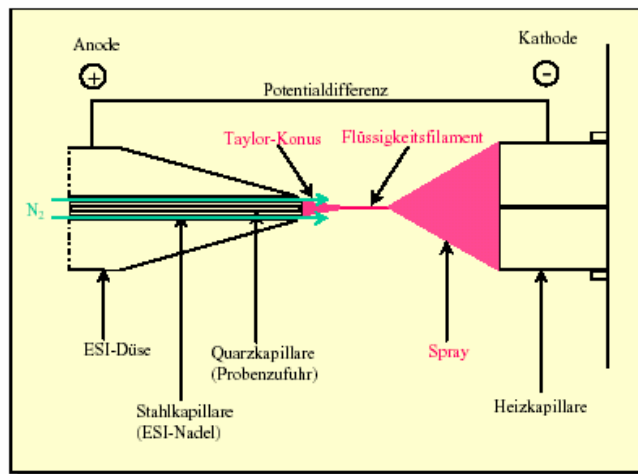


Abbildung 7: Der ESI-Prozess, makroskopisch

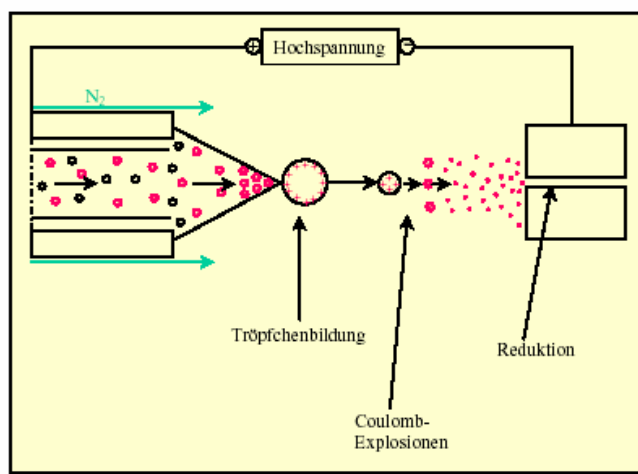


Abbildung 8: Der ESI-Prozess, mikroskopisch

Da bei ESI die auf die Moleküle wirkende Energie relativ gering ist, kann man diese Ionisierungstechnik als relativ sanft bezeichnen. Selbst empfindliche Moleküle und teilweise sogar nichtkovalente Aggregate gelangen hierbei unzersetzt in den Massenspektrometer. Dabei werden typischerweise sogenannte Quasi-Moleküle detektiert, die bei positiver ESI-Spannung durch Anlagerung und bei negativer ESI-Spannung durch Abstraktion eines Protons gebildet werden ($[M+H]^+$ bzw. $[M-H]^-$). Die Bildung von Anlagerungsprodukten (Addukten) ist ein weiteres charakteristisches Phänomen mit meist ubiquitär vorkommenden Ionen. Im Positivmodus sind Natriumaddukte sehr häufig und übersteigen in ihrer Intensität oftmals das $[M+H]^+$ -Ion, wobei man in geringerem Ausmaße Kaliumaddukte findet. Im Negativmodus treten am häufigsten Chloridaddukte auf, die anhand des Isotopenmusters meistens schnell erkannt werden können. Adduktbildungen können aber auch mit anderen Matrixbestandteilen wie beispielsweise Tensiden oder auch Teilchen der gleichen Art auftreten. Solche Adduktbildungen nehmen mit der Konzentration der Probenlösung zu. Grundsätzlich ist das Adduktmuster von der Einstellung verschiedener Geräteparameter und der Zusammensetzung der Lösung abhängig, womit es in gewisser Weise steuerbar ist. Hinsichtlich der Reproduzierbarkeit und Quantifizierung sind diese Aspekte besonders zu beachten.

Wie bereits erwähnt, findet die Elektrospray-Ionisation unter Atmosphärendruck statt, wobei die Massenspektrometrie aber ein Hochvakuum erfordert. Für diesen Übergang vom Atmosphärendruck zum Hochvakuum wird ein sogenanntes Interface verwendet. Hier gibt es

unterschiedliche Ausführungen der Elektrosprayquelle mit dem Interface. Es haben jedoch alle eine Elektrospray-Kapillare (aus Edelstahl), durch die die Zufuhr der Probenlösung erfolgt. An diese ESI-Kapillare wird die Hochspannung angelegt, womit dann eine Potentialdifferenz zum Interface besteht. Eine Ausführung der Elektrosprayquelle und des Interfaces besteht darin, den Spraykegel auf eine Interfaceplatte mit einer runden Öffnung zu richten. Dahinter befindet sich eine weitere Platte mit einer kleinen Öffnung (Orifice) und zwischen den Platten strömt Stickstoff als eine Art Vorhang dem Elektrospray entgegen und desolvatisiert die Ionen. Da das Orifice mit 100 µm einen geringen Durchmesser besitzt, kann dahinter ein Vakuum aufgebaut werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, den Spraykegel auf eine beheizte Stahlkapillare (Innendurchmesser 100 µm) zu richten, die die Desolvatisierung und den Übergang zum Vakuumsystem des Massenspektrometers herstellt. Bei höheren Flüssen ist es insbesondere notwendig, den ESI-Prozess durch Stickstoffzufuhr koaxial zur ESI-Kapillare zu unterstützen, welches dann pneumatisch unterstützte ESI oder teilweise auch Ionspray genannt wird. Bei verschiedenen Geräteausführungen ist auch die Anordnung der Elektrospray-Kapillare zur Flugachse der Ionen unterschiedlich. Die neuere orthogonale Anordnung soll verhindern, dass Lösungsmittelmoleküle und andere ungeladene Matrixbestandteile in das Massenspektrometer gelangen, während die Ionen wegen der Potentialdifferenz eingesaugt werden. Nachdem die Ionen das Orifice oder die Heizkapillare verlassen haben, werden sie mit Hilfe der sogenannten Ionenoptik, zu der Skimmer, Linsen, Octapole u.ä. zählen, weiter fokussiert, bevor sie in den Massenanalysator gelangen. Die Elektrospray-Ionisation wird meist mit Quadrupol-, Ionenfallen- oder auch Flugzeit-Massenspektrometern (TOF) kombiniert (s.u.).

Normalerweise arbeitet ESI mit Flussraten im Bereich von 1-1000 µl/min (sog. Mikrospray), aber es gibt noch die Variante des Nanospray, wo mit Flussraten im nl/min Bereich gearbeitet werden kann. Das Nanospray bietet nicht nur den Vorteil, dass mit kleinsten Substanzmengen ausführliche Messungen durchgeführt werden können, sondern auch eine effektivere, weniger diskriminierende Ionisation, denn es entstehen von vornherein kleinere Tröpfchen.

Die chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (APCI) stellt ein weiteres API-Verfahren dar. Hierbei wird die Probenlösung in einem 400 - 500°C heißen Rohr verdampft und der austretende Dampf wird durch Anlegen einer Hochspannung (ca. 50 kV) über eine nadelartige Elektrode (sog. Coronanadel) in ein Plasma überführt. Dort werden zunächst aus dem Lösungsmittel und dem zugesetzten Puffer (häufig Ammoniumacetat) Ionen gebildet, die wiederum den Analyten ionisieren. Bei weniger polaren Substanzen bietet APCI eine Alternative und Ergänzung zu ESI. Zwar ist APCI auch eine sanfte Ionisationsmethode (Soft

Ionization), aber dennoch etwas energiereicher und „härter“ als ESI, so dass auch noch etwas weniger polare Analyten ionisiert werden können. Ein Nachteil bei dieser Methode ist jedoch die etwas höhere Flussrate (ca. 1 ml/min).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass je nach Analyt, Matrix, verfolgtem Ziel (Quantifizierung, Strukturaufklärung u.a.) und Verfügbarkeit eine geeignete Ionisation ausgewählt werden muss, denn keine Ionenquelle ist universell einsetzbar.

Massenanalysatoren

Nachdem die von der jeweiligen Ionenquelle gebildeten Ionen mit Hilfe der Ionenoptik fokussiert worden sind, gelangen sie in den Massenanalysator. Dieser dient dazu, die Ionen nach ihren Masse/Ladungs-Verhältnissen (m/z) zu sortieren. Alle Massenanalysatoren arbeiten im Hochvakuum.

Einfacher Quadrupol

Der Quadrupol wurde bereits 1953 von Paul und Steinwedel beschrieben und stellt das einfachste Prinzip der Massenanalyse in der MS dar. Er besteht lediglich aus vier gleichartigen, runden, parallel angeordneten Metallstäben, die auf einem Kreis mit dem Radius r um die Flugachse der Ionen, z -Achse, angeordnet sind. Es wird eine Gleichspannung U und eine Wechselspannung ($V \cdot \cos 2 \pi \cdot f \cdot t$) in der Weise an die Stäbe gelegt, dass gegenüberliegende Stäbe jeweils die gleiche Polarität der Gleichspannung und die gleiche Phase der Wechselspannung besitzen. Für Teilchen, die sich auf der z -Achse befinden, resultiert ein elektrisches Potential φ :

$$\varphi(x, y, t) = (U + V \cdot \cos 2 \pi \cdot f \cdot t) \cdot x^2 - y^2 / r^2 \quad \text{Gleichung 13}$$

x, y, z räumliche Koordinaten

f Frequenz der Wechselspannung

t Zeit

Durch Anlegen einer geringen Beschleunigungsspannung (10 – 20 V) bewegen sich die Ionen in z -Richtung. Ihre Bewegungen in der xy -Ebene werden durch folgende Gleichung 14 beschrieben:

$$m \frac{d^2 y}{dt^2} = z \cdot e \cdot \frac{\partial \varphi}{\partial y} = z \cdot e / r^2 (U + V \cdot \cos 2 \pi \cdot f \cdot t) \cdot y \quad \text{Gleichung 14}$$

m	Masse des Ions
z	Anzahl der Ladungen
e	Elementarladung

Führt man die Parameter a und q ein,

$$a = 2 z \cdot e \cdot U / m \cdot (\pi \cdot f \cdot r)^2 \quad \text{und} \quad q = z \cdot e \cdot U / m \cdot (\pi \cdot f \cdot r)^2 \quad \text{Gleichung 15}$$

kann man diese zu den Mathieuschen Gleichungen 16 und 17 umformen:

$$d^2 x / d \cdot (\pi \cdot f \cdot r)^2 + (a + 2q \cdot \cos 2 \pi \cdot f \cdot t) \cdot x = 0 \quad \text{Gleichung 16}$$

$$d^2 y / d \cdot (\pi \cdot f \cdot r)^2 + (a + 2q \cdot \cos 2 \pi \cdot f \cdot t) \cdot y = 0 \quad \text{Gleichung 17}$$

Die Lösungen der Mathieu-Gleichungen geben an, bei welchen Werten der Parameter a und q ein Ion mit einem bestimmten m/z-Verhältnis sich stabil in z-Richtung bewegen kann. Trägt man a und q gegeneinander auf, so steht (wenn r, U, V und f konstant sind) jeder Punkt für ein m/z-Verhältnis (Mathieu-Stabilitätsdiagramm). Da a/q stets 2U/V entspricht, liegen bei gleichem z alle Massen auf einer Geraden, der sogenannten Arbeitsgeraden. Soll ein Massenbereich gescannt werden, werden U und V so erhöht, dass das Verhältnis konstant bleibt, ebenso wie die Frequenz (im Radiobereich, daher RF genannt). Nacheinander werden auf diese Weise verschiedene Massen in den Stabilitätsbereich des Quadrupolfeldes gebracht und zum Detektor hindurchgelassen. Der Quadrupol funktioniert somit als Massenfilter der bestimmte Massen hindurchlässt und andere durch Kollision mit den Metallstäben stoppt. Es werden zwei Arten von Massenanalyse beim Quadrupol-MS unterschieden: „Full Scan“ zum Abtasten größerer Massenbereiche und „Selected Ion Monitoring“ (SIM) zum Aufnehmen einzelner m/z – Spuren. Der SIM-Modus liefert eine wesentlich höhere Empfindlichkeit (mind. Faktor 10).

Die CID-Spannung (Collision-Induced Dissociation, auch Collision-Induced Decay oder Decomposition) ist eine wichtige apparative Regelgröße, die eine Fragmentierung durch Kollision verursacht. Hierbei wird im vorderen Teil der Ionenoptik, am ersten Octapol, eine

zusätzliche regelbare Beschleunigungsspannung angelegt, die die Ionen mit den Stickstoffmolekülen zusammenstoßen lässt. Auf diese Weise werden instabilere Ionen, z.B. Lösungsmitteladdukte, zerstört. Durch eine Optimierung des Signal/Rausch-Verhältnisses kann häufig eine Verbesserung der Empfindlichkeit erreicht werden. Eine gezielte Fragmentierung von Molekülen zum Erhalt von Strukturinformationen ist jedoch nur begrenzt möglich.

Triple Quadrupol

Bei einem Triple Quadrupol Massenspektrometer handelt es sich um eine MS-MS Analyse bzw. Tandem MS Analyse. Ein solches Massenspektrometer besitzt drei Quadrupole, wobei der erste zur Massenanalyse der Ionen dient. Der zweite Quadrupol dient zum Hindurchleiten durch eine mit Gas (Stickstoff, Helium oder Argon) gefüllte Kollisionskammer und der dritte wiederum zum Scannen der Ionen. Diese Anordnung der drei Quadrupole erlaubt neben einfacher Massenspektrometrie eine gezielte Fragmentierung in der Kollisionszelle und die Massenanalyse der Fragmente, die auch Tochterionen genannt werden. Die Fragmentierung in der Kollisionszelle erfolgt wiederum durch Anlegen einer Beschleunigungsspannung und dadurch ausgelöste Zusammenstöße der Ionen mit den Gasteilchen, weshalb man in diesem Falle auch von CID spricht. Um Verwechslungen zu vermeiden spricht man bei der erwähnten CID-Spannung auch von Source CID, da sie unmittelbar nach der Ionenquelle angelegt wird. Anderenfalls ist es die Mass Analyzer CID. Der entscheidende Unterschied besteht darin, dass mit Hilfe von Mass Analyzer CID einzelne Ionen spezifisch fragmentiert werden können, da bereits eine Massenanalyse stattgefunden hat, während Source CID unspezifisch auf alle Ionen des jeweiligen Massenbereiches wirkt.

Mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer ist es möglich, drei verschiedene Arten von MS/MS-Experimenten durchzuführen. Bei der Tochterionen- (bzw. Produktionen-) Analyse, die sehr häufig Anwendung findet, wird der erste Quadrupol auf ein bestimmtes Masse/Ladungsverhältnis eingestellt. Im zweiten Quadrupol findet die Fragmentierung durch CID statt und im dritten Quadrupol werden die Massen der Fragmente analysiert. Die Vorläuferionen-Analyse (Precursor Ion Scan) arbeitet umgekehrt. Hier wird der dritte Quadrupol auf eine bestimmte Masse fixiert und der erste Quadrupol liefert ein Spektrum aller Massen, die ein derartiges Fragment ergeben. Damit ist es möglich, verschiedene Substanzen zu erfassen, die ein bestimmtes charakteristisches Strukturelement enthalten. Bei der Neutralverlust-Analyse lassen sich alle Ionen nachweisen, die einen bestimmten Massenverlust bei der Fragmentierung zeigen, wie beispielsweise $\Delta m = 18$ im Falle einer

Wasserabspaltung. Bei dieser Analyse scannt der dritte Quadrupol synchron mit dem ersten Quadrupol, allerdings um eine bestimmte Massendifferenz, wie z.B. die der Wasserabspaltung, zurückversetzt.

Ionenfalle

Die Ionenfalle (engl. Ion Trap) ist ein Massenanalysator, der im Wesentlichen aus einer Ringelektrode und zwei Endkappenelektroden mit zentrischen Öffnungen besteht. Hierbei kann die Ringelektrode als ein in sich gebogener, an den Enden verbundener Quadrupolstab verstanden werden. Für diesen Fall lässt sich ebenfalls ein Stabilitätsdiagramm mit Hilfe der Mathieu-Gleichung erstellen. Soll ein größerer Massenbereich gescannt werden, so zeigt sich, dass es am sinnvollsten ist, die Gleichspannung U auf Null zu setzen und ausschließlich mit Wechselspannung zu arbeiten. Wird die entsprechende Radiofrequenzwechselspannung an der Ringelektrode angelegt, entsteht ein dreidimensionales, rotationssymmetrisches Quadrupolfeld. Ionen der ausgewählten Masse/Ladungs-Verhältnisse werden in diesem Feld auf stabilen Umlaufbahnen gespeichert, wobei sie durch Heliumgas gedämpft bzw. fokussiert werden. Wenn die Amplitude der RF-Spannung erhöht wird, werden die Trajektorien der Ionen in Reihenfolge steigender m/z -Quotienten instabil und die Ionen werden in Richtung Detektor aus der Falle ausgeworfen. Eine andere Möglichkeit besteht darin, durch eine zusätzliche dipolare Wechselspannung zwischen den beiden Endkappenelektroden Multipolfelder zu erzeugen, um Ionen auszuwerfen. Die Ionenfalle arbeitet diskontinuierlich, d.h. es wird ein bestimmter Zyklus von Füllung und Massenanalyse durchlaufen. Wegen der hohen Geschwindigkeit kann sie dennoch bei der Online-Detektion verwandt werden. Wichtig ist, eine optimale Füllung der Falle sicherzustellen. Sind zu viele Ionen in der Falle, stören sie sich gegenseitig und die Auflösung wird verschlechtert. Wenn hingegen zu wenige Ionen in der Falle eingefangen wurden, ist die Empfindlichkeit schlecht. Um eine optimale Füllung sicherzustellen, gibt es technisch verschiedene Möglichkeiten.

Die Ionenfalle erreicht im Full Scan ähnliche Empfindlichkeiten wie ein Quadrupol im SIM-Modus.

Das Gegenstück zum SIM bei einfacher MS ist das Selected Reaction Monitoring (SRM) bei MS/MS bzw. das Consecutive Reaction Monitoring (CRM) bei MS^n . Hierbei wird ein spezifisches Fragment aufgezeichnet. Die Ionenfallen-MS stellt hinsichtlich ihrer MS/MS-Fähigkeit eine preisgünstigere Alternative zum Triple Quadrupol dar. Dem Nachteil, keine Vorläuferionen- und Neutralverlust-Analyse durchführen zu können, stehen als Vorteil die

Fähigkeit zur Mehrfach-MS (MS^n , $n = 3-10$) gegenüber, was für die Strukturaufklärung sehr nützlich ist.

Kopplung CE-MS

Die Kopplung der Kapillarelektrophorese mit einem Massenspektrometer als Detektor verspricht hohes Potential, denn man kombiniert dabei eine außerordentlich leistungsfähige Separationstechnik mit einem vielseitig einsetzbaren, hochspezifischen und empfindlichen Detektor [Schmitt-Kopplin et al, 2003]. Zunächst einmal erscheint die Problematik ähnlich einer LC-MS-Kopplung. Die Analyten liegen in Lösung vor und müssen ionisiert werden, sowie ins Vakuum überführt werden. Prinzipiell kommen hier die gleichen Interfaces in Frage, insbesondere das Elektrospray-Interface. Jedoch sind der CE-MS-Kopplung eine Reihe von Problemen inhärent. An erster Stelle steht der geringe Fluss des Lösungsmittels aus der Kapillare. Bei einer Verwendung der üblichen 50 μm Kapillaren beträgt dieser weniger als 100 nL/min, was bei einer Benutzung kommerzieller ESI-Interfaces nicht ausreicht, um einen stabilen Elektrospray zu garantieren. Ein weiteres Problem ist die elektrische Kopplung. Üblicherweise wird die für die elektrophoretische Trennung erforderliche Hochspannung über eine Elektrode in das Elektrolytgefäß an der Einlassseite der CE-Kapillare eingebracht, während das Auslassende auf Massepotential liegt. Wird das Auslassende in ein MS-Interface geführt, muss eine kontinuierliche elektrische Verbindung zum Massepotential bestehen, anderenfalls bricht die Stromstärke zusammen, womit der CE-Lauf nicht mehr auswertbar wäre. Daher ist es nicht ohne weiteres möglich, das Auslassende der CE-Kapillare in eine Düse zu führen, um trotz der geringen Flüsse eine Versprühung herbeizuführen. Ein weiteres Problem besteht in einer starken Einschränkung der Auswahl an Pufferelektrolyten, da lediglich flüchtige Substanzen eingesetzt werden sollten. Während diese Maßgabe für die HPLC in der Regel machbar ist, spielen die Elektrolyte in der CE eine überragende Rolle und ihr Austausch erfordert, soweit es überhaupt möglich ist, oft erhebliche Methodenumstellungen. Um die genannten Probleme zu lösen, wurden verschiedene Konstruktionen beschrieben. Die einfachste Lösung besteht darin, die CE-Kapillare durch die ESI-Nadel hindurchzuführen und konzentrisch um die Kapillare einen Strom von zusätzlicher Flüssigkeit (angl. Sheath Liquid, meist einige $\mu L/min$) hindurchzuleiten. Dadurch wird die Menge der beim Elektrospray zur Verfügung stehenden Flüssigkeit erhöht und die elektrische Verbindung mit der ESI-Nadel hergestellt. Diese Lösung bietet verschiedene Vorteile, so z.B. die Tatsache, dass das Sheath Liquid nach den Erfordernissen des ESI-Prozesses ausgewählt werden kann (zum Teil jedoch mit Einfluss auf die CE-Trennung). Vor allem aber ist es die

einzigste Möglichkeit, ohne größere Modifikation an der Kapillare und am Interface auszukommen. Der größte Nachteil ist allerdings offensichtlich, denn das Sheath Liquid bewirkt eine Verdünnung der Lösung, weshalb eine relativ schlechte Konzentrationsempfindlichkeit resultiert. Daraus ergibt sich, dass die Flussrate des Sheath Liquid so gering wie möglich gehalten werden sollte. Ob die hierbei erzielten Empfindlichkeiten brauchbar sind, hängt hauptsächlich von der Ionisierbarkeit des Analyten bei der ESI ab.

Ein sogenanntes Sheathless Interface kommt ohne Hilfsflüssigkeit aus. Die CE-Kapillare wird dabei am vorderen, aus der ESI-Nadel herausragenden Ende sorgfältig angespitzt und die Spitze vergoldet. An diese Goldspitze wird eine elektrische Verbindung zur ESI-Hochspannungsquelle hergestellt. Wegen der starken auftretenden elektrischen Felder ist häufig der Einsatz eines Schutzgases erforderlich, um Entladungen zu vermeiden. Eine weitere Lösung ist das Liquid Junction Interface. Hierbei wird die CE-Kapillare über ein spezielles T-Stück mit einer düsenartigen Spitze und einem Pufferreservoir verbunden, über das der elektrische Kontakt hergestellt wird. Die Justierung des möglichst totvolumenarmen T-Stücks ist dabei höchst problematisch. Eine weitere Variation stellt das Direktelektroden-Interface dar, bei dem die ESI-Spannung über einen exakt zu positionierenden Golddraht in dem Auslassfluss der CE-Kapillare angelegt wird. Da die zuletzt beschriebenen Lösungen nicht kommerziell erhältlich sind, ein hohes Maß an handwerklichem Geschick erfordern und zudem nicht sehr zuverlässig arbeiten, ist die Anwendung des Sheath Liquid Interfaces noch immer am populärsten. Die Nachteile haben jedoch bisher verhindert, dass aus der CE-MS eine Routinemethode vergleichbar der LC-MS wird.

Elektronenmikroskopie

1924 erkannte der Belgier L. de Broglie den Wellencharakter der Elektronenstrahlen und schuf damit die Voraussetzung zur Konstruktion eines Elektronenmikroskops. Eines der ersten elektronenmikroskopischen Bilder eines biologischen Objekts war die Darstellung des Tabakmosaikvirus. Das erste elektronenmikroskopische Bild einer Zelle wurde 1945 von den Rockefeller Instituten in New York veröffentlicht.

Ein Elektronenmikroskop ist ein Mikroskop, das das Innere oder die Oberfläche einer Probe abbilden kann. Die Auflösung eines Mikroskops ist durch die Wellenlänge begrenzt. Da schnelle Elektronen eine sehr viel kleinere Wellenlänge als sichtbares Licht besitzen, kann mit einem Elektronenmikroskop eine deutlich höhere Auflösung (derzeit ca. 0,1 nm) erreicht werden als mit einem Lichtmikroskop (ca. 200 nm).

Aufbau:

Die Hauptbestandteile eines Elektronenmikroskops sollen im Folgenden näher erläutert werden:

- Die Elektronenkanone, in der der Elektronenstrahl durch eine stromdurchflossene und dadurch aufgeheizte, haarnadelförmig gebaute Kathode erzeugt und durch eine an der Anode angelegte Spannung abgesaugt wird. Diese Beschleunigungsspannung beträgt größenordnungsmäßig 50 – 150 kV. Je höher sie ist, desto geringer ist die Wellenlänge der Elektronenstrahlung und desto höher das Auflösungsvermögen. Allerdings wird die Auflösung in der Elektronenmikroskopie weniger durch diesen Faktor als vielmehr durch die Qualität der Linsensysteme, vor allem aber durch die Herstellungstechnik des Präparate begrenzt. Moderne Geräte erreichen Auflösungen von 0,2 – 0,3 nm bei biologischen Objekten. Die förderliche Vergrößerung liegt damit in der Größenordnung von 300 000.
- Die Elektronenlinsen, die die Flugbahnen der Elektronen ablenken können. Meistens werden magnetische Linsen verwendet, in der Elektronenkanone zum Teil auch elektrostatische. Elektronenlinsen haben die gleiche Funktion wie Glaslinsen im Lichtmikroskop. Während die Brennweite der Glaslinsen fest liegt, ist sie bei Elektronenlinsen regelbar. Deshalb enthält ein Elektronenmikroskop im Gegensatz zu einem Lichtmikroskop keine austauschbaren oder verschiebbaren Linsen wie etwas das Objektiv oder das Okular eines Lichtmikroskopes.

- Das Vakuumsystem, welches dafür sorgt, dass die Elektronenquelle arbeiten kann und die Elektronen auf ihrem Weg nicht durch Kollision mit Luftmolekülen behindert werden.
- Die Probenhalterung, die eine stabile Lage garantieren muss. Daneben sind oft Manipulationsmöglichkeiten erwünscht, von denen je nach Art des Probenhalters unterschiedliche Kombinationen wie Verschiebung, Drehung, Verkipfung, Heizung, Kühlung, Dehnung etc. realisiert werden können.
- Der Detektor, der die Elektronen selbst oder sekundäre Signale registriert. Elektronenmikroskopische Bilder sind stets schwarz-weiß. Der Schwärzungsgrad spiegelt die Elektronendichte im durchstrahlten Präparat wieder.

Es wird zwischen zwei Betriebsarten von Elektronenmikroskopen unterschieden. Zum einen das Transmissionselektronenmikroskop (TEM), welches eine Betriebsart ist, die eine direkte Abbildung der Probe ermöglicht. Die Elektronen durchstrahlen das Probenmaterial, das zu diesem Zweck entsprechend dünn sein muss. Je nach Ordnungszahl der Atome, aus denen die Probe besteht, der Höhe der Beschleunigungsspannung und der gewünschten Auflösung kann die sinnvolle Probendicke von wenigen Nanometern bis hin zu einigen Mikrometern reichen. Je höher die Ordnungszahl und je niedriger die Beschleunigungsspannung sind, desto dünner muss die Probe sein. Auch für hochauflösende Abbildungen ist eine dünne Probe erforderlich. In der Probe werden die Elektronen gestreut, d.h. ihre Bewegungsrichtung ändert sich. Das Projektiv-Linsensystem wirft das vom Objektiv-Linsensystem erzeugte erste Zwischenbild weiter vergrößert auf einen Detektor. Zum anderen das Rasterelektronenmikroskop (REM oder SEM, engl. scanning electron microscopy), bei dem die Objektoberfläche durch den primären Elektronenstrahl Punkt für Punkt abgetastet wird und wodurch sogenannte Sekundärelektronen freigesetzt werden. Die Intensität der Sekundärstrahlung ist vom Neigungswinkel der Objektoberfläche abhängig. Die Sekundärelektronen werden von einem seitlich schräg über der Probe angebrachten Detektor aufgefangen. Das Signal wird dabei elektronisch verstärkt. Die Vergrößerung kann stufenlos wählbar sein und das Bild erscheint zeitsequenziell auf einem Kathoden- bzw. Fernsch Bildschirm.

Probenaufbereitung:

Biologische Objekte können nur nach aufwendigen Vorbereitungen elektronenmikroskopisch bearbeitet werden und die Gefahr der Artefaktbildung ist hoch. Um dennoch ein der Wirklichkeit entsprechendes Bild zu erhalten, ist eine Reihe von Vorbereitungen möglich:

- Fixierung des Materials, um die Probe realistischer darstellen zu können. Üblicherweise wird hier Glutaraldehyd zur Stabilisierung der Proteinstrukturen und Osmiumtetroxyd zur Festigung von Membranen verwendet.
- Dehydrierung, wobei Wasser durch Ethanol oder Aceton ersetzt wird.
- Einbettung in Kunstharz, wodurch zelluläre Strukturen stabilisiert werden, da sie sonst im Vakuum des Elektronenmikroskops kollabieren würden. Anschließend ist ein Schneiden des in Kunstharz eingeschlossenen Materials mit scharfen Glas- oder Diamantmessern möglich.
- Kontrastierung des Probenmaterials durch Bedampfung oder Färbung mit Schwermetallionen

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Tiefenschärfe beim Elektronenmikroskop viel größer ist als bei einem Lichtmikroskop. Allerdings dadurch, dass die Proben im Vakuum betrachtet werden müssen, kann kein lebendiges Material untersucht werden. Darüber hinaus kann die aufwendige Vorbereitung der Proben zu Artefaktbildung führen, was nicht in Zusammenhang mit dem eigentlichen Objekt steht. Ein weiteres Problem ist die Schädigung der Proben durch den Elektronenstrahl, z.B. durch Erwärmung oder Wegstoßen ganzer Atome nach Kollision mit den schnellen Elektronen.

1.3.2 Biologische Grundlagen

Anatomie eines Blattes

Die Blätter stellen die wichtigsten Organe für die Photosynthese einer Pflanze dar. Unabhängig davon, welcher Blatt-Typ vorliegt, sind am Aufbau eines Laubblattes immer die gleichen charakteristischen drei Zelltypen beteiligt. So besteht ein Laubblatt aus einer ober- und unterseitigen Abschlusszellschicht, der Epidermis, mehreren Zellschichten Assimilationsgewebe, dem Mesophyll und den Leitbündeln, die als Blattadern das ganze Blatt durchziehen und dem Stofftransport dienen.

Ein typischer Querschnitt durch ein Blatt ist in Abbildung 9 dargestellt.

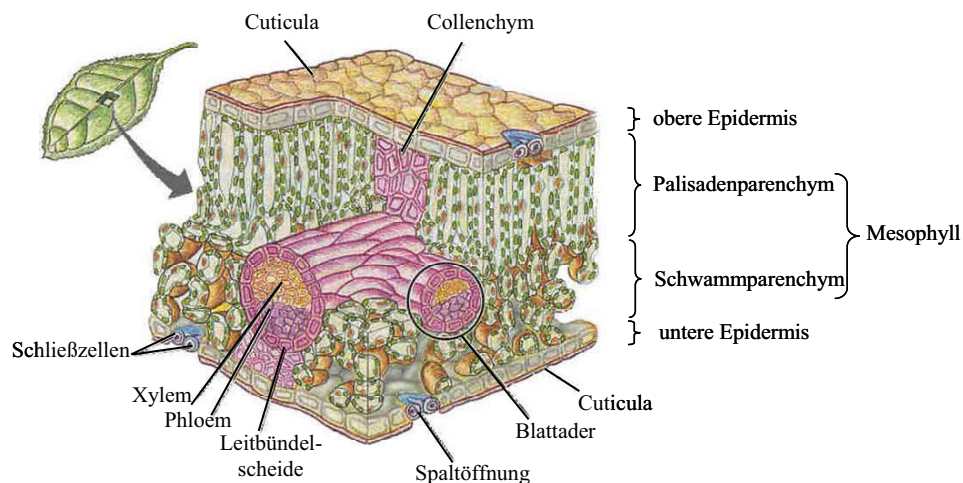


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines Blattes [Campell und Reece, 2003]

Die Epidermis ist meistens einschichtig und die Zellen besitzen keine Chloroplasten, weshalb in der Epidermis auch keine Photosynthese stattfindet.

Die Epidermis muss zwei auf den ersten Blick als unvereinbar erscheinende Aufgaben erfüllen. Zum einen soll sie die Pflanze durch unkontrollierte Transpiration vor Austrocknung

schützen, zum anderen muss sie jedoch den Gasaustausch der Pflanze mit der Umgebung zulassen.

Dieses Dilemma wird durch ein auf der Außenseite der Epidermiszellen aufgelagertes Häutchen aus Cutin, der sogenannten Cuticula, gelöst. Der Cuticula verdankt die Epidermis ihre äußerst geringe Durchlässigkeit für Wasserdampf und andere Gase.

Um dennoch Gasaustausch zu gewährleisten, ist sie mit einer großen Anzahl von Poren mit regulierbarer Öffnungsweite durchsetzt. Diese Spaltöffnungen oder Stomata können in ihrer Öffnungsweite bis hin zum völligen Schließen verändert werden und ermöglichen somit einen kontrollierten Gasaustausch. Die Stomata bestehen aus spezialisierten Epidermiszellen, einem Paar von Schließzellen, zwischen dem die Öffnung besteht und mehreren begleitenden Nebenzellen. Das Öffnen und Schließen der Stomata erfolgt durch Änderungen des Turgors der Schließzellen. Der unter den Schließzellen befindliche Gasraum wird als substomatäre Höhle bezeichnet.

Das zwischen den beiden Epidermisschichten gelegene Blattgewebe ist das chloroplastenhaltige Mesophyll. Hier wird das durch die Stomata aufgenommene CO₂ im Calvinzyklus zu Photosyntheseprodukten assimiliert.

Das Mesophyll setzt sich aus dem Palisadenparenchym und dem Schwammparenchym zusammen. Das Palisadenparenchym ist meist eine einzellige Schicht, die sich direkt unterhalb der oberen Epidermis befindet und ca. 80 % der Chloroplasten eines Blattes enthält. Es ist säulenartig aufgebaut, wobei die Zellen senkrecht zur Blattoberfläche orientiert sind und zwischen sich Interzellularen frei lassen, die für eine gute Durchlüftung sorgen.

Unterhalb des Palisadenparenchyms schließt sich das Schwammparenchym an. Es ist aus unregelmäßig geformten Zellen, die großlumige Zwischenräume einschließen und somit der Ebene eine schwammartige Gestalt verleihen, aufgebaut. Oberhalb der Stomata der unteren Epidermis sind die Höhlen des Schwammparenchyms besonders groß. Die sogenannten Atemhöhlen gewähren somit auch den Zellen des Palisadenparenchyms einen optimalen Gasaustausch. Die Zellen des Schwammparenchyms enthalten nur ca. 20 % der Chloroplasten eines Blattes.

Im Grenzbereich zwischen Palisaden- und Schwammparenchym verlaufen als Blattadern die Leitbündel, bei Monokotylen (einkeimblättrige Pflanzen) parallel angeordnet, bei Dikotylen (zweikeimblättrige Pflanzen) netzwerkartig von einer Mittelrippe aus.

Die Hauptaufgabe der Leitbündel besteht zum einen im Stofftransport zwischen den Wurzeln und Blättern der Pflanze, zum anderen bilden die Leitbündel eine Art Skelett der Pflanze, die dem übrigen Gewebe Festigkeit und Halt verleihen.

Die Leitbündel bestehen aus zwei Gewebekomplexen mit unterschiedlichen Aufgaben, dem Xylem (siehe Kapitel 'Stofftransport in Pflanzen') und dem Phloem (siehe Kapitel 'Stofftransport in Pflanzen'). Das Xylem ist der Blattoberseite, das Phloem der Blattunterseite zugewandt. Die Leitbündel sind von einer aus aneinanderliegenden Parenchymzellen geformten Bündelscheide umschlossen. Diese Bündelscheide vermittelt den Stofftransport vom Mesophyll in die Leitbündel. Die Blattflächen zwischen den Leitbündeln werden Intercostalfelder genannt.

Aufgrund ihrer wichtigen Funktion als Orte der Photosynthese bezeichnet man die Blätter als „source“-Gewebe während die stoffverbrauchenden und stoffspeichernden Teile der Pflanze (wachsende Gewebe, Samen und Früchte) „sink“-Gewebe genannt werden.

Morphologie der Pflanzenzelle

Die pflanzliche Zelle stellt ein komplexes Gebilde aus mehreren Kompartimenten mit unterschiedlicher metabolischer Funktion dar [Heldt, 1999].

Ein exemplarischer Überblick einer Mesophyllzelle ist in Abbildung 10 dargestellt.

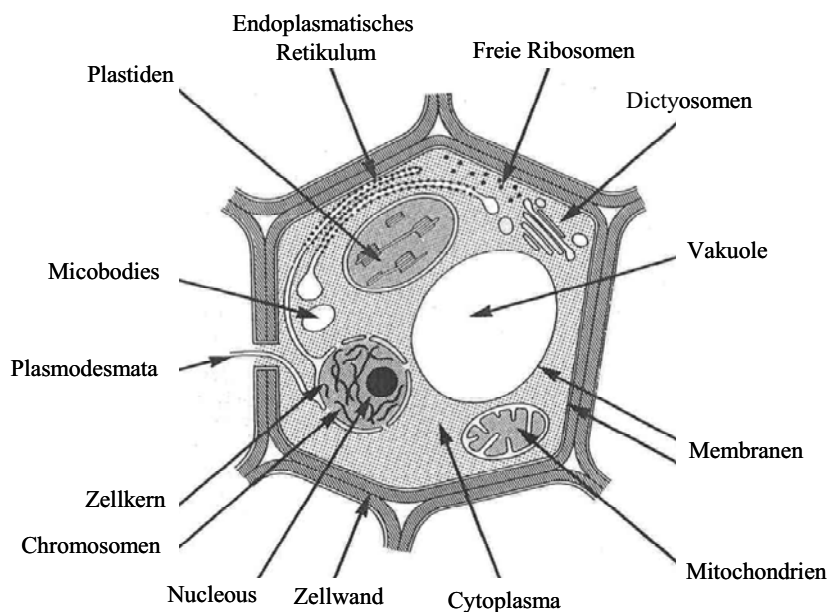


Abbildung 10: Kompartimente der Pflanzenzelle [Lüttge et al., 1994]

Die Pflanzenzelle ist im Gegensatz zu einer tierischen Zelle von einer stabilen Zellwand umgeben, die das von der Zelle eingenommene Volumen begrenzt. Diese Zellwand ist aus Polysacchariden und Proteinen aufgebaut und ist an einigen Stellen porenartig durch Plasmodesmen unterbrochen. Diese stellen eine Verbindung zwischen dem Zellinneren benachbarter Zellen dar und erlauben den Austausch von Stoffen bis zu einem Molekulargewicht von ca. 9000 Dalton [Heldt, 1999]. Durch die Plasmodesmen sind die Zellen eines Gewebes zu einem großen Kompartiment verbunden, welches als Symplast bezeichnet wird. Entsprechend sind auch die Außenräume zwischen den Zellen miteinander zu einem extrazellulären Raum verbunden, dem Apoplasten. Im Inneren ist die Zelle nochmals von einer selektiv permeablen Membran umgeben, dem Plasmalemma. Das vom Plasmalemma umgebene Zellinnere wird als Protoplast bezeichnet. Im Inneren der Zelle

befindet sich das Cytosol oder auch Cytoplasma mit seinen verschiedenen subzellulären Kompartimenten, den sogenannten Zellorganellen, die auf bestimmte Funktionen des Stoffwechsels spezialisiert sind. Das Cytosol vermittelt nicht nur den Stofftransport zwischen einzelnen Zellorganellen, sondern ist selbst Träger zahlreicher Stoffwechselreaktionen wie die Glykolyse und die Synthese von Saccharose.

Die Zellorganellen sind wiederum von einer eigenen Membran oder sogar von einer Doppelmembran umschlossen. Diese unterteilen das Zellinnere in verschiedene Kompartimente, die in ihrer Größe sehr unterschiedlich sind.

Die Vakuole ist das größte Zellorganell, dass je nach Beschaffenheit der Zelle und abhängig vom Zelltyp meist 70 - 80 %, in besonderen Fällen 98 bis 99 % des gesamten Zellvolumens einnehmen kann. Dies ist insbesondere bei Zellen der äußeren Epidermis der Fall, da diese nur sehr wenige oder keine Chloroplasten aufweisen. Die Vakuole ist durch eine eigene Membran vom Cytoplasma abgegrenzt, dem Tonoplasten. Sie dient als Speicherorgan der Zelle, z.B. für anorganische Ionen, Saccharose, Carbonsäuren, Aminosäuren und Sekundärstoffe wie die Alkaloide des Tabaks. Andererseits ist die Vakuole auch eine Art Abfalldeponie, denn es werden für das Cytoplasma und seine Enzyme schädliche Stoffe dort akkumuliert. Auf grund der Entgiftung des Cytoplasmas spielt die Vakuole eine sehr wichtige Rolle und kann als „Ökoorganell“ betrachtet werden.

Außerdem ist die Vakuole für die Aufrechterhaltung des osmotischen Zellrucks (Turgor) zuständig. Dies geschieht durch Akkumulation osmotisch wirksamer Substanzen, die das Eindringen von Wasser in die Vakuole verursachen. Die daraus resultierende Volumenvergrößerung des gesamten Protoplasten ist durch die stabile Zellwand begrenzt und führt somit zum Aufbau eines, dem osmotischen Druck entsprechenden Turgors, der zwischen 0,03 und 0,1 MPa betragen kann [Steudle, 1994]. Unverholzte Pflanzenteile erlangen durch den Turgor ihre Festigkeit.

Das zweitgrößte Organell der Zelle sind die Chloroplasten die ca. 16 % des Volumens einnehmen. Die Chloroplasten sind durch die in ihnen enthaltenen Chlorophylle grün gefärbt und sind die Träger der Photosynthese, wobei ebenfalls die Synthese von Stärke dort stattfindet. Sie besitzen eine Doppelmembran, die das Stroma umschließt, wobei die innere Membran zahlreiche Einstülpungen wie geschlossene, abgeflachte Bläschen gleichende Vesikel aufweist. Dies sind die Thylakoide, die sich zu Stapeln (Grana) zusammenlagern. Die Thylakoide sind die Träger des photochemischen Apparates der Photosynthese. Die Chloroplasten besitzen eigene Ribosomen zur Proteinbiosynthese und ein eigenes Genom.

Darüber hinaus enthält die Zelle die Mitochondrien, deren Aufgabe es ist, die Zelle mit Energie in Form von ATP zu versorgen, welches über den Citratzyklus und die oxidative Phosphorylierung geschieht. Hier findet auch der dem Energiestoffwechsel dienende Abbau der Fettsäuren statt.

Darüber hinaus durchzieht das endoplasmatische Reticulum als ein System flacher Doppelmembranen die ganze Zelle sowie durch die Plasmodesmen hindurch auch die benachbarten Zellen und ist für die Protein- und Lipidsynthese verantwortlich.

Des weiteren enthält die Zelle den Zellkern mit der Zell-DNA (Chromatin) und den Golgi-Apparat als ein sekretorisches Transportsystem für Makromoleküle, der aus einem Stapel flacher Zisternen besteht, den Dictyosomen, welche kleine polysaccharid- und proteinhaltige Vesikel abschnüren, die zum Plasmalemma oder zum Tonoplasten wandern und dort ihren Inhalt nach außen abgeben. Ebenso ist er der Syntheseort des Zellwandmaterials mit Ausnahme der Cellulose.

Neben den bereits erwähnten Organellen existieren in der Pflanzenzelle noch die Chromoplasten (Färbung der Pflanzenorgane durch Carotinoide), die Leukoplasten (pigmentlos, speichern Proteine und Stärke) und die Cytosomen oder Microbodies. Hier wird noch zwischen den Lysosomen (spaltende Enzyme), den Glyoxysomen (enzymatischer Apparat des Glyoxylsäurezyklus) und den Peroxisomen (Organellen der Photorespiration) unterschieden.

Stickstoffhaushalt der Pflanzen

Der Stickstoff ist Bestandteil zahlreicher Biomoleküle und spielt bei Pflanzen eine wichtige Rolle. So liegt der Stickstoff gewichtsmäßig in der Trockensubstanz der Pflanze meist hinter Kohlenstoff und den Elementen des Wassers (Wasserstoff und Sauerstoff) an 4. Stelle. Stickstoff macht etwa 18 % des Proteingewichts aus. In der grünen Pflanze befinden sich etwa die Hälfte des Stickstoffs der Gesamtpflanze und etwa 70 % des Blattstickstoffs in den Chloroplasten der Pflanze bzw. der Blätter. Meistens treten in der Pflanze nur 10 – 20 % oder weniger des Stickstoffs in Form von freien Nitrat- oder Ammonium-Ionen auf. Bei einigen „nitrophilen“ Pflanzen wird Nitrat auch im Zellsaft angereichert, womit es dann eine wesentliche Rolle für die Ionenbilanz und Osmoregulation spielt.

Oft sind jedoch manche Böden verhältnismäßig stickstoffarm, so dass er sich häufig im Minimum befindet und damit ein begrenzender Faktor für das Wachstum darstellt. Es ist etwas überraschend, dass Pflanzen unter Stickstoffmangel leiden können, obwohl die Atmosphäre zu fast 80 % aus Stickstoff besteht. Dieser Luftstickstoff liegt jedoch als gasförmiges N_2 vor und für die Pflanzen ist der Stickstoff in dieser Form nicht verfügbar. Damit Pflanzen den Stickstoff nutzen können, muss er zu Ammonium (NH_4^+) oder Nitrat (NO_3^-) umgewandelt werden.

Die Pflanzen gehören bezüglich der Stickstoffernährung zu den autotrophen Organismen. Die autotrophen Organismen vermögen anorganisch gebundenen oder sogar elementaren Stickstoff zu verwerten während heterotrophe Organismen, zu denen neben zahlreichen Mikroorganismen auch Pilze, Tiere und der Mensch gehören, auf organisch gebundenen Stickstoff angewiesen sind. In diesem Fall sind Proteine und Aminosäuren die wichtigsten Stickstoffquellen.

Pflanzen nehmen bevorzugt Stickstoff in Form des NO_3^- - Ions aus dem Boden auf. In der Regel ist NO_3^- durch NH_4^+ ersetzbar, aber die fortgesetzte Aufnahme von NH_4^+ bereitet vielen höheren Pflanzen wegen der dadurch bedingten Ansäuerung des Bodens Schwierigkeiten. Zur Bindung des elementaren Stickstoffs, der im Wasser des Bodens gelöst ist, sind einige Bakterien und Cyanobakterien befähigt. Diese stickstofffixierenden Bakterien leben entweder frei im Boden oder sie sind mit höheren Pflanzen in Symbiose als so genannte „Wurzelknöllchen“ vergesellschaftet. Sie füllen den Bodenvorrat an mineralischen Stickstoffverbindungen durch Umwandlung von N_2 zu NH_3 wieder auf. Unabhängig davon, ob als Stickstoffquelle der elementare Stickstoff oder das Nitrat-Ion dient, muss der Stickstoff zunächst bis zur Stufe des Ammoniaks reduziert werden, da der Einbau in Kohlenstoffverbindungen nur in der reduzierten Form erfolgen kann. Die Fixierung des

elementaren Stickstoffs N_2 und dessen Reduktion zu Ammoniak NH_3 wird durch einen Enzymkomplex, die Nitrogenase, katalysiert. In der Bodenlösung nimmt Ammoniak ein weiteres Proton auf und wird zum Ammoniumion (NH_4^+), das die Pflanze absorbieren kann. Pflanzen nehmen jedoch ihren Stickstoff hauptsächlich in Form von Nitrat (NO_3^-) auf, das im Boden von nitrifizierenden Bakterien gebildet wird, die Ammonium oxidieren. Haben die Pflanzen das Nitrat über die Wurzeln absorbiert, so wird es in Ammonium zurückverwandelt, welches dann durch weitere Enzyme in Aminosäuren und andere organische Verbindungen eingebaut werden kann. Bei den meisten Pflanzenarten wird der Stickstoff über das Xylem von den Wurzeln zum Spross exportiert. Als Transportform dienen Nitrat oder organische Verbindungen, welche in der Wurzel gebildet worden sind.

Der Stickstoff durchläuft einen Kreislauf, bei dem die pflanzlichen Umsetzungen einen Teil dazu beitragen. Insgesamt ist eine Vielzahl von Prozessen an dem Stickstoffkreislauf beteiligt, der nachfolgend in Abbildung 11 schematisch dargestellt ist.

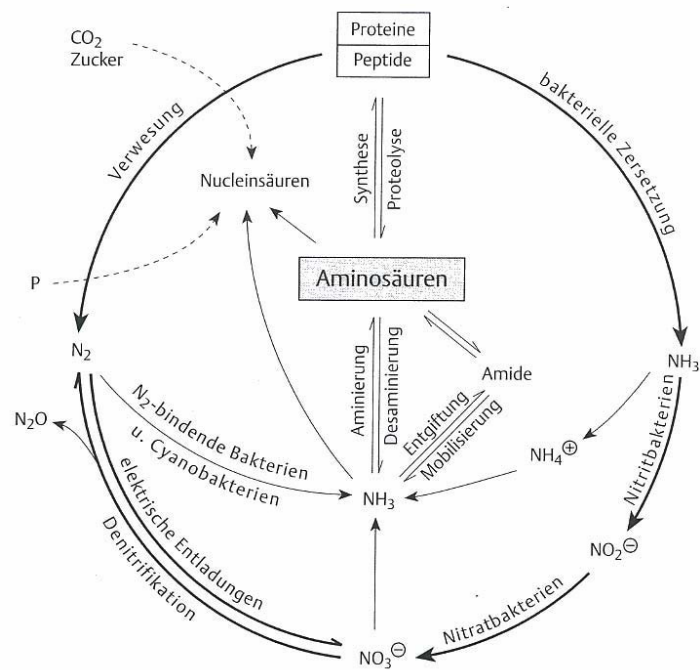


Abbildung 11: Kreislauf des Stickstoffs [Nultsch, 1996]

Sekundärstoffwechsel von Pflanzen

Auf eine Anregung von A. Kössel (1891) zurückgehend unterscheidet man zwischen dem Primärstoffwechsel und dem Sekundärstoffwechsel. Unter dem Primärstoffwechsel werden jene Biosynthesewege zusammengefasst, deren Produkte für das Überleben der Zellen notwendig sind. Neben den Produkten des Primärstoffwechsels der Pflanzen wie Fette, Kohlenhydrate und andere organische Verbindungen, synthetisiert die Pflanze noch weitaus mehr an chemisch recht unterschiedlichen Verbindungen, die sogenannten „sekundären Pflanzenstoffe“. Sie werden so genannt, weil sie die Produkte des Sekundärstoffwechsels bezeichnen. Bei den Sekundärstoffen handelt es sich auch um Stoffe, die nicht in jedem Zellplasma vorkommen, sondern nur in ganz bestimmten, meist ausdifferenzierten Zellen und charakteristisch sind für bestimmte Arten, Gattungen oder Familien. Die Sekundärstoffe sind für die Zelle selbst entbehrlich, aber sie können für den Organismus als Ganzes nützlich sein. Meist werden sie nur während einer zeitlich begrenzten Entwicklungsphase gebildet.

Es lässt sich jedoch keine exakte Grenze zwischen „primären“ und „sekundären“ Stoffen ziehen, aber die Bezeichnung „Sekundärstoff“ hat auch keine systematische Bedeutung, sondern sie ist vielmehr eine Sammelbezeichnung.

Das Spektrum sekundärer Produkte der Pflanzenzellen ist sehr groß. Viele von ihnen sind hochgradig toxisch, vielfach werden sie in spezifischen Vesikeln und oft auch in der Vakuole gespeichert. Zumindest gibt es in einigen Fällen gute Hinweise darauf, dass diese Art der Lagerung einerseits einem Entgiftungsprozess gleichkommt, andererseits aber auch einen Speicher für beispielsweise stickstoffhaltige Moleküle darstellt. Im Gegensatz zu Tieren produzieren Pflanzen nämlich keine stickstoffhaltigen Exkrete. Einige sekundären Stoffwechselprodukte können reversibel wieder abgebaut und in den Primärstoffwechsel eingeschleust werden, während das für andere wiederum nicht zutrifft.

Vielen sekundären Pflanzenstoffen kommt eine Signalfunktion zu. Hierher gehören die pflanzlichen Hormone, die die Aktivitäten anderer Zellen beeinflussen, deren Stoffwechselaktivitäten steuern und die Entwicklungsabläufe in der ganzen Pflanze koordinieren. Andere Substanzen wie die Blütenfarbstoffe dienen der Kommunikation zwischen Pflanzen und ihren Bestäubern und wiederum andere schützen die Pflanzen vor Tierfraß und Infektionen. Die Konsistenz der Stoffe reicht von gasförmig bis gallertartig. Niedermolekulare Exkretionsprodukte weisen hohe Diffusionsverluste auf, zeichnen sich aber durch einen hohen Aktionsradius aus. Viele solcher Substanzen wirken antibiotisch, womit sie das Auftreten konkurrierender Arten in der Umgebung des Produzenten verhindern und ihm so eine ökologische Nische sichern.

Die gegenseitige Beeinflussung von Pflanzen durch stoffliche Ausscheidungen wird Allelopathie genannt. Sie kommt nicht nur bei Algen, sondern ebenso oft auch bei höheren Pflanzen vor. Allelopathisch wirkende Substanzen können Keimung, Wachstum und Entwicklung anderer Pflanzen beeinträchtigen, wobei ihr Einfluss selten stimulierend ist. Gegen die insektizide Wirkung mancher sekundärer Pflanzenstoffe haben Insekten und andere Tiere ihrerseits Abwehrstrategien entwickelt. Im Verlauf ihrer Evolution entstanden zunächst Entgiftungsmechanismen, später kam sogar eine Abhängigkeit von bestimmten Pflanzenprodukten hinzu. So benötigen manche Arten für ihren Steroidstoffwechsel Ausgangssubstanzen aus der Pflanze, die dieser ursprünglich als Schutz dienten.

Die chemische Struktur sekundärer Pflanzenstoffe ist durchweg komplexer als die der primären. Das ist in sofern verständlich, als dass sich viele von Aminosäuren und Nukleotiden ableiten lassen. Die große Zahl der in Pflanzen nachgewiesenen Verbindungen gehört nur relativ wenigen Stoffklassen an. Nur geringe chemische Modifikationen, wie Methylierungen, Hydroxylierungen, Einlagerung von Metallionen u.a. führen dennoch zu einem weiten Spektrum funktionell unterschiedlicher Substanzen.

Beispiele für sekundäre Pflanzenstoffe sind Alkaloide, Terpene, Tannine und Phenole wie Flavonoide. Verschiedene Alkaloide, Terpene und Tannine verursachen einen bitteren Geschmack, einen strengen Geruch oder sie sind giftig und verleihen damit den Pflanzen Schutz vor herbivoren Tieren. Flavonoide absorbieren schädigende UV-Strahlen, und einige dieser Verbindungen wirken auch als Signalstoffe im Rahmen symbiotischer Interaktionen mit nützlichen Mikroorganismen des Bodens.

Während vielen Sekundärstoffen eine bestimmte Aufgabe zukommt, ist die Bedeutung zahlreicher sekundärer Pflanzenstoffe bis heute dennoch unklar. Einige von ihnen können Entgiftungsformen schädlicher Stoffwechselprodukte sein während dessen andere nicht mehr verwertbare Stoffwechselendprodukte und wieder andere vielleicht auch Reservestoffe sind. Viele der Stoffe lösen im menschlichen und tierischen Körper spezifische Wirkungen aus, weshalb sie auch heute noch oft Anwendung in der Medizin finden. Hier ist als Beispiel das Alkaloid Chinin zu nennen, welches zur Behandlung der Malaria eingesetzt wird.

Zu den weitgehend noch offenen Fragen gehören die folgenden:

In welchen Kompartimenten wird ein bestimmtes Produkt gebildet? Finden alle Schritte des Biosyntheseweges dort statt, oder nur der letzte bzw. die letzten? Sind Synthese und Lagerung auf unterschiedliche Kompartimente verteilt? Wie ist organspezifisches Vorkommen erklärbar? Wie ist die Biosynthese geregelt? Sind die Biosynthesewege verzweigt, führen sie zu mehreren, verwandten Produkten, gibt es eine Endprodukthemmung? Warum läuft bei

einer Art die eine, bei einer verwandten ein abweichender Weg ab? Wodurch wird die Synthese und die Aktivität der notwendigen Enzyme gesteuert? Sind es monomere Proteine oder Multienzymkomplexe, liegen sie frei in Lösung oder membrangebunden vor? Wie werden sie in der Zelle transportiert, wie werden die gegebenenfalls ausgeschieden?

Synthese und Bedeutung von Alkaloiden in Pflanzen

Der Ausdruck „Alkaloid“ ist ursprünglich aus den zwei Wörtern „Alkali“ und „εἶδος“ (Griechisch: Ähnlichkeit, Art) entstanden. Im Wesentlichen werden mit dem Ausdruck „Alkaloid“ somit Substanzen bezeichnet, die einen alkalischen Charakter besitzen. Die Bezeichnung „Alkali“ leitet sich von dem Arabischen „al-qualja“ ab, das übersetzt „Pottasche“ bedeutet. Der Begriff „Pottasche“ stammt aus dem 18. Jahrhundert, wo in Töpfen verbranntes Holz in Wasser eingeweicht wurde und die abgefilterte Lauge die Pottasche ergab. Wie sich bei späteren Untersuchungen herausstellte, besteht sie im Wesentlichen aus Kaliumcarbonat K_2CO_3 .

Im Jahre 1819 taucht der Begriff „Alkaloid“ erstmals in der Literatur von W. Meissner auf, der während seinen Experimenten folgendes aufschrieb:

„To me it seems wholly appropriate to refer to those plant substances currently known not by the name alkalis, but alkaloids, since in some of their properties they differ from alkalis considerably, and would thus find their place be the plant acids in the field of plant chemistry”. [Meissner, 1819]

Meissners Definition beschreibt „Alkaloide“ somit als pflanzenursprüngliche Substanzen, die so reagieren wie alkalische Substanzen. In dieser Zeit waren nur wenige pflanzliche Basen bekannt, wie beispielsweise das Morphin in unreiner Form. Über die Jahre setzte sich der Begriff jedoch nur schwer durch und er wurde in unterschiedlichen Zusammenhängen verwendet. Erst Ende des 19. Jahrhunderts wurde der Ausdruck „Alkaloid“ durch einen Review Artikel von O. Jacobsen als feststehender Begriff eingeführt [Jacobsen, 1882]. Erweiterte Definitionen folgten bis zur heutigen Definition, die Alkaloide als stickstoffhaltige organische Substanzen natürlichen Ursprungs bezeichnet, die einen mehr oder weniger basischen Charakter aufweisen. Dies beruht darauf, dass ihre Ringsysteme Stickstoff enthalten und H^+ -Ionen anlagern können (Abbildung 12).

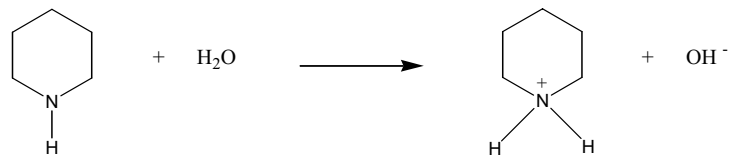


Abbildung 12: Alkaloid als stickstoffhaltiges Ringsystem und der Fähigkeit zur Anlagerung von H⁺-Ionen

Heutzutage sind etwa 15000 verschiedene Alkaloide bekannt, die in 4000 Pflanzenarten und im Tierreich vorkommen. In der Literatur lassen sich unterschiedliche Einteilungen zur Klassifizierung der Alkaloide finden:

- nach Herkunftsorganismus (z.B. Tabakalkaloide, Mutterkornalkaloide ...)
- nach stickstoffhaltigem Strukturelement (Pyridinalkaloide, Indolalkaloide, Steroidalkaloide ...)
- nach spektroskopischen Eigenschaften (Chromophore, MS-Fragmente ...)
- nach pharmakologischen Eigenschaften (z.B. Halluzinogene)
- nach Biogenese

Unter den Alkaloiden sind viele bekannte Drogen, Medikamente und Gifte. Tabelle 7 gibt einen Überblick über die bekanntesten Alkaloide und ihr Vorkommen.

Tabelle 7: Alkaloide in Pflanzen

Alkaloid	Vorkommen	Wirkung
Genussmittel:		
Nicotin	Nicotiana tabacum (Tabak); Blätter	Blutgefäßverengung
Coffein	Coffea arabica (Kaffee); Samen	Blutdrucksteigerung, Stimulation
Theophyllin	Camellia sinensis (Tee); Blätter	Blutdrucksteigerung, Stimulation
Theobromin	Theobroma cacao (Kakao); Samen	Blutdrucksteigerung, Stimulation
Therapeutika:		
Atropin	Atropa bella-donna (Tollkirsche); Frucht	Augenheilkunde
Chinin	Chinona succiruba; Chinin	Malaria-, Grippemittel; Wirkung auf Herzmuskel
Strychnin, Kurare	Strychnos nux-vomica (Brechnuss); Samen	Wirkung auf Muskulatur
Colchicin	Colchicum autumnale (Herbstzeitlose); Frucht	Mitosegift; Anwendung bei Gicht
Mittel mit Suchtgefahr:		
Opium-Alkaloide, Morphin	Papaver somniferum (Schlafmohn); unreife Frucht	Schmerzlinderung, Beruhigung
Cocain	Erythroxylum coca (Koka-Strauch); Samen Cola verticillata (Kola-Baum); Samen	Anästhetikum, Rauschgift
Mescaline	Lophophora (mexikanische Kakteenarten); Sproß	Halluzinogen
"Becher des Sokrates":		
Coniin	Conium maculatum (Schierling); Wurzel	Gift

Der Alkaloidanteil ist in Blättern, Rinde und Früchten meist besonders groß, während sie in anderen Organen völlig fehlen können. Der Ort der Alkaloidsynthese ist nicht unbedingt identisch mit dem Ort ihrer Anhäufung, da Alkaloide häufig innerhalb der Pflanze weitertransportiert werden. Die Alkaloide werden dann meistens in der Vakuole der Pflanzenzelle gespeichert und haben eine mehr oder weniger toxische Wirksamkeit. Eine Hormon- oder Vitaminwirkung weisen die Alkaloide nicht auf und eine lebenswichtige

physiologische Funktion ist bislang auch nicht bekannt. Über die Bedeutung der Alkaloide für die Pflanze war man sich lange Zeit uneins und es wurde angenommen, dass es sich bei den Alkaloiden um Abfallstoffe aus dem Metabolismus der Pflanze handelt. Von dieser Hypothese nahm man jedoch schnell Abstand, als festgestellt wurde, dass für die Synthese von Alkaloiden sehr viel Energie und Nährstoffe aufgewendet werden müssen. Ihre ökologische Bedeutung ist nach wie vor umstritten. Aber man kann heute davon ausgehen, dass es sich bei den meisten pflanzlichen und tierischen Alkaloiden um Abwehr- oder Botenstoffe der jeweiligen Organismen handelt. So dient die Alkaloidsynthese z.B. den Pflanzen als Fraßschutz, sowohl vor Insekten als auch vor Säugetieren und als chemische Barriere für Mikroorganismen. Hierbei hat nicht nur der bittere Geschmack eine abschreckende Wirkung auf die Pflanzenfresser, sondern es handelt sich bei den Alkaloiden auch um Stoffe mit toxischen oder antibiotischen Eigenschaften.

Alkaloide in der Tabakpflanze

In Tabakpflanzen kommt hauptsächlich das Alkaloid Nicotin vor (ca. 95 % bzw. 98 % der Gesamtalkaloide) während die sogenannten Nebenalkaloide Nornicotin (ca. 1,1 %) und Anabasin (0,4 %) in deutlich geringeren Konzentrationen synthetisiert werden (siehe Abbildung 13).

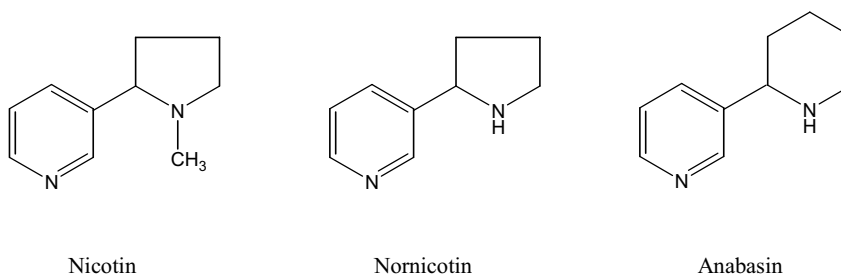


Abbildung 13: Die drei mengenmäßig hauptsächlich vorkommenden Alkaloide des Tabaks - Nicotin, Nornicotin und Anabasin

Die Menge der einzelnen Alkaloide variiert zwischen den verschiedenen Tabakarten. Bislang konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Alkaloidgehalt und Pflanzen eines Typs gefunden werden [Saitoh et al, 1985].

Alle drei Tabakalkaloide bestehen aus einem Pyridinring, an welchem bei Nicotin und Nornicotin ein Pyrrolidinring, bei Anabasin ein Piperidinring angefügt ist. Je nach pH-Wert liegen die Alkaloide als freie Base oder in mono- und diprotonierter Form vor, wobei der Pyrrolidin-Stickstoff zuerst protoniert wird. Die Abhängigkeit der Ionenformen der Alkaloide von dem pH-Wert ist in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Abhängigkeit der Ionenformen der Tabakalkaloide vom pH-Wert

pH-Wert	Ionenform
2,0 – 2,7	Diprotoniert
4,5 – 7,0	Monoprotoniert
> 7,0	freie Base

Die Tabakalkaloide sind toxisch und insbesondere Nicotin wird seit jeher als Gift und Rauschmittel eingesetzt (LD₅₀ (Maus, intravenös) 300 µg/kg; LD₅₀ (Ratte, subcutan) 50 mg/kg). Beim Arbeiten mit Nicotin ist dessen Wasserdampflichkeit zu beachten.

Für die Biosynthese von Nicotin werden 5 – 8 % des gesamten Stickstoffhaushaltes der Pflanze verbraucht [Baldwin et al, 1994b] und zur Bildung von 1 g Nicotin werden 3,62 g Glucose benötigt [Gershenzon, 1993]. Darüber hinaus ist für das Nicotin bekannt, dass eine Wiedereinbeziehung in den Stoffwechsel der Pflanze nicht möglich ist [Baldwin et al, 2000a].

Biosynthese von Tabakalkaloiden

Die Tabakalkaloide werden in der Wurzel gebildet und über das Xylem in die oberirdischen Teile der Pflanze transportiert und dort in den Vakuolen der Zellen gespeichert.

Der Pyridinring von Nicotin, Nornicotin und Anabasin stammt aus der Nicotinsäure. Als Vorstufe der Nicotinsäure konnte die Chinolinsäure identifiziert werden. Außerdem zeigten Yang et al. [Yang et al, 1965], dass sich die Kohlenstoffatome des Glycerinaldehyd-3-phosphats ausnahmslos in den Positionen C-4, C-5 und C-6 des Pyridinrings der Chinolinsäure wiederfinden. Bei der Gabe von $3\text{-}^{14}\text{C}$ -Aspartat und $3\text{-}^{14}\text{C}$ -Malat an *Nicotiana rustica* konnte der Einbau der markierten Kohlenstoffatome fast ausschließlich an der C-2 bzw. C-3 Position des Pyridinrings festgestellt werden [JACKANIC.TM et al, 1966].

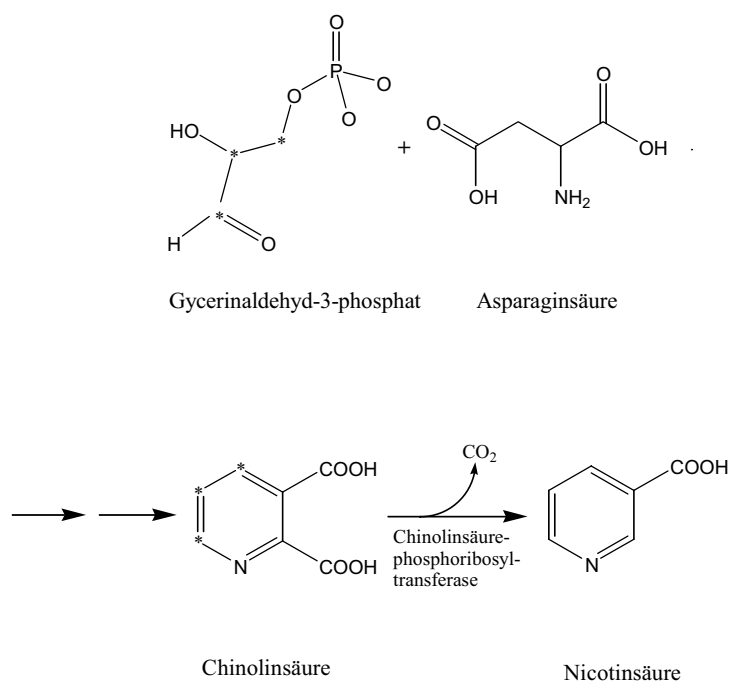


Abbildung 14: Biosynthese der Nicotinsäure

Der Hauptsyntheseweg für den *N*-Methylpyrrolidinring von Nicotin führt über das Putrescin, *N*-Methylputrescin und 4-Methylaminobutanal zum *N*-Methyl- Δ' -pyrrolinium-Salz [Leete, 1955; Dewey et al, 1955] (Abbildung 16 Dewey). Als Vorstufen von Putrescin wurden Arginin, Agmatin und *N*-Carbamylputrescin identifiziert [Yoshida et al, 1966; Yoshida, 1969a; Yoshida, 1969b].

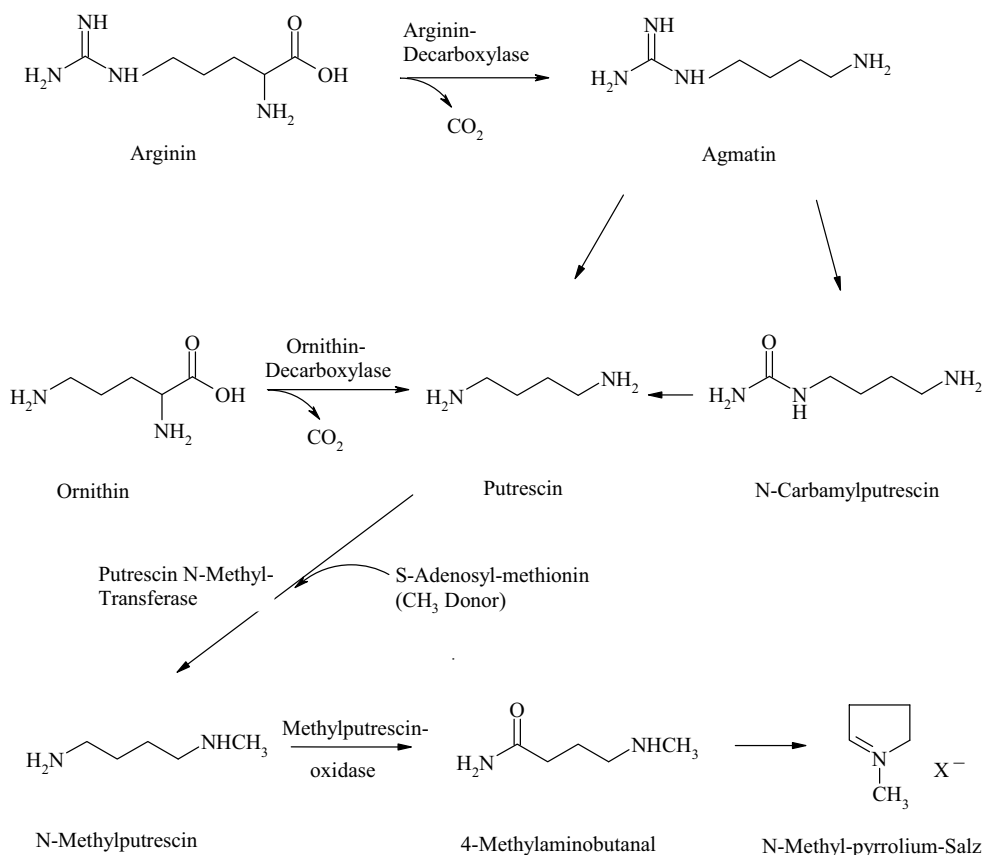


Abbildung 15: Biosynthese des *N*-Methyl-Δ¹-pyrrolium-Salzes

Die Reaktionsschritte ausgehend von der Nicotinsäure bis hin zum Nicotin wurden ebenfalls nachvollzogen. So konnte gezeigt werden, dass die Nicotinsäure auf dem Weg zum Pyridinring des Nicotins ihre Carboxyl-Gruppe verliert [Dawson et al, 1960a; Dawson et al, 1960b]. Weitere Forschungen führten zu der Hypothese, dass ein Reaktionsschritt die Reduktion von Nicotinsäure zu 3,6-Dihydronicotinsäure darstellt [Leete, 1977]. In den 90 er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurde vorgeschlagen, dass die 3,6-Dihydronicotinsäure mittels Protonenwanderung nach anschließender Decarboxylierung das 1,2-Dihydropyridin liefert [Friesen et al, 1990]. Dieses reagiert mit dem *N*-Methyl-Δ¹-pyrrolium-Salz zu 3,6-Dihydronicotin. Die folgende Oxidation liefert schließlich das (-)-2'-*S*-Nicotin. Hierbei wird das ursprünglich an der C-6-Position der Nicotinsäure gebundene Wasserstoffatom abgespalten und durch Retention eines Wasserstoffatoms, dass bei der Nicotinsäure im Reduktionsschritt zu 3,6-Dihydronicotinsäure eingeführt wurde, liefert schließlich (-)-2'-*S*-Nicotin (Abbildung 17). Alles in den Tabakpflanzen vorhandene Nicotin ist (-)-2'-*S*-Nicotin.

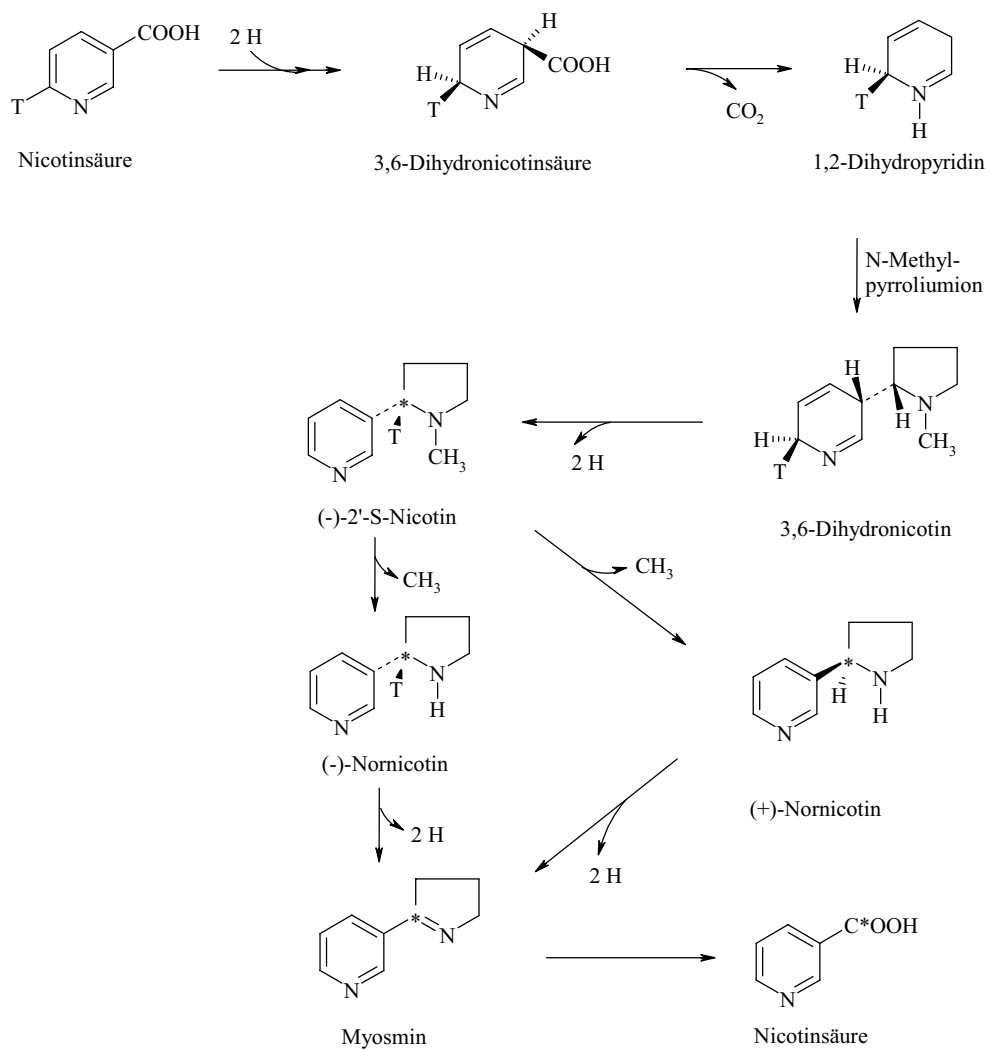


Abbildung 16: Bildung von (-)-2'S-Nicotin, Nornicotin und Myosmin aus Nicotinsäure und N-Methyl-Δ'-pyrrolium-Salz (unter Verwendung Tritium-markierter Verbindungen)

Nornicotin scheint irreversibel aus Nicotin in den grünen Blättern bzw. während der Alterung zu entstehen [Dawson, 1951]. Die Demethylierung von (-)-2'-*S*-Nicotin im Tabak liefert (-)-2'-*S*-Nornicotin und (+)-2'-*R*-Nornicotin in annähernd identischen Mengen (Abbildung 17). Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus zeigen ein Iminium-Salz als Zwischenstufe und eine Tautomerisierung, welche die beobachtete Racemisierung des Nornicotins erklären [Leete et al, 1974]. Die *N*-Demethylierung von Nicotin ist ein wichtiger Schritt im Alkaloid-Metabolismus vieler *Nicotiana*-Species, da es der letzte Reaktionsschritt bei der Synthese von Nornicotin ist. So könnte die Charakterisierung des beteiligten Enzyms Eingriffsmöglichkeiten in die Bildung und Akkumulation von *N*'-Nitrosonornicotin und *N*'-Acylnornicotin in Tabakpflanzen eröffnen.

Durch Dehydrogenierung entsteht in der heranwachsenden Pflanze Myosmin [Kisaki et al, 1966; Leete et al, 1972]. Nach einer Gabe von ^{14}C -Nornicotin an intakte Tabakpflanzen über einen Zeitraum von acht Tagen konnten 55% der Radioaktivität in Nornicotin und 15% in Myosmin wiedergefunden werden. Nach einer Fütterung von 2'- ^{14}C -Myosmin an *Nicotiana glauca* Pflanzen, wurde kein markiertes Nicotin bzw. Nornicotin gefunden. Dies deutet darauf hin, dass die Bildung von Myosmin genauso wie die Bildung von Nicotin und Nornicotin auch irreversibel ist. Es wurde jedoch Radioaktivität bei der Nicotinsäure beobachtet, wobei der Großteil der markierten Kohlenstoffatome in der Carboxyl-Gruppe gebunden ist [Leete, 1977] (Abbildung 17).

„Optimal-Plant-Defense“ Theorie [Herms et al, 1992]

Der Wissenschaftler Stahl entdeckte im 19. Jahrhundert, dass einige der chemischen Eigenschaften von Pflanzen der Verteidigung derer gegen pflanzenfressende Tiere dient. Erst in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts fand Fraenkel heraus, dass dieses Verhältnis zwischen Insekten und Pflanzen von den sekundären Pflanzenstoffen geprägt ist, denen bis dahin keine metabolische Funktion zugeordnet werden konnte. Bis heute ist es so, dass der Mehrzahl der sekundären Pflanzenstoffe hauptsächlich eine ökologische und meist keine metabolische Funktion innerhalb einer Pflanze zukommen. Ausnahmen bilden einige wenige Sekundärstoffe, die beispielsweise am Pflanzenwachstum beteiligt sind. Als ökologische Funktion wird auch die Bedeutung der sekundären Pflanzenstoffe mit ihren abwehrenden Eigenschaften gegen Insekten oder anderen Feinden gesehen. In dieser Zeit wurde viel auf dem Gebiet der Verteidigung von Pflanzen gegenüber Feinden geforscht, mit dem Ergebnis, dass viele Theorien hierzu aufgestellt wurden. Die am besten untersuchte und bis heute diskutierte Theorie ist die „Optimal Defense (OD) Theorie“. Sie besteht im Wesentlichen aus zwei Hypothesen. Die erste Hypothese besagt, dass pflanzliche Organismen eine Verteidigung entwickeln und innerhalb einer Pflanze verteilen, die ihr als Individuum von Vorteil ist und gleichzeitig eine maximale Fitness der Pflanze angestrebt wird. Die zweite Hypothese ist etwas umfangreicher, denn sie beschreibt, dass eine Verteidigung sehr kostspielig ist und damit auch in direkter Relation zur Fitness der Pflanze steht. Im Falle der Abwesenheit von Feinden, zeigt eine weniger gut verteidigte Pflanze eine höhere Fitness als eine gute verteidigte Pflanze. Hiermit steht eine Pflanze in dem Dilemma zwischen ihrer Verteidigung gegenüber Schädlingen und ihrer eigenen Fitness. Die Kosten der Verteidigung sind in Verbindung mit der Fitness der Pflanze und der Verteilung von Nährstoffen und Energie von mehreren Faktoren abhängig:

- a: pflanzliche Organismen entwickeln ihre Verteidigung in direkter Proportion zu dem vom Feind ausgehenden Risiko und in indirekter Proportion zu den Kosten der Verteidigung. Alle anderen Lebensumstände werden zu diesem Zeitpunkt nicht berücksichtigt.
- b: innerhalb des Organismus werden die Verteidigungsstoffe direkt proportional zu der Gefährdung eines Gewebes, d.h. dem am meisten gefährdeten Gewebe zugeordnet wobei dieses immer unter Berücksichtigung der Bedeutung des Gewebes für die Pflanze geschieht. Die Kosten der Verteidigung des entsprechenden Gewebes stehen hierzu im umgekehrten Verhältnis.
- c: Verteidigung ist kostspielig, so dass die Verteidigungsstoffe während der Abwesenheit von Feinden minimiert werden. Im Falle einer akuten Gefährdung werden sie jedoch erhöht.

d: Verteidigung ist kostspielig, so dass nach der Verteilung der Verteidigungsstoffe die Bereitstellung weiterer Verteidigungsstoffe eine positive Funktion der totalen Energie und des Nährstoffbudgets ist, während die Bereitstellung von Energie und Nährstoffen für andere Aufgaben wie Wachstum und Vermehrung dazu in negativer Relation steht.

2 Experimenteller Teil

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Geräte

Kapillarelektrophorese

Zur Analyse der Proben aus pflanzlichen Einzelzellen wurde eine modulare Kapillarelektrophoreseapparatur verwendet. Die Apparatur setzte sich zusammen aus einem variablen UV-Detektor Lambda 1000 (Bischoff, Leonberg), einer Hochspannungseinheit FUG HCN 6M-30000 (F.u.G. Elektronik, Rosenheim) und einem selbst gefertigtem Kunststoffgehäuse, in dem die Elektroden und Elektrolytvorratsgefäße sowie die Enden der CE-Kapillare untergebracht waren. Die Datenaufnahme erfolgte mit der Software McDaq von Bischoff.

Die Trennung und UV-Detektion erfolgte mit innen unbeschichteten Quarzglaskapillaren 'fused silica' der Firma CS Chromatographieservice GmbH (Langerwehe) mit I.D. von 50 µm, einem A.D. von 360 µm und einer Länge bis zu 80 cm. Zur Verringerung der Bruchempfindlichkeit waren die Kapillaren außen mit einer Polyimidschicht belegt. Die Detektion erfolgte on-column durch Entfernen von 0,5 cm der Polyimidschicht an einer Stelle der Kapillare auf der Höhe des Detektorfensters. Die Probenaufgabe erfolgte hydrostatisch durch Austausch des Elektrolytgefäßes auf der Injektionsseite gegen ein Probengefäß und Anheben dieses Gefäßes für 60 s auf eine Höhendifferenz von 5 cm gegenüber dem anderen Kapillarende.

Größere Probenmengen und Serienmessungen wie die Analysen der pflanzlichen Extrakte wurden mit einer Elektrophoreseapparatur von Agilent durchgeführt. Diese Kapillarelektrophorese verfügt über einen Diodenarraydetektor sowie einen integrierten Autosampler. Weiterhin ist es möglich, zeit-, spannungs-, temperatur- und stromprogrammierte Analysen durchzuführen. Die Aufnahme der Daten erfolgte mit der Chemstation von Agilent.

Injektion von Mikro- und Submikro-Volumina und vakuolären Einzelzellproben

Zur Analyse der Einzelzellproben wurde die modulare Kapillarelektrophorese Anlage für eine Injektion unter dem Mikroskop modifiziert (Abbildung 23 'Injektion in die Trennkapillare der Kapillarelektrophorese', Seite 87). Um den Außendurchmesser der CE-Kapillare den Proben im unteren nl-Bereich anzupassen, wurde am Injektionsende der Kapillare 2 cm der Polyimidbeschichtung entfernt und der Außendurchmesser des Kapillarendes durch manuelles Schleifen konisch auf 100 bis 150 μm reduziert. Das Positionieren des Kapillarendes an ein Probentröpfchen erfolgte unter einem Stereomikroskop SMZ-1B (Nikon, Düsseldorf) mit Hilfe eines magnetisch fixierbaren Mikromanipulators (World Precision Instruments, Berlin). Zur Injektion der Probe wurde das Probentröpfchen durch Anlegen eines Unterdrucks an das detektorseitige Elektrolytgefäß in die CE-Kapillare gesaugt. Das Anlegen des Unterdrucks erfolgte mit einer 50 ml Spritze. Zur anschließenden Messung wurde das Kapillarende zusammen mit der Elektrode in ein externes Elektrolytgefäß getaucht und die Hochspannung angelegt.

Probennahme aus einzelnen Vakuolen

Die Beprobung einzelner Vakuolen erfolgte mit Glasmikrokapillaren, die mit Hilfe eines DMZ Universalpullers (Zeitz Instrumente GmbH München) aus Borosilikatröhrchen (Borosilikat mit Innenfilament: AD = 1,5 mm, ID = 0,87 mm, FD = 0,2 mm, Hilgenberg, Malsfeld) auf einen Spitzendurchmesser von 1 μm ausgezogen wurden. Das Programm zum Ziehen der Kapillaren ist in Tabelle 9 dargestellt. Unter dem Mikroskop wurde jede Spitze auf ihre Durchlässigkeit geprüft, indem sie in ein Gefäß mit hochreinem Wasser getaucht und Druck aufgegeben wurde. Durch die Bildung von Gasblasen zeigte sich, ob die Spitze durchlässig war. Die Manipulation bei der Probenahme sowie die Probenvorbereitung wurden mit einem Mikromanipulator von Leitz (Wetzlar) durchgeführt. Als Lichtquellen dienten eine Faserlichtquelle Typ FLQ 85E (Olympus, Hamburg) und ein Fiber Optic Illuminator FO-150 von World Precision Instruments.

Tabelle 9: Programm zum Ziehen der Glasmikrokapillaren: Zug in 2 Schritten

	Schritt A	Schritt B
Heat	460	040
Force (pre-pull)	020	030
Distance (treshold)	100	014
Delay (heatstop)	-	050
Distance (heatstop)	-	-
Delay (pull 1)	-	126
Force (pull 1)	-	080
Distance (pull 2)	-	025
Force (pull 2)	-	120
Adjust	010	-

Aliquotierung und Handhabung der Probe

Die nach der Probenahme in der Spitze der Mikrokapillare befindliche Probe wurde in eine Petrischale (Cell Culture Dish, 2 mm grid, size 35*10 mm, Polystyrol, Nalge Nunc International, USA) überführt. Zum Schutz der Probe vor Verdampfung und Kontamination war die Schale mit hochreinem und mit Wasser gesättigtem Paraffinöl gefüllt. Zur Orientierung und Identifikation der verschiedenen Proben bzw. der weiteren in der Petrischale vorliegenden Tropfen wie interner Standard und Waschwasser für die Kapillaren, haben die Schalen auf deren Unterseite ein Raster, wo jeweils eine Probe in einem Rasterquadrat abgelegt wird. Die zur Probenvorbereitung benötigten angesäuerten Wassertropfen im unteren nl-Bereich wurden mit einer Glaskapillare in jeweils ein Rasterquadrat der Petrischale vorgelegt.

Zur Aliquotierung und internen Standardisierung von Vakuolenproben dienten Konstriktionskapillaren, die aus den zur Probenahme eingesetzten Mikrokapillaren mit einer Mikroschmiede (Singer Instrument, Somerset, UK) hergestellt wurden. Hierbei wird die Kapillare an einer Stelle mit Hilfe eines heißen Drahtes angeschmolzen, wobei eine leicht gebogene Kapillarspitze mit einer Verengung des Innendurchmessers an der

angeschmolzenen Stelle resultiert. Die so hergestellten Konstriktionskapillaren wiesen ein Volumen von der Spitze bis zur Verengung von ca. 5 bis 20 μl auf.

Alle Manipulationsschritte wurden unter einem Stereomikroskop MZ 10 von Leica durchgeführt. Der gesamte Versuchsaufbau befand sich auf einem Arbeitstisch, deren Grundplatte permanent durch angelegte Druckluft schwingungsgedämpft war, um Erschütterungen aus der Umgebung abzufangen.

Die so präparierten Petrischalen erlaubten einen kontaminationsfreien Transport der Proben im Labor, ohne dass eine Kontamination des Paraffinöls durch die Umgebung oder die Hände auftrat. Nach Verschließen der Petrischale konnten die Proben zur Lagerung bei -20°C eingefroren werden.

Massenspektrometrie

Für die Analyse der Proben aus gepoolten pflanzlichen Einzelzellen mit der CE-MS wurde ein CE-System von Beckman (Waldbronn/Germany) P/ACE 5510 mit einem LCQ Ion Trap Massenspektrometer von Thermo Finnigan (San José, CA, USA) gekoppelt. Um ein kürzere als üblich für das kommerziell erhältliche Interface Kit von Beckman verwendete Trennkapillare anwenden zu können, führte die Kapillare direkt in ein laborgefertigtes ESI-Interface. Die Kapillarelektrophoreseapparatur war unmittelbar neben dem Massenspektrometer angebracht, welches selbst um 180° horizontal gedreht war. In der oberen linken Ecke der Kapillarenkassette war ein kleines Loch gebohrt, um durch dieses die Kapillare direkt in das ESI-Interface zu führen. Die Kapillare konnte durch Luftkühlung auf einer konstanten Temperatur gehalten werden. Eine Verbindung für eine Hilfsflüssigkeit „sheath liquid“ wurde mit PEEK Verbindungen hergestellt. Die Hilfsflüssigkeit bestand aus einem Gemisch aus 2-Propanol, Wasser und Essigsäure (50/50/0,5; v/v/v) und wurde mit Hilfe einer 1100 HPLC Pumpe (Hewlett Packard, Waldbronn, Germany) und einem Online Zerstäuber mit einer Flussrate von 4 µl/min erzeugt. Zwischen den einzelnen Messungen wurde die Verbindung für die Hilfsflüssigkeit für ca. 2 s mit der Hilfsflüssigkeit (5ml/min) gespült. Die Spitze des laborgefertigten, coaxialen Elektrosprayinterfaces wurde coaxial zu dem Einlass des Massenspektrometers in einem Abstand von 5mm positioniert. Die Ionisation fand bei + 4,2 kV statt und wurde über eine Online-Kamera kontrolliert. Die Temperatur der beheizten Kapillare wurde auf 150°C gebracht. Es wurde kein Hilfsgas verwendet.

Die Trennung erfolgte mit innen unbeschichteten Quarzglas kapillaren ‘fused silica’ der Firma Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA) mit I.D. von 75 µm, einem A.D. von 360 µm und einer Länge von 50 cm. Die Trennkapillaren wurden vor Gebrauch als auch zu Beginn und Ende jeden Tages für 30 min mit 0,1 N NaOH (20psi) konditioniert. Zwischen den einzelnen Analysen wurde die Kapillare jeweils für 3 min mit 0,1 N NaOH und anschließend mit Elektrolyt gespült. Nach Optimierung der Trennbedingungen wurden die Analysen mit einer Spannung von 20 kV und einem Elektrolyten der Zusammensetzung von 20 mM Ammoniumcarbonat mit einem pH-Wert von 3,61 in 10 % 2-Propanol durchgeführt. Die Proben wurden hydrodynamisch für 5 – 40 s mit 0,5 psi aufgegeben.

Die Aufnahme der Daten erfolgte mit der Software Xcalibur.

Elektronenmikroskop

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem A LEO Gemini VP 1550 variable pressure Instrument durchgeführt.

Weitere Geräte

Zur Reinigung von Paraffinöl bzw. Siliconöl wurde ein Ultraschallbad von Branson Ultrasonics Dansbury USA verwendet.

Bei der Extraktion von Pflanzengewebe dienten weiterhin ein Thermomixer der Firma Eppendorf und eine Zentrifuge 5415d von Eppendorf.

2.1.2 Chemikalien

Zur Handhabung der Vorbereitung und Lagerung von pflanzlichen Mikroproben wurde Paraffinöl (Fluka, Buchs, Schweiz) verwendet. Zum Entfernen von ionischen Verunreinigungen wurde das Öl jeweils 20-mal im Ultraschallbad mit Reinstwasser (Restwiderstand 0,18 MΩm) extrahiert.

Alkaloidstandards bestanden aus 4-Aminopyridin (zur Synthese von Merck), Nicotin (zur Synthese von Merck), Nornicotin (98 % von Fluka) und Anabasin (98 % von Aldrich).

Zur Analyse der Tabakalkaloide wurde ein Elektrolyt aus 150 mM Citronensäure (wasserfrei, zur Synthese von Merck) eingesetzt. Der pH-Wert wurde mit 1 M Natronlauge (zur Analyse von Merck) auf 3,6 eingestellt.

Für die angesäuerten Wassertropfen wurde Reinstwasser mit 1N HCl (Merck) auf ein pH-Wert von 2,5 eingestellt.

Alle Lösungen wurden in Reinstwasser angesetzt, welches einer MilliQ-Reinstwasseranlage mit einem Restwiderstand von 18,2 Ω entnommen wurde.

2.1.3 Pflanzenmaterial

Als Pflanzenmaterial wurde bei allen Versuchen Tabak (Wildtyp *Nicotiana tabacum* cv. Samsun) kultiviert.

Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte nicht wie üblich in Erde, sondern in Quarzsand. Diese Aufzucht wurde gewählt, um eine kontrollierte Nährstoffversorgung, insbesondere bezüglich des Stickstoffs, gewährleisten zu können. Stickstoff ist insofern von Interesse, als dass Stickstoff als ein Hauptnährelement unter anderem zur Synthese von den Tabakalkaloiden und den Aminosäuren benötigt wird (siehe 'Sekundärstoffwechsel von Pflanzen' und 'Synthese und Bedeutung von Alkaloiden in Pflanzen').

In verschiedenen Versuchsdurchführungen wurden Pflanzen unter normalen Stickstoffbedingungen sowie unter Stickstoffmangel angezogen.

Damit der Sand den Pflanzen keine unbekannten Nährstoffe zur Verfügung stellt, wurde der Sand vor der Verwendung durch Waschen mit destilliertem Wasser von Verunreinigungen befreit. Nach dem Waschen mit Wasser wurde der Sand noch mit der jeweils zu verwendenden Nährlösung durchgespült.

Die Schwierigkeit der Pflanzenanzucht auf Sand bestand unter anderem in der Körnung des Sandes. Wurde zu grobkörniger Sand (>1,4 mm) verwendet, so floss die Nährlösung sehr schnell durch den Topf hindurch und führte zu einer raschen Austrocknung des Sandes und somit zu einer nicht optimalen Versorgung der Pflanze. Bei zu feinkörnigem Sand (< 0,6 mm) ergab sich sehr schnell das Problem der Staunässe. Als Folge der permanenten Feuchtigkeit der Pflanzen zeigten die Wurzeln schnell Verfaulungserscheinungen und damit verbunden deutliche Wachstums- und letztendlich Fitnesseinbußen oder Entwicklungseinbußen der Pflanzen.

Durch eine geeignete Mischung verschiedener Sandkörnungen konnte bezüglich des Substrats eine optimale Anzucht der Tabakpflanzen erreicht werden.

Die Sandkörnungen setzten sich folgendermaßen zusammen:

0 - 63 µm	0,273 %
64 - 200 µm	8,201 %
201 - 630 µm	86,692 %
631µm - 2 mm	3,94 %

Ingestad-Nährlösungssystem:

Das Ingestad-Nährlösungssystem wurde von T. Ingestad mit dem Ziel entwickelt, ein möglichst effizientes Anzuchtssystem für forstwirtschaftlich genutzte Pflanzen erhalten. Das Nährlösungssystem basiert auf zwei Annahmen:

1. *Die Nährstoffaufnahme ist proportional zur Wachsrates*
2. *Die relativen Anteile der Nährelemente am Frischgewicht bleiben während der Entwicklung der Pflanze konstant*

Auf Grundlage dessen wurde anhand von umfangreichen Untersuchungen an Birken eine Nährlösung komponiert, die alle Mikro- und Makroelemente in denselben Verhältnissen wie sie in Pflanzen enthalten sind, vorkommen. Diese Nährlösung kann jedoch auch für andere Pflanzen in Sand- oder Hydrokultur angewendet werden. Das Ingestad-Nährlösungssystem stellt eine praktikable Möglichkeit dar, Pflanzen insbesondere unter kontrollierten Nährstoffbedingungen anzuziehen [Ingestad, 1979; Ingestad, 1982].

Das Ingestad-Nährlösungssystem besteht aus zwei Stammlösungen, die in unterschiedlichen Verhältnissen in die verwendeten Nährlösungen eingehen können. Die Stammlösung A besteht im Wesentlichen aus den Makronährelementen, während die Stammlösung B die Mikronährelemente beinhaltet (Tabellen 10 und 11).

Zusammensetzung der Stammlösungen und der verwendeten Nährlösungen:

Beim Ansetzen der Lösungen muss darauf geachtet werden, dass bei zu hohen Konzentrationen die Nährstoffe nicht in Form unlöslicher Produkte ausfallen. Auf Grund dessen wurde beim Ansetzen der Nährlösungen zunächst demineralisiertes Wasser vorgelegt. Anschließend wurde die benötigte Menge der Stammlösungen zugefügt. Nachdem gut geschüttelt wurde, war es noch erforderlich, den pH-Wert mit HCl bzw. KOH auf 5,5 einzustellen. Zum Schluss wurde auf das erforderliche Volumen aufgefüllt und der pH-Wert nochmals überprüft.

Tabelle 10: Stammlösung A

Salz	Molekulargewicht	Einwaage [g] für 2 l	Konzentration [mmol/l]
K ₂ SO ₄	174,27	48,97	141
K ₂ HPO ₄	174,19	38,67	82,3
KH ₂ PO ₄	136,09	35,66	131
KNO ₃	101,11	39,94	197,5
NH ₄ NO ₃	80,05	217,74	1360

Tabelle 11: Stammlösung B

Salz	Molekulargewicht	Einwaage [g] für 2 l	Konzentration [mmol/l]
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	236,16	59,04	125
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	256,43	94,88	185
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$	404	5,064	6,27
$\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	251,01	1,828	3,64
$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	261,44	0,24	0,46
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	170,49	0,0805	0,24
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	241,95	0,0177	0,04
H_3BO_3	61,83	1,144	9,25
HNO_3	63,02	6,094	48,35

Aussaat und Keimung der Pflanzen:

Die Aussaat erfolgte auf Sand, der bis zum 10. Tag mit Ingestad Nährlösung (Stickstoffgehalt: 1 mM) gegossen wurde. Die Keimlinge wurden nach ca. 2 Wochen pikiert und für die nächsten 2 Wochen wiederum mit Ingestad Nährlösung (Stickstoffgehalt: 1 mM) feucht gehalten.

Sandanzucht:

Nach weiteren ca. 2 Wochen wurden die Pflänzchen in 9*9 cm große, mit Sand gefüllte Töpfe umgepflanzt. Nach dem Topfen der Pflänzchen bekamen sie Ingestad Nährlösung mit einem Stickstoffgehalt von 5 mM.

Die Pflanzen, die unter normaler Ernährung aufwachsen sollten, bekamen fortan bis zur Versuchsdurchführung Ingestad Nährlösung mit einem Stickstoffgehalt von 5 mM. Die Pflanzen, die unter Stickstoffmangel wachsen sollten, wurden bis zu einer Sprosslänge von ca. 5 cm mit normaler 5 mM Ingestad Nährlösung bewässert. Anschließend bekamen sie bis zur Versuchsdurchführung 5 mM Ingestad Nährlösung ohne Nitrat.

2.2 Methoden

2.2.1 Trennung der Tabakalkaloide mit der CE

Die Trennung der in der Tabakpflanze am häufigsten vorhandenen Alkaloide Nicotin, Nornicotin und Anabasin wurde mit einem optimierten Citronensäure-Elektrolytsystem durchgeführt. Die Probenaufgabe des Standards erfolgte hydrostatisch für 60 s und 5 cm Höhenunterschied. Die Trennung wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt (siehe Abbildung 17):

Elektrolyt:	Citronensäure
Elektrolytkonzentration:	150 mM
pH-Wert:	3,6
Trennsäule:	fused-silica, unbelegt
Kapillarlänge:	80 cm
Kapillarinne Durchmesser:	50 µm
angelegte Spannung:	23 kV

Die Bestimmung der Analyte erfolgte bei 260 nm durch direkte UV-Detektion. Als interner Standard wurde 4-Aminopyridin verwendet, weil dieses ebenfalls bei 260 nm absorbiert und nicht von dem Paraffinöl aus den Probetropfen extrahiert wird.

Die erreichte Trennstufenzahl der Analyten bei optimalen Bedingungen lag im Bereich zwischen 100 000 und 126 000. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte in einem linearen Bereich zwischen 50 und 500 µM. Die relative Nachweisgrenze liegt bei einer Konzentration von 2 µM. Unter der Annahme, dass die Dichte 1 kg/m^3 und die Viskosität der Probe $1000 \text{ µPa}\cdot\text{s}$ beträgt, die Länge der Kapillare 80 cm und der Innendurchmesser 50 µm, liegt das Injektionsvolumen bei

$$V = 5,62 \text{ nl}$$

Hieraus ergibt sich für die absolute Nachweisgrenze ein Wert von $1,3 \cdot 10^{-14} \text{ mol}$.

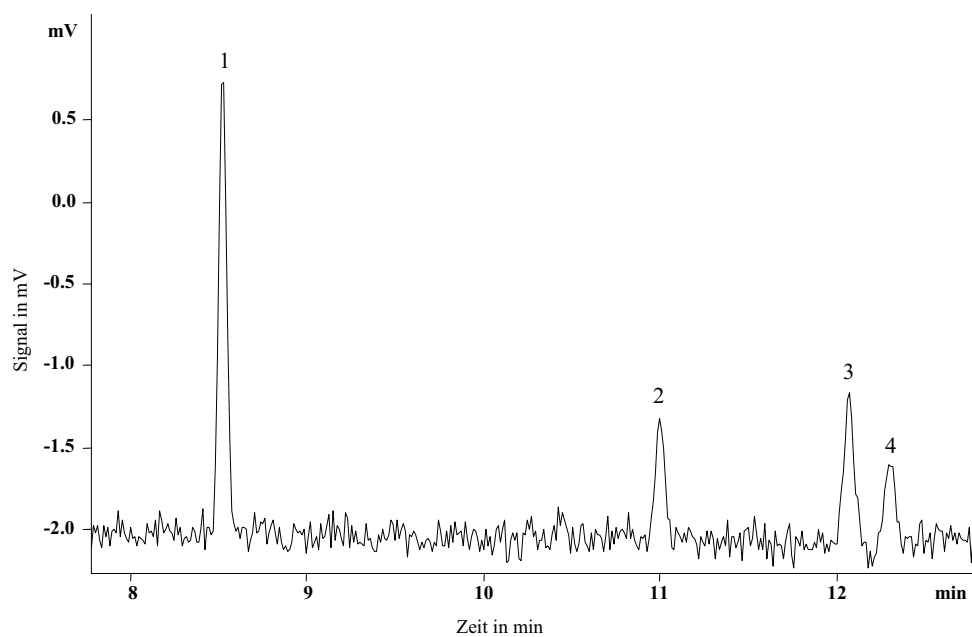


Abbildung 17: Elektropherogramm der Trennung eines Tabakalkaloidstandards

Elektrolyt: Citronensäure, 150 mM, pH-Wert 3,6

Kapillare: Länge 80 cm, 59 cm bis zum Detektor, 50 μm I.D.

Bedingungen: Spannung 23 kV, Strom 100 μA

Detektion: direkte UV, 260 nm

Peaks: 1 4-Aminopyridin (interner Standard); 2 Nornicotin; 3 Nicotin; 4 Anabasin

2.2.2 Methode zur Probenahme und Handhabung von Proben aus Einzelzellen

Probenahme aus einzelnen Vakuolen

Bei der Probennahme von einzelnen Zellen wurde die Vakuole beprobt. Die Vakuole ist das größte Zellorganell einer Pflanzenzelle. Das Volumen einer Vakuole kann in der Pflanzenzelle bis > 70 % des gesamten Zellvolumens einnehmen. In Epidermiszellen teilweise auch > 95 %. So kann das Volumen der Vakuole abhängig von Zelltyp und Alter der Zelle von ca. 10 pl bis hin zu ca. 1 nl bei alten und besonders großen Zellen reichen. Die Vakuole ist unter anderem dafür verantwortlich, dass der Turgor der Zelle aufrechterhalten wird. Dieser kann bis zu 10 bar betragen (siehe 'Morphologie der Pflanzenzelle'). Bei einer Verwundung der Zelle, wie es bei der Probenahme der Fall ist, bricht der Zellturgor zusammen. Dies hat zur Folge, dass aus den umliegenden Zellen Flüssigkeit nachströmt. Aufgrund dessen muss die Beprobung der Zelle sehr schnell erfolgen oder eine Aufrechterhaltung des Turgors muss sichergestellt werden. Die Beprobung der Vakuole einer Zelle wurde mit einer „offenen“ Mikrokapillare durchgeführt, die vor dem Anstechen der Zelle mit einem hochreinen, niedrigviskosen und mit Wasser gesättigtem Paraffinöl gefüllt wurde. Das in der Mikrokapillare befindliche Paraffinöl sollte die vakuoläre Probe vor Verdampfung schützen. Die mit Paraffinöl befüllte Mikrokapillare, die auf einen Spitzendurchmesser von 1 µm ausgezogen wurde, diente zum Anstechen der Pflanzenzelle. Durch den erwähnten Zellturgor herrschte in der Pflanzenzelle ein Überdruck, der beim Anstechen der Zelle einen Teil der vakuolären Flüssigkeit in die Spitze der Mikrokapillare presste. Dieser Vorgang war unter dem Mikroskop sehr gut zu beobachten, da die in die Mikrokapillare vordringende Probenflüssigkeit eine Phasengrenze zwischen dem Siliconöl und der wässrigen Probe ausbildete und der Anstieg dieses Meniskus auf Grund des vorhandenen Zelldrucks sehr sprunghaft war. Die Verweilzeit der Mikrokapillare in der Pflanzenzelle musste unbedingt < 1 s sein, da ansonsten wegen des bereits erwähnten kollabierenden Zellturgors eine Verdünnung der Probe die Folge gewesen wäre. Je nach Turgor der Zelle und Größe der Vakuole können auf diese Weise ca. 10 bis 100 pl Vakuolensaft in die Kapillarspitze gedrückt werden. Die in der Spitze der Glasmikrokapillaren befindliche vakuoläre Probe wies jedoch ein unbekanntes Volumen auf und wurde zur weiteren Probenvorbereitung in eine Petrischale überführt. Die Petrischale war ebenfalls mit hochreinem, niedrigviskosem und wassergesättigtem Paraffinöl gefüllt, damit die Probe weiterhin von einem Schutzmedium vor Verdampfung und Verschmutzung umgeben war. Die Überführung der Kapillarspitze in die ölgefüllte Petrischale sollte ebenfalls schnell geschehen, damit auch in diesem Arbeitsschritt der

Kontakt der Vakuolenprobe mit der Umgebungsluft und damit die Gefahr der Verdampfung und Kontamination der Probe minimiert wurde. Am Ende der Mikrokapillare war über eine Schlauchverbindung eine Spritze angeschlossen, mit deren Hilfe Über- oder Unterdruck in der Mikrokapillare erzeugt werden konnte, um so die Probe zu manipulieren. Auf diese Art und Weise wurde das Probentröpfchen zur weiteren Probenvorbereitung aus der Kapillarspitze auf den Boden der mit Paraffinöl gefüllten Petrischale abgelegt. Der Tropfen war in dieser Lage von einer Paraffinölschicht von mindestens 5 mm Dicke bedeckt. Die Probenahme und Probenablage erfolgten unter einem Stereomikroskop, während die in einen Elektrodenhalter eingespannte Glasmikrokapillare über einen Mikromanipulator gezielt gesteuert werden konnte. Der hierbei verwendete Versuchsaufbau ist in Abbildung 18 schematisch dargestellt. Um eine bestimmte Zelle gezielt anstechen zu können, ist eine genaue räumliche Orientierung und ein präzises Manipulieren der Mikrokapillare notwendig (siehe Abbildung 19). Hierzu wurde das zu beprobende Pflanzenmaterial flach liegend auf einem im 45° Winkel zur optischen Achse des Mikroskops angeordneten Objektträger fixiert. Mit Hilfe des Mikromanipulators wurde die Spitze der Mikrokapillare in einem 90° Winkel (zur optischen Achse des Mikroskops) an die Pflanzenzelle herangeführt. Durch das Heranführen der Kapillare im 90° Winkel, verblieb sie immer in einer Schärfeebene des Mikroskops und die Zelle konnte im 45° Winkel angestochen werden. Durch diese Winkelkonstellation wurde die Gefahr des lateralen Aufschlitzens der Zelle minimiert. Außerdem musste die Spitze der Mikrokapillare auf diese Weise keine zu dicke Zellwandschicht durchdringen, wodurch ein Blockieren der Kapillarspitze durch Zellwandmaterial verhindert wurde.

Durch die beschriebene Handhabung der Probennahme konnten Zellen der Blattober- und Unterseite direkt beprobt werden. Anders als bei dieser Probennahme aus der oberen und unteren Epidermis hingegen, konnte das Mesophyll nicht direkt mit der in den Mikromanipulator eingespannten Kapillare angestochen werden. Da das Mesophyll das innen liegende Gewebe eines Blattes und von der oberen und unteren Epidermis eingeschlossen ist, musste die Epidermis zunächst überwunden werden. Hierzu wurde mit der Kapillare durch die obere Epidermis hindurch gestochen. Um bei diesem Schritt der Probennahme zu verhindern, dass beim Durchstechen der Epidermis Zellinhalt epidermaler Zellen in die Mikrokapillare gelangte, wurde ein Überdruck an die Kapillare angelegt. Dieser Überdruck durfte jedoch nicht so stark sein, dass dadurch das schützende Paraffinöl wieder aus der Probennahmekapillare herausgedrückt wurde. Auf diese Art und Weise konnte die Kapillare ungehindert durch die Epidermis geführt werden. War die Kapillare bis ins Mesophyll geführt, so wurde der angelegte Überdruck weggenommen, so dass wie bei der bereits

beschriebenen Probennahme die Vakuolenflüssigkeit in die Kapillare gelangte. Die weitere Handhabung der Probe wurde identisch zu den Einzelzellproben aus der Epidermis durchgeführt.

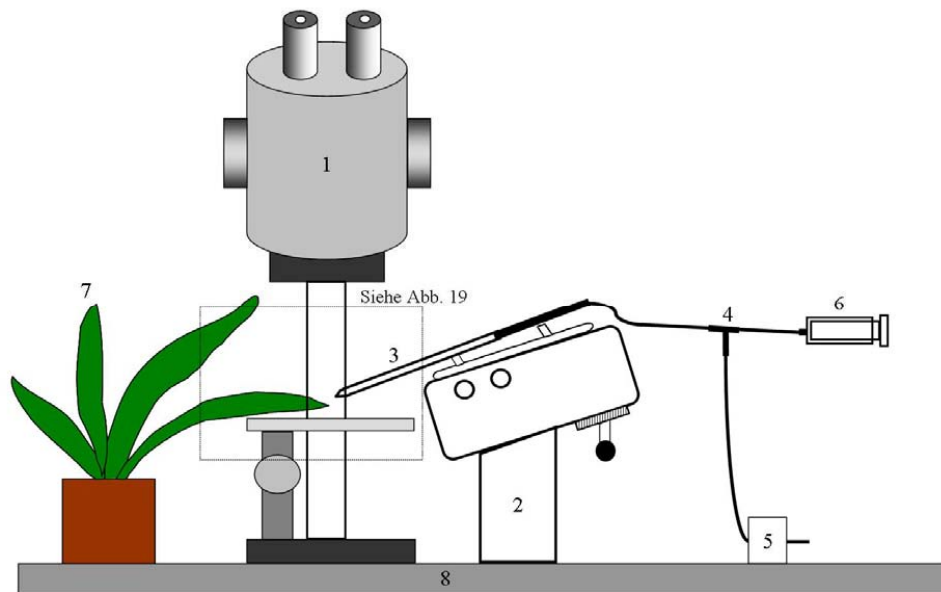


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Apparatur zur Probenahme aus Einzelzellen:

1 Mikroskop, 2 Mikromanipulator, 3 Mikrokapillare, 4 Schlauchsystem, 5 Ventil, 6 Spritze, 7 Pflanzmaterial, 8 schwingungsgedämpfter Tisch

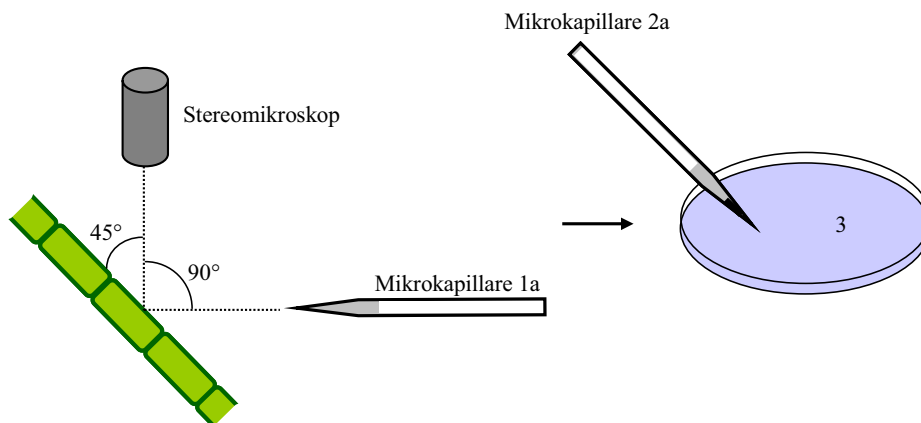


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Anordnung zur Probenahme: Mikrokapillare: 1a vor der Probenahme mit Paraffinöl gefüllt, 2a: mit vakuolärer Probe, 3: Petrischale mit Paraffinöl

Probenvorbereitung

An die eigentliche Probenahme schloss sich eine Probenvorbereitung an, die mehrere Ziele verfolgte:

- Das Volumen der Vakuolenprobe war unbekannt, da die vakuoläre Flüssigkeit durch den Zellturgor in die Glasmikrokapillare gepresst worden war. Deswegen war eine Prozedur zur Bestimmung des Volumens der Vakuolenprobe notwendig. Anderenfalls wäre eine Bestimmung der Absolutkonzentration der Analyte in der Vakuole überhaupt nicht möglich gewesen.
- Unverdünnte pflanzliche Proben weisen grundsätzlich hohe Ionenstärken auf. Aufgrund dessen sollte eine Verdünnung der Vakuolenprobe durchgeführt werden, damit die Ionenstärke der Probe der Ionenstärke des CE-Elektrolyten angepasst war. Hierbei war zudem eine Verdünnung der Probe zu einem Volumen von wenigen nl anzustreben. Ein Volumen von wenigen nl liegt nämlich genau im Bereich der normalen Injektionsvolumina der Kapillarelektrophorese. Außerdem war die Injektion eines nl-Tropfens in die Trennkapillare unter dem Mikroskop leichter zu beobachten, denn Probetropfen und Kapillardurchmesser hatten ähnliche Größendimensionen.
- Alle Arbeitsschritte mussten unter einer Schutzatmosphäre stattfinden, um eine Kontamination oder Verdampfung der Probe ausschließen zu können.
- Um eine Trennung der Probenahme an dem Standort der Pflanzen und der Analyse der Proben im Labor zu ermöglichen, musste ein Transport der Proben praktikabel sein.
- Im Falle eines mit Hilfe der Mikrokapillaren ausreichend großen extrahierten Probenvolumens aus einer einzelnen Zelle, wäre eine Aliquotierung der Vakuolenprobe in Unterproben möglich. Dies hätte den Vorteil, dass eine wiederholte Bestimmung der Analyte mit einem CE-System durchgeführt werden kann und somit eine höhere Sicherheit der Ergebnisse gegeben wäre. Darüber hinaus wäre es möglich eine größere Anzahl von Komponenten durch Injektion in verschiedene CE-Systeme zu quantifizieren.

Wie bereits erwähnt diente die Probenvorbereitung unter anderem dazu, das Volumen der Vakuolenprobe zu bestimmen. Die Volumenbestimmung der pl-Proben konnte allerdings

nicht durch kalibrierte Systeme wie beispielsweise skalierte Pipetten erfolgen, da diese im μl Maßstab nicht auf dem Markt erhältlich sind. Es gab zwei Möglichkeiten, das Volumen der Probe zu ermitteln. Die eine Möglichkeit ergab sich daraus, dass die vakuoläre Probe als fast kugelförmiges Tröpfchen am Boden der Petrischale vorlag. Die Kugelform resultierte aus der Oberflächenspannung des wässrigen Tröpfchens und der Nichtbenetzbarkeit des Polyethylenmaterials der paraffinnölgefüllten Petrischale mit Wasser. Dadurch dass der Tropfen allerdings am Boden der Schale auflag, führte das Aufliegen jedoch zu einer Abweichung von der Kugelform an dieser Stelle. Es wäre nun möglich gewesen, mit Hilfe eines skalierten Objektivs die Bestimmung des Tropfenvolumens ungefähr durch Bestimmung des Tropfendurchmessers zu ermitteln, aber auf Grund der Abweichung vom idealen Kugelvolumen hätten sich Ungenauigkeiten ergeben. Bei so kleinen Durchmessern, wie es insbesondere bei Tropfen im μl Bereich der Fall ist, wäre außerdem der Ablesefehler der Skalierung nicht unerheblich gewesen. Die Abbildung 20 zeigt eine Visualisierung eines Tropfens im μl Bereich.

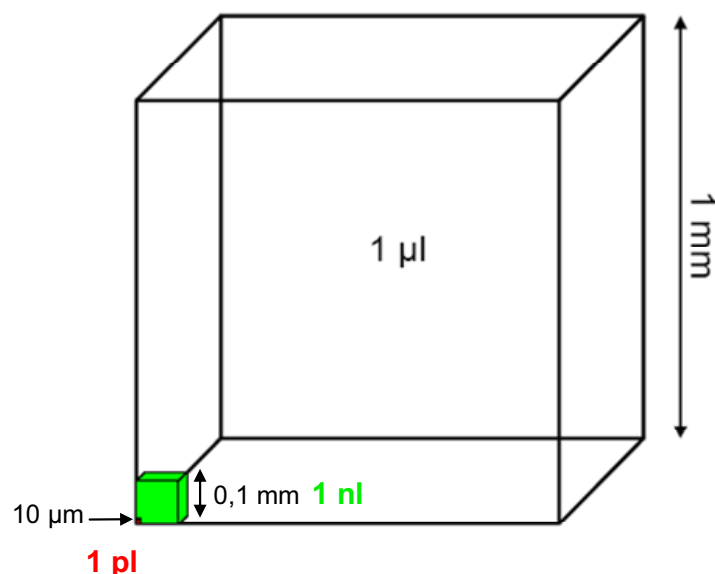


Abbildung 20: Visualisierung eines Tropfens im μl Bereich

Bazzanella et al entwickelten aus diesem Grund eine Methode, die auf einer indirekten Volumenbestimmung durch Addition zweier identischer Volumina beruht [Bazzanella et al, 1998a]. Hierbei wurden identische Volumina der Vakuolenprobe und eines internen Standards bekannter Konzentration in einem Wassertropfen vereint. Bei der späteren Analyse mit der

Kapillarelektrophorese wurde die Absolutmenge des internen Standards bestimmt, wodurch sich das Volumen bzw. die Analytkonzentration der Probe ermitteln ließ. Das Verfahren der indirekten Volumenbestimmung ist in Abbildung 22 dargestellt und soll im Folgenden beschrieben werden.

Vor der eigentlichen Probenahme wurde die zur Probenablage und Probenvorbereitung benötigte Petrischale präpariert. Zunächst wurde die Petrischale mit dem hochreinen reinstwassergesättigten Paraffinnöl befüllt. Sodann wurden in regelmäßigen Abständen in den Rasterquadraten angesäuerte Wassertropfen aus Reinstwasser, die eine ungefähre Größe von ca. 5 nl hatten, vorgelegt (siehe 'Aliquotierung und Handhabung der Probe', Seite 73). Ein Ansäuern des Wassers für die Wassertropfen mit 1N HCl auf einen pH-Wert von 2,5 sollte dazu dienen, dass das Nicotin in den Proben diprotoniert wurde und dadurch einen lagerstabilen Zustand erreichen sollte. Auf diese Weise wurde verhindert, dass Nicotin in das umgebende Paraffinnöl diffundiert. Neben den nl-Wassertropfen wurden noch größere Wassertropfen als Waschwasser für die Konstriktionskapillare abgelegt sowie in ein Feld ein Tropfen des internen Standards. Die übrigen Felder blieben leer, um dort nach der Probenahme die einzelnen Vakuolenproben abzulegen. Zur Erzeugung identischer Volumina aus der vakuolären Probe und dem internen Standard wurden die Konstriktionskapillaren verwendet (siehe 'Aliquotierung und Handhabung der Probe', Seite 73). Diese Mikrokapillaren besitzen an einer Stelle eine Verjüngung des Innendurchmessers auf wenige μm . Um identische Volumina zu erzeugen, wurde zunächst Paraffinnöl in die Konstriktionskapillare aufgezogen. Anschließend wurde die Spitze der Kapillare gezielt zu dem Vakuolentropfen geführt, um mit Hilfe der Spritze durch Anlegen eines Unterdrucks ein Aliquot der Vakuolenprobe bis zu der Verengung des Innendurchmessers aufzuziehen. Das Volumen einer solchen Konstriktionskapillare kann von der Spitze bis zu der Verengung je nach Größe zwischen 5 und 25 pl betragen (siehe Abbildung 21). Im Gegensatz zu einer sich konisch aufweitenden Mikrokapillare ist es mit der Konstriktionskapillare auf grund ihrer starken Verengung des Innendurchmessers möglich, reproduzierbare pl-Proben gleichen Volumens mit einem minimalem Fehler abzumessen.

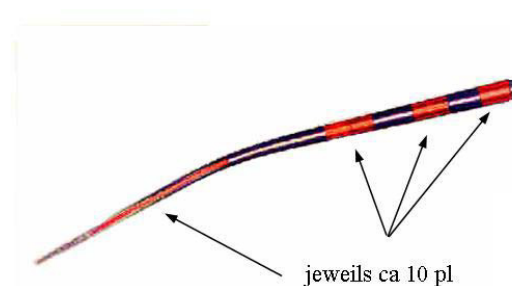


Abbildung 21: Konstriktionskapillare mit Aliquoten vakuolärer Proben mit identischem Volumen; jede Probe ist an beiden Seiten durch eine Zone von Paraffinöl voneinander getrennt

Nach dem Aufziehen eines Aliquots der Vakuolenprobe wurde die Konstriktionskapillare über den Mikromanipulator zu einem der abgelegten angesäuerten Wassertropfen geführt. Während dieser Bewegung blieb die Konstriktionskapillare die ganze Zeit in das Paraffinöl eingetaucht, um die Probe nach wie vor nicht der Umgebungsluft auszusetzen und Verdampfung und Verunreinigung auszuschließen. Durch Anlegen von Überdruck mit der Spritze wurde das Aliquot in den Wassertropfen gebracht. Wie bereits erwähnt diente dieser Verdünnungsschritt zur Reduzierung der Ionenstärke der Probe, um diese dem CE-Elektrolyten anzupassen. Darüber hinaus lag die Probe nun in einem Tropfen von ca. 200 μm Durchmesser vor, dessen Dimension in etwa der eines Außendurchmessers einer CE-Kapillare entsprach. Eine angespitzte CE-Kapillare hat einen ungefähren Außendurchmesser von 100 bis 150 μm verglichen mit lediglich 25 bis 40 μm Tropfendurchmesser einer Vakuolenprobe. War das Volumen der entnommenen Vakuolenprobe ausreichend groß, so konnten von einer Probe mehrere Aliquote hergestellt werden, die jeweils in verschiedene Wassertropfen überführt wurden.

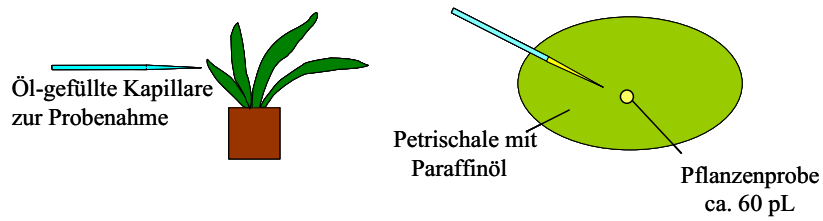
Nach der Volumenabmessung der Probe wurde die Konstriktionskapillare in einem der größeren Wassertropfen durch Ansaugen und Rausdrücken von Wasser gespült. Im nächsten Arbeitsschritt wurde dieselbe Konstriktionskapillare zum Abmessen des Volumens von dem internen Standard verwendet. Genau wie beim Aliquotieren der Vakuolenprobe wurde ein Aliquot des internen Standards abgemessen und auf die gleiche Weise wie beschrieben in den bereits mit einem Aliquot der Probe beladenen Wassertropfen überführt. In einem Wassertropfen lagen nun jeweils identische Volumina an Vakuolenprobe und internem

Standard, von dem die Konzentration bekannt war, vor. Die bis hierher beschriebene Prozedur der Probenvorbereitung wurde für alle entnommenen vakuolären Proben durchgeführt. Die so zur Messung mit der Kapillarelektrophorese vorbereiteten Proben wurden mittels eines Eddings auf der Unterseite der Petrischale nummeriert, um später eine zweifelsfreie Zuordnung der Proben sicherzustellen.

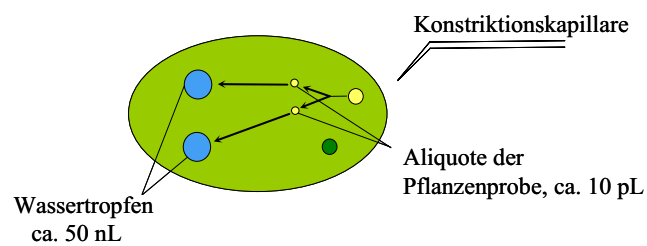
Das Volumen des Probenaliquots war zwar nach wie vor unbekannt, aber da in dem Wassertropfen die Probe und der interne Standard, von dem die Konzentration bekannt war, in dem selben Verhältnis vorlagen, war es möglich, über die Konzentration des internen Standards auch die Konzentration des Analyts zu bestimmen. Hiermit entfiel auch die Volumenbestimmung der Probe mittels Vermessung des Probendurchmessers mit einem skalierten Objektiv des Mikroskops. Nach der dargestellten Probenvorbereitung lagen die Proben in einer Form vor, in der sie direkt in die Trennkapillare der Kapillarelektrophorese injiziert werden konnten.

Alle Arbeitsschritte der Probenaliquotierung, Verdünnung und interne Standardisierung wurden alle ausschließlich in der Petrischale unter dem schützenden Paraffinöl durchgeführt. Das beschriebene Probenvorbereitungsverfahren erlaubte während aller Arbeitsschritte eine kontaminations- und verdampfungsfreie Handhabung der vakuolären pl-Proben. In einer Petrischale konnten alle entnommen vakuolären Proben bei -20°C problemlos gelagert werden. Die vorbereiteten Wassertropfchen mit den aliquotierten Proben veränderten auch bei der Lagerung oder einem Transport in gefrorenem Zustand nicht die Position, so dass sie auch nach Transport und Lagerung zweifelsfrei identifiziert werden konnten.

1. Probenahme:



2. Aliquotieren der Pflanzenproben zur Volumenabmessung und Verdünnung:



3. Quantifizierung durch Zugabe eines internen Standards:

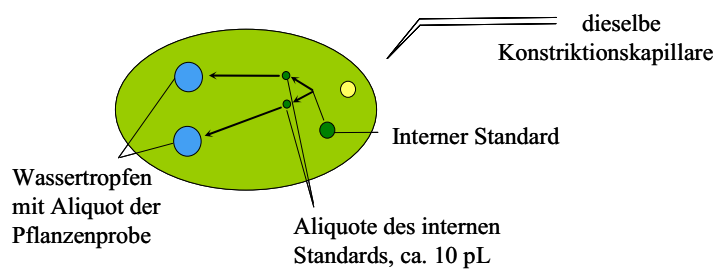


Abbildung 22: Probenvorbereitung der vakuolären Proben vor der Injektion in das CE-System

Injektion in die Trennkapillare der Kapillarelektrophorese

An die Probenvorbereitung schließt sich die Überführung der präparierten Proben in die Trennkapillare der Kapillarelektrophorese an. Der experimentelle Aufbau der Kapillarelektrophorese ist in Abbildung 23 dargestellt.

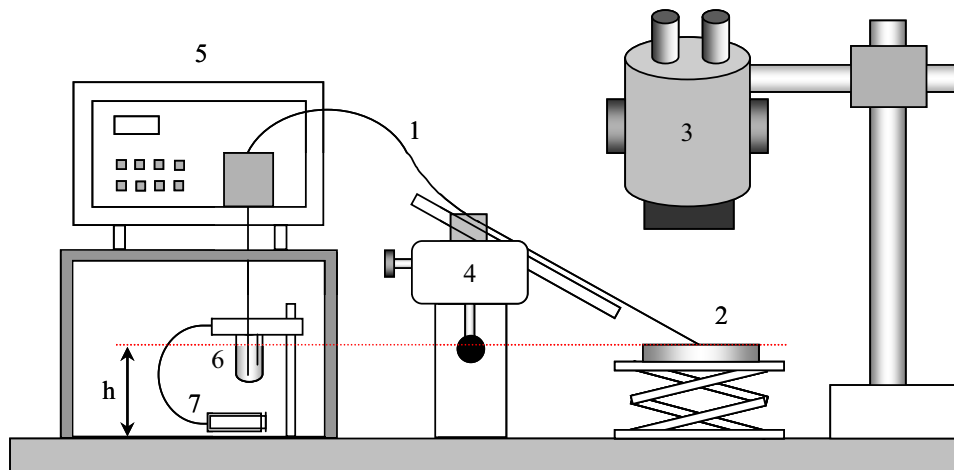


Abbildung 23: Experimenteller Aufbau der zur Injektion präparierten Einzelzellproben in die Kapillarelektrophorese: 1 Trennkapillare, 2 Petrischale mit vakuolären Einzelzellproben unter Paraffinöl bzw. Elektrolytgefäß mit Elektrode, 3 Mikroskop, 4 Mikromanipulator, 5 UV-Detektor, 6 Elektrolytgefäß, 7 Spritze zum Anlegen des Unterdrucks für die Probeninjektion

Die mit Paraffinöl gefüllte Petrischale und den darin befindlichen Proben wurde unter dem Stereomikroskop so positioniert, dass die CE-Kapillare mit dem Mikromanipulator an das vorbereitete Probetröpfchen herangeführt und „angestochen“ werden konnte (siehe Abbildung 24).

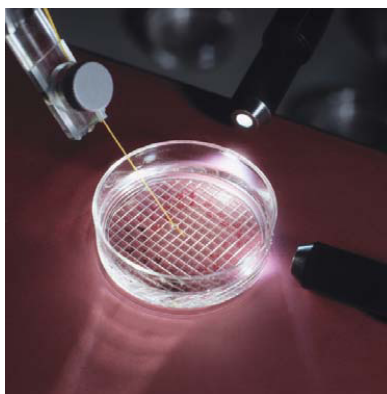


Abbildung 24: Injektion des Probetröpfchens in die Trennkapillare der Kapillarelektrophorese

Das Volumen der mit Probe beladenen Wassertropfen von ca. 5 nl entspricht einem typischen Injektionsvolumina in der Kapillarelektrophorese, so dass der Tropfen vollständig eingezogen werden konnte. Der Probetropfen wurde durch Anlegen eines Unterdrucks an der Kathodenseite, der mit Hilfe einer Spritze erzeugt wurde, in die Kapillare gesaugt. Zur Erleichterung des Injektionsvorgangs wurde der Außendurchmesser der Trennkapillare von 360 μm auf ca. 100 bis 150 μm konisch verjüngt, womit der Außendurchmesser ungefähr dem Durchmesser der Probetröpfchen entsprach. Hierzu wurde die Kapillare auf einem Sandpapier der Körnung P 600 hin und her gedreht. Zudem konnte so die Kapillaröffnung bis auf den Boden der Petrischale geführt werden (siehe Abbildung 25). Die wässrige Probe benetzte das PE-Material der die Proben enthaltenden Petrischale nicht, so dass der Probetropfen restlos injiziert werden konnte, ohne dass nach dem Aufsaugen der Probe ein Film oder kleinere Tröpfchen am Boden der Schale verblieben. Zur Vermeidung eines hydrostatischen Flusses mussten der Meniskus des Elektrolytgefäßes auf der Auslassseite und der Petrischale sich auf der gleichen Höhe (h) befinden. Nach der Injektion des Probetropfens wurde die Petrischale gegen ein Elektrolytgefäß mit einer Elektrode ausgetauscht und durch Einschalten der Hochspannung Spannung angelegt, wodurch die Trennung der Komponenten begann. Vor jeder neuen Injektion wurde das Endstück der Kapillare vor dem Eintauchen in die mit Paraffinöl gefüllte Petrischale mit hochreinem Wasser gereinigt, um Kontaminationen durch eventuell an der Kapillaraußenseite anhaftende Tröpfchen zu vermeiden. Auch bei dem Arbeitsschritt der Injektion der Probetropfen in die Kapillarelektrophorese wurde die Probe nicht mit Umgebungsluft in Kontakt gebracht, da sich die Probe nach wie vor die ganze Zeit unter dem schützenden Paraffinöl befand.

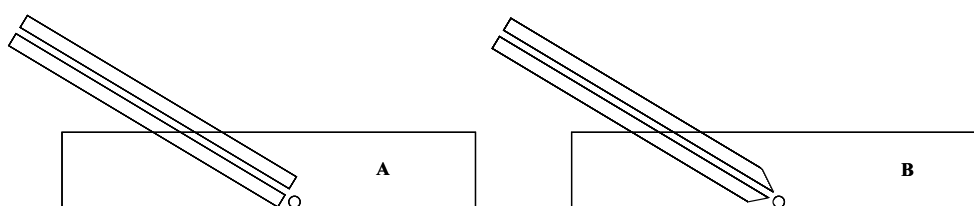


Abbildung 25: Injektion von nl Tropfen mit einer normalen CE-Kapillare (A) und einer am Ende konisch geschliffenen Kapillare (B)

Kontamination der Probe

Um weitestgehend kontaminationsfrei zu arbeiten, wurden während der gesamten Prozedur der Probenvorbereitung bis hin zur Injektion der Probetropfen in die Trennkapillare sowohl die vakuolären Proben als auch die benötigten Wassertropfen und Standardtropfen unter Paraffinöl gehandhabt. Durch diese Vorgehensweise sollte eine Kontamination durch die Umgebungsluft oder eine Verdampfung der Tropfen verhindert werden. Hierzu musste das Paraffinöl eine entsprechend hohe Reinheit aufweisen und es wurde zuvor mehrfach mit hochreinem Wasser extrahiert.

Darüber hinaus wurden einige Wassertropfen auf dem Boden der Petrischale abgelegt, um zu überprüfen, ob eventuelle Kontaminationen auf die Handhabung mit den verwendeten Geräten zurückzuführen ist. Kontaminationen durch die Konstriktionskapillare wurde überprüft, indem mit ihr interner Standard aufgezogen wurde und damit einige Wassertropfen beladen wurden. Die erste Analyse eines Wassertropfens wurde direkt nach dem Ablegen der Tropfen auf dem Boden der Petrischale durchgeführt. Das Elektropherogramm (siehe Abbildung 26) weist keine Signale auf, die auf eine Kontamination hindeuten könnten. Danach wurde die Petrischale offen im Labor stehen gelassen und nach 120 min mit der Konstriktionskapillare ein Aliquot eines 4-Aminopyridins Standards hinzugefügt. Die Analyse dieses Wassertropfens zeigte neben dem Peak des internen Standards wiederum keine Signale, die auf eine Verunreinigung hätten schließen lassen können.

Zwischen verschiedenen Proben bzw. bei dem Wechsel von der Probe zu dem internen Standard wurde die Konstriktionskapillare in einem in der Petrischale vorliegenden Waschwassertropfen gespült. Dies sollte eine Verschleppung von Substanzen verhindern. Außerdem konnte so dieselbe Konstriktionskapillare zum Aliquotieren für mehrere verschiedene Proben verwendet werden. Durch das Waschen zwischen den verschiedenen Proben und Standards wurden keine Kontaminationen durch die Konstriktionskapillare beobachtet. Für die einzelnen Probenahmen wurden jeweils neue ungebrauchte Kapillaren verwendet, so dass eine Kontamination durch die Probenahmekapillaren ausgeschlossen werden konnte.

In der Literatur wird hingegen von Kontaminationen durch Carbonat berichtet. Yi et al. beschreiben Carbonatkontaminationen bei der komplexometrischen diffusen Mikrotitration von Metallkationen in pl-Tröpfchen unter einer schützenden Heptanschicht [Yi et al. 1996]. Das in der Luft zu etwa 0,03 % enthaltene CO₂ besitzt hydrophoben Charakter und ist in Paraffinöl löslich. Ohne weitere Schutzmaßnahmen der Petrischale vor der Umgebungsluft ist deshalb mit einer Carbonatkontamination der Proben zu rechnen. Eine Möglichkeit zur

Vermeidung einer solchen Kontamination beschreiben Yi et al. darin, dass ein konstanter Stickstoffstrom über die Heptanoberfläche geleitet wird. Da jedoch bei den durchgeführten Experimenten Carbonat nicht von Interesse war und auch in dem vorliegenden Elektrolytssystem nicht als Peak erkennbar war, konnte auf eine Handhabung der Proben unter Inertgasatmosphäre verzichtet werden.

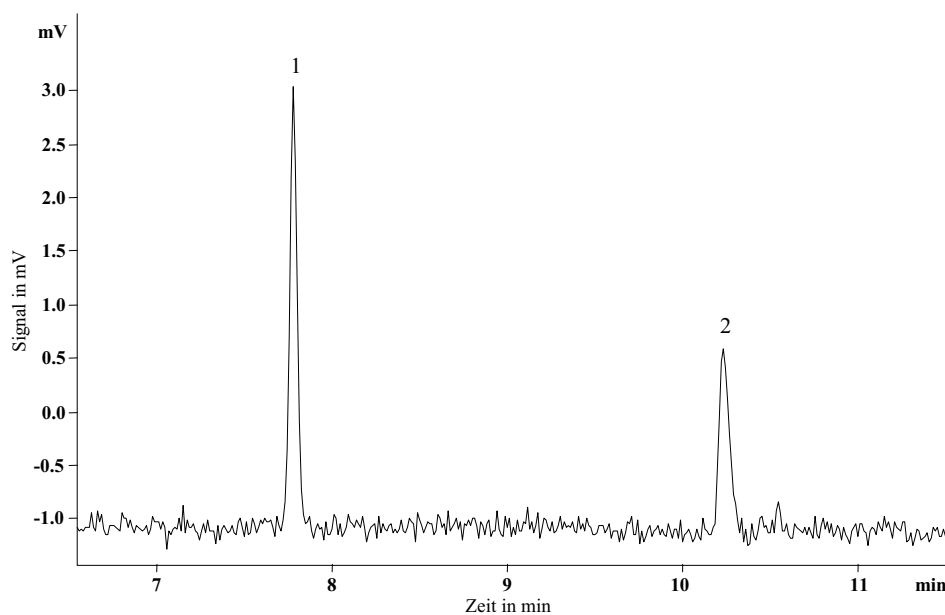


Abbildung 26: Elektropherogramm einer Einzelzellprobe; 1: 4-Aminopyridin; 2: Nicotin

Extraktion der Analyten durch das Paraffinöl

Das Paraffinöl muss als geeignetes Aufbewahrungsmittel für die vakuolären Einzelzellproben wichtige Voraussetzungen erfüllen. Zum einen sollte das Paraffinöl die Verdampfung der Probetropfen verhindern, zum anderen durfte es aber keine Probekomponenten extrahieren. Darüber hinaus musste das Aufbewahrungsmedium eine von Wasser unterschiedliche Dichte aufweisen.

Aufgrund der großen Grenzfläche zwischen den Probetropfen aus den einzelnen Zellen im pl-Bereich und dem umgebenden Paraffinöl kann ein schneller Stoffaustausch zwischen diesen beiden Phasen stattfinden, so dass bei einem ungünstigen Verteilungsgleichgewicht eine Extraktion von Analyten aus den Probetropfen resultieren könnte, denn das Volumen der Paraffinölphase ist im Vergleich zum Tropfenvolumen sehr groß. Eine solche Extraktion kann aber auch noch nach der Aliquotierung und Überführung in die Wassertropfen stattfinden. Als Folge der Extraktion würden bei der Analyse bestimmte Analytkonzentration zu geringe Ergebnisse aufweisen. Außerdem würden die Konzentrationsverhältnisse der Komponenten zueinander verändert werden, wenn sich die Verteilungskoeffizienten der verschiedenen Analyte unterscheiden. Unter diesen Bedingungen wäre die gesamte Probenahme und Analytik zunichte gewesen. Somit war es wichtig die Verteilungskoeffizienten zu kennen um Aussagen über das Verteilungsgleichgewicht machen zu können. Der Verteilungskoeffizient der jeweiligen Analyten war von ihrer Polarität abhängig. Denn die Voraussetzung für die Extraktion von Komponenten aus dem Probetropfen in das Paraffinöl, ist ein unpolarer Anteil, denn Paraffinöl setzt sich aus mehreren langkettigen Alkanen zusammen. Bei Nicotin ist ein unpolarer Anteil vorhanden. Im Gegensatz zu Nornicotin und Anabasin trägt Nicotin eine Methylgruppe am Stickstoff des Pyrrolidinrings. Eine Extraktion des Nicotins in das Paraffinöl ist pH Wert abhängig. Durch Herabsetzen des pH Wertes mit 0,1 M HCl auf pH 2,5 wurde Nicotin protoniert und somit in eine polare Form überführt, womit eine Extraktion in das Paraffinöl verhindert werden konnte. Bei höheren pH-Werten, wie es bei pflanzlichen Proben aus Vakuolen der Fall ist, war eine Extraktion bereits nach 1 Stunde zu erkennen. Für die vakuolären Einzelzellproben war es deshalb wichtig, dass die Probe nach dem Aliquotieren in einen angesäuerten Wassertropfen mit einem pH Wert von 2,5 überführt wurde.

2.2.3 Pflanzliche Extrakte

Für die Bestimmung von den Tabakalkaloiden in verschiedenen Blattsegmenten wurden aus den Blättern der Pflanzen je nach Größe der Blätter bis zu sechs Blattscheiben entnommen. Es wurden immer dieselben Blattregionen beprobt, die Blattspitze, die Blattmitte und der Blattgrund.

Hierzu wurden die Blattscheiben mittels Korkbohrern (verwendete Durchmesser: 1cm) auf einem Kunststoffbrett ausgestanzt. Sofort nach dem Ausstanzen wurde das Frischgewicht bestimmt und das Probenmaterial anschließend in Eppendorf-Cups in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Vor der Extraktion wurden die schockgefrorenen Blattstücke vorsichtig mit einem Glasstab zerkleinert. Nach anschließender Zugabe von 0,5 ml der Extraktionslösung aus 60 % Wasser, 40 % Methanol und 0,1 % 1M HCl wurde 10 Minuten im Ultraschallbad und weiteren 10 Minuten in einem Rotationsschüttler extrahiert. Schließlich wurde der Feststoff bei 13000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgetrennt und das verbleibende Pellet zwei weiteren Extraktionen unterzogen. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die Alkaloide nach dreimaligem Extrahieren vollständig aus dem Blatt herausgelöst waren. Nach Vereinigung der einzelnen Extraktfraktionen wurde 4-Aminopyridin als interner Standard zugesetzt. Die Trennung der Tabakalkaloide erfolgte bei den unter den in 'Trennung der Tabakalkaloide mit der CE' beschriebenen Bedingungen.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse gehen aus Untersuchungen hervor, die alle an selbst kultivierten Tabakpflanzen durchgeführt wurden. Die Pflanzen stellen ein lebendiges System dar, welches einer Vielzahl von äußeren Einflüssen unterworfen ist. Als äußere Einflüsse, der die Pflanzen ausgesetzt sind, zählen zum einen die Anzuchtbedingungen. Unter den Anzuchtbedingungen werden die tägliche Dauer und Intensität des Lichts, Temperatur, Luftfeuchtigkeit und die Versorgung mit Nährstoffen verstanden. Außerdem reagieren Tabakpflanzen auf Verletzungen oder Infektionen mit einer Änderung ihres Sekundärstoffwechsels und es ist sehr wesentlich, wie die Pflanze solchen Einflüssen ausgesetzt ist. Die Art der Verletzung spielt genauso eine Rolle wie die Schwere der Verletzung und letztendlich auch der Ort, an dem die Pflanze verletzt wurde. Darüber hinaus ist das Entwicklungsstadium (junger Spross, Blütezeit oder Samenbildung) der Pflanze zum Zeitpunkt der Probenahme ebenso von Bedeutung.

Den Pflanzen als lebendiges System geben diese äußeren Einflüsse wiederum die Möglichkeit, in ihrer eigenen Art und Weise auf die jeweiligen veränderten Bedingungen zu reagieren. Die genannten Parameter hängen auf bisher nicht bekannte Art und Weise voneinander ab und können nur bedingt kontrolliert und eliminiert werden. Während sich die Anzuchtbedingungen weitestgehend standardisieren lassen, können die anderen Einflussfaktoren lediglich ihres Zustandes exakt beschrieben werden.

Die in der vorliegenden Arbeit angewendeten Methoden der Einzelzellbeprobung, aber auch das Herausstanzen von Blattstücken ist bedingt durch die Probenahme immer mit einer Verletzung der Pflanze verbunden. Bei der Einzelzellbeprobung kommt wegen der komplexen Probenahmetechnik noch ein relativ hoher Zeitaufwand hinzu, der so die Anzahl der Proben pro Tag beschränkt. Somit hat bereits die Verletzung während der Probenahme möglicherweise einen Einfluss auf die nachfolgenden Messwerte.

3.1 Untersuchung der Tabakalkaloide von *Nicotiana tabacum* mittels Einzelzellanalyse und Kapillarelektrophorese

Wie bereits in der Einleitung zu dieser Arbeit angedeutet wurde, erfordert eine detaillierte Beschreibung der Vorgänge innerhalb eines Gewebes die Bestimmung der lokalen Stoffverteilungen zwischen den verschiedenen Zellen und Zelltypen, da eine stoffliche Kompartimentierung nicht nur zwischen Vakuole und Cytoplasma [Wyn Jones et al, 1979; Leigh et al, 1986] sondern auch zwischen Zellen innerhalb desselben Gewebes besteht [Fricke et al, 1993; Fricke et al, 1995d].

Ziel dieser Arbeit war es, eine hochortsaufgelöste Bestimmung der Inhaltsstoffverteilung, insbesondere der Tabakalkaloide, in dem Pflanzengewebe von *Nicotiana tabacum* in Abhängigkeit von unterschiedlicher Stickstoffverfügbarkeit und Verwundung der Pflanze auf Einzelzellebene zu ermitteln.

In der vorliegenden Arbeit wurden so mit Hilfe der Einzelzellbeprobung Mikroproben aus den Zellen verschiedener Gewebearten von Tabakpflanzen der Art *Nicotiana tabacum* 'Samsun' entnommen und mittels der Kapillarelektrophorese auf deren Inhaltstoffe, insbesondere die Tabakalkaloide bzw. das Nicotin als Hauptalkaloid, untersucht.

Die nachfolgenden Ergebnisse, die mit der Einzelzellanalytik erhalten wurden, stellen einen Mittelwert für die jeweiligen Gehalte der Alkaloide in einer bestimmten Gewebeart dar. Die Zellen verschiedener Gewebearten haben in einer Pflanze verschiedene Funktionen zu erfüllen und unterscheiden sich daher auch in der Zusammensetzung ihrer Inhaltsstoffe [Dietz et al, 1992a; Dietz et al, 1992d; Leigh et al, 1993b]. Allerdings ist der Umkehrschluss, dass Zellen einer gleichen Gewebeart eine identische chemische Zusammensetzung aufweisen, nur bedingt richtig. Fricke et al. [Fricke et al, 1995c] untersuchten verschiedene Zellen der oberen Epidermis von Gerstenblättern auf deren Ionenkonzentrationen Ca^{2+} , K^+ , Cl^- , NO_3^- und Malat und zeigten, dass die Inhaltsstoffe von Zellen gleichen Typs in ihrer Zusammensetzung und Konzentration erheblich differieren können. Eine wesentliche Rolle spielen hierbei sowohl lokale als auch temporäre Einflüsse, sowie die Versorgung der gesamten Pflanze mit Nährstoffen und Licht.

Bei der Planung der Versuche wurden diese Ergebnisse insofern berücksichtigt, als dass eine genügend große Anzahl an Proben aus den verschiedenen Geweben und Blattregionen entnommen wurden. So wurde nach einer statistischen Auswertung ein tendenzieller Wert für

die Verteilung der Alkaloidkonzentrationen im Blatt erhalten. Dieser Wert darf auf keinesfalls als Absolutwert gesehen werden.

Kapillarelektrophorese

Die folgende Abbildung 27 zeigt ein für die Einzelzellmessungen typisches Elektropherogramm. Im Standard lagen die Tabakalkaloide in einer Konzentration von 100 μM vor. Die Probe wurde hydrostatisch (60 s, 5 cm) in die Trennkapillare injiziert. Die Konzentrationen für Nornicotin und Anabasin waren in dieser untersuchten Mikroprobe so gering, dass diese beiden Tabakalkaloide nicht nachgewiesen werden konnten. Für alle gemessenen Proben trat weder eine Überlagerung der Alkaloidsignale durch Matrixkomponenten, noch eine Beeinflussung der Leistungsparameter des Elektrolytsystems ein.

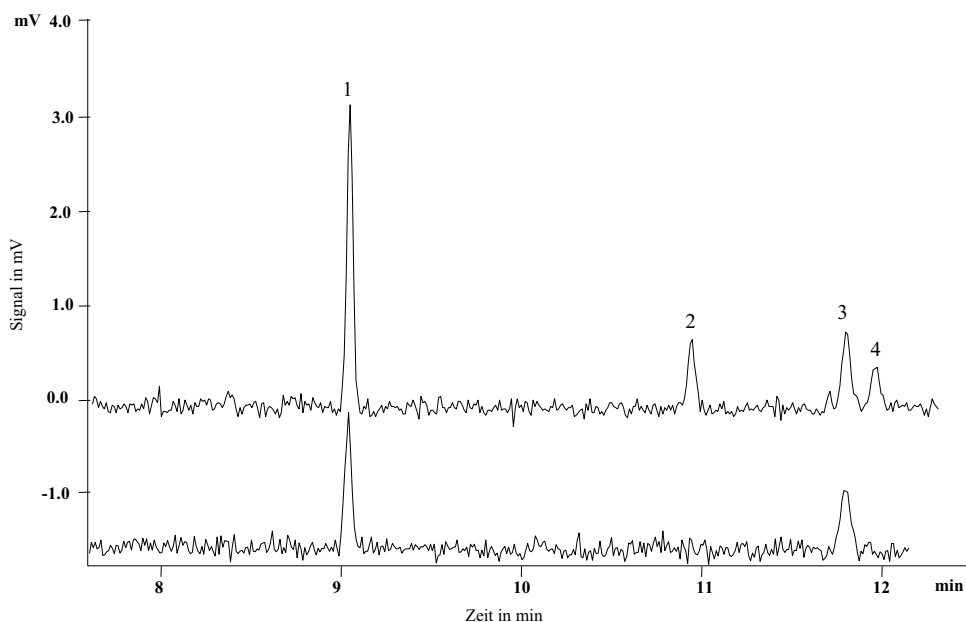


Abbildung 27: Bestimmung der Tabakalkaloide in einer Einzelzellprobe

Elektrolyt:	Citronensäure, 150 mM, pH-Wert 3,6
Kapillare:	Länge 80 cm, 59 cm bis zum Detektor, 50 μm I.D.
Bedingungen:	Spannung 23 kV, Strom 100 μA
Detektion:	direkte UV, 260 nm
Peaks:	1 4-Aminopyridin (interner Standard); 2 Nornicotin; 3 Nicotin; 4 Anabasin

Im Standard lagen die Tabakalkaloide in einer Konzentration von 100 μM vor. Die Probe wurde hydrostatisch (60 s, 5 cm) in die Trennkapillare injiziert.

Quantitative Auswertung

Die Auswertung der Proben erfolgte über den zu jeder Probe zugesetzten internen Standard 4-Aminopyridin. Die jeweilige Alkaloidkonzentration wurde anhand folgender Formeln berechnet:

$$\frac{c_{i,Std}}{A_{i,Std}} = b_{i,Std} \quad \text{Gleichung 18}$$

$c_{i,Std}$	Konzentration des Alkaloidstandards
$A_{i,Std}$	zeitkorrigierte Peakfläche der Komponente i im Alkaloidstandard
$b_{i,Std}$	Standardfaktor der Komponente i

$$\frac{c_{int.Std}}{(b_{int.Std} \cdot A_{int.Std})} = B_v \quad \text{Gleichung 19}$$

$c_{int.Std}$	Konzentration des internen Standards 4-Aminopyridin
$A_{int.Std}$	zeitkorrigierte Fläche des internen Standards 4-Aminopyridin in der Probe
B_v	Verdünnungsfaktor

$$b_{i,Probe} \cdot A_{i,Probe} \cdot B_v = c_{i,Probe} \quad \text{Gleichung 20}$$

$A_{i,Probe}$	zeitkorrigierte Fläche der Komponente i in der Probe
$c_{i,Probe}$	Konzentration der Komponente i in der Probe

Probleme und Schwierigkeiten bei der Quantifizierung

Die quantitative Bestimmung von Pflanzeninhaltsstoffen in einzelnen Zellen war zunächst mit einigen Schwierigkeiten verbunden. Zu Beginn der Einzelzellanalyse und zwar nach der Probennahme, zeigte sich, dass das Probenvolumen zur Quantifizierung der Substanzen bestimmt werden musste. Da das Probenvolumen aber im pL-Bereich lag, war es für eine direkte Volumenbestimmung viel zu gering. Um dennoch die Substanzen quantifizieren zu können, wurde der Schritt des Aliquotierens eingeführt, bei dem eine selbst hergestellte Konstriktionskapillare verwendet wurde, um eine indirekte Volumenbestimmung durchzuführen. Bei der indirekten Volumenbestimmung wurde mit derselben Konstriktionskapillare das Volumen der Probe als auch das Volumen eines definierten Standards abgemessen und diese in einem Wassertropfen vereint. Auf die Weise konnte über das Verhältnis der Peakflächen zueinander und der eines Standardgemisches die quantitative Bestimmung der Tabakalkaloide ermöglicht werden. Für die Analyse der vorbereiteten Probetropfen war ein Elektrolytssystem notwendig, dass eine empfindliche Bestimmung der Tabakalkaloide erreichte. Ausgehend von einem Phosphatelektrolyten wurde das System mit Citronensäure als Puffersubstanz optimiert [Lochmann et al, 2001]. Der Citronensäureelektrolyt zeigte im Vergleich zum Phosphatelektrolyten eine sehr viel höhere Auflösung und es wurden höhere Trennstufenzahlen erreicht. Außerdem lag bei dem Citronensäureelektrolyten eine geringere Analysezeit vor. Die Ionenstärke des Citronensäureelektrolyten musste mit 150 mM sehr hoch bleiben, da in matrixbehafteten pflanzlichen Proben auch hohe Ionenstärken vorliegen. Die Handhabung der Probenvorbereitung musste aus bereits erklärten Gründen ('Methode zur Probennahme und Handhabung von Proben aus Einzelzellen') die gesamte Zeit bis zur Analyse unter Paraffinöl geschehen. Des Weiteren mussten die aliquotierten Volumina der Probe und des Standards in einen angesäuerten Wassertropfen überführt werden, damit eine Extraktion des Nicotins in das schützende Paraffinöl verhindert wurde. Letztlich traten bei der Überführung der zu vermessenden Probetropfen in die Trennkapillare der Kapillarelektrophorese immer wieder elektrostatische Aufladungen auf. Im ungünstigsten Fall führte dies dazu, dass der Probetropfen dabei zerplatzte und nicht mehr zur Analyse gebracht werden konnte. Geringe Abhilfe brachte hierfür eine elektrostatische Unterlage unter dem Aufbau, mit welchem der Probetropfen in die Trennkapillare überführt werden sollte.

3.1.1 Bestimmung der Tabakalkaloide und deren Verteilung innerhalb einer Pflanze bei Ernährung unter normalen Bedingungen

Wie bereits im Kapitel ‘Synthese und Bedeutung von Alkaloiden’ dargestellt, ist die Synthese der Tabakalkaloide für die Pflanze sehr kostenaufwendig. Von der allgemeinen Strukturformel der Alkaloide ist ersichtlich, dass die Pflanze für die Synthese der Alkaloide unter anderem Stickstoff benötigt. Bei den nachfolgenden Ergebnissen handelt es sich um Messreihen, die mit Pflanzen durchgeführt wurden, die unter ausreichend optimalen Anzuchtbedingungen, d.h. unter genügender Stickstoffzufuhr, kultiviert wurden.

Bei den Versuchsreihen zur Untersuchung der oberen und unteren Epidermis sowie des Mesophylls sind lediglich Ergebnisse zur Verteilung der Nicotinkonzentration dargestellt. In diesen untersuchten Proben konnte nur die dargestellte Nicotinverteilung ermittelt werden, da die anderen Tabakalkaloide in den Mikroproben nicht nachgewiesen werden konnten. Hingegen konnten bei der Analyse der Mikroproben aus den Trichomen auch die beiden anderen Tabakalkaloide Nornicotin und Anabasin nachgewiesen und deren Verteilung ermittelt werden.

Obere und untere Epidermis

Die obere und untere Epidermis sind die im Blatt jeweils den beiden Außenseiten zugewandten Gewebeschichten (siehe Kapitel ‘Anatomie eines Blattes’).

Abbildung 28 stellt die Nicotinverteilung in der oberen und unteren Epidermis jeweils an der Blattspitze und am Blattgrund eines ausdifferenzierten Blattes einer Pflanze dar. Die Pflanze befand sich zu Beginn der Versuchsreihe in einem nicht verwundeten oder durch einen Infekt befallenen Zustand. Nach der Beprobung der entsprechenden Regionen wurde der Pflanze an dem bereits beprobten Blatt durch mechanische Einwirkung eine Verwundung zugeführt. 4 Tage nach der Verwundung fand die erneute Beprobung der bereits beprobten Blattregionen statt.

Es lässt sich beobachten, dass im unverwundeten Zustand die obere Epidermis in der Summe von Blattspitze und Blattgrund gesehen, weniger Nicotin enthält als die untere Epidermis. Im Vergleich zwischen Blattspitze und Blattgrund zeigt sich, dass die obere Epidermis der Blattspitze weniger Nicotin enthält als die des Blattgrunds. Bei der unteren Epidermis sieht der Vergleich zwischen Blattspitze und Blattgrund hingegen anders aus, denn hier weist die Blattspitze mehr Nicotin als der Blattgrund auf. Wird die Nicotinverteilung 4 Tage nach der

Verwundung des beprobten Blattes angeschaut, so lässt sich auf den ersten Blick feststellen, dass die Nicotinkonzentration an der Blattspitze sowohl in der oberen als auch in der unteren Epidermis erheblich angestiegen ist. Bei der oberen Epidermis ist ein Anstieg um ca. das 5-fache zur Ausgangskonzentration zu vernehmen, während es bei der unteren Epidermis ca. das 2,3-fache ist. Am Blattgrund ist zwar ein leichter Anstieg der Konzentration zu beobachten, jedoch ist dieser nicht so wesentlich wie in der Blattspitze. Auch nach der Verwundung bleibt das Bild erhalten, dass die untere Epidermis in der Summe mehr Nicotin enthält als die obere Epidermis. Allerdings zeigt sich nach der Verwundung, dass die Blattspitze signifikant mehr Nicotin enthält als der Blattgrund. Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die Verwundung einen Anstieg der Nicotinkonzentration zur Folge hatte.

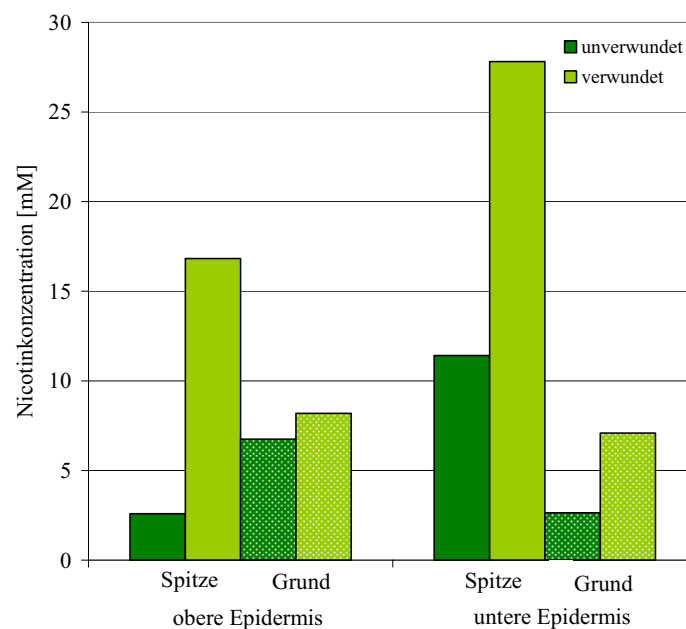


Abbildung 28: Vergleich der Nicotinverteilung in der oberen und unteren Epidermis von Blattspitze sowie Blattgrund eines ausdifferenzierten Blattes vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung des Blattes

Bei den in Abbildung 29 dargestellten Ergebnissen handelt es sich um eine Versuchsreihe, bei der die obere und untere Epidermis an der Blattspitze eines ausdifferenzierten Blattes beprobt wurde. Die Proben wurden am ersten Tag der Versuchsserie von der unverwundeten Pflanze genommen. Nach anschließender mechanischer Verwundung des beprobten Blattes wurden ca. 24 Stunden später erneut Proben von der bereits beprobten Blattregion entnommen. Die Probennahme wurde 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden nach der Verwundung zu den gleichen Bedingungen wiederholt. Es ist zu beobachten, dass über den ganzen Zeitraum der Probennahme von insgesamt 4 Tagen die obere Epidermis einen höheren Nicotiningehalt aufweist als die untere Epidermis. Auffallend ist, dass das Muster des Verlaufs der Nicotinkonzentration bei beiden Geweben identisch ist. So fällt die Konzentration am ersten Tag nach der Verwundung leicht ab und am zweiten Tag danach ist ein weiteres Sinken zu erkennen. Am dritten Tag ist die Nicotinkonzentration etwa wieder auf den Ausgangswert der unverwundeten Pflanze angestiegen und steigt am vierten Tag nach der Verwundung weiter an. So erreicht die Konzentration in der oberen Epidermis ungefähr das 1,5-fache von der Ausgangskonzentration während es bei der unteren Epidermis ca. das 3-fache vom Anfangswert ist.

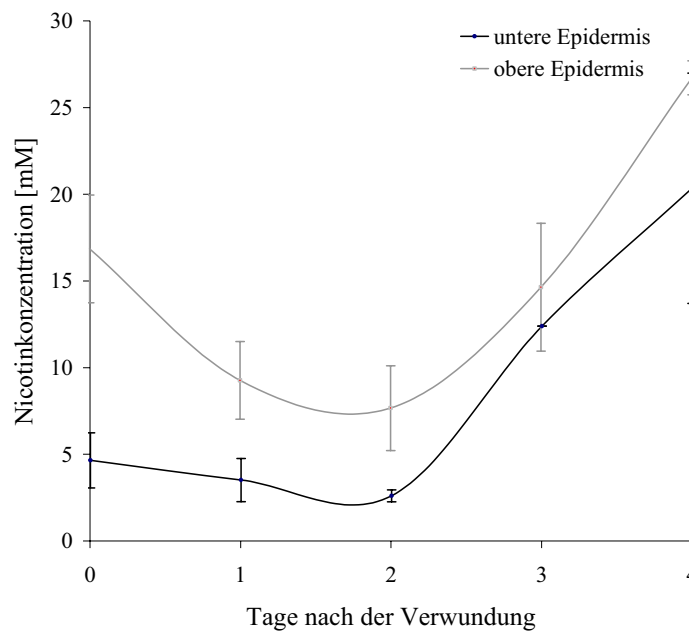


Abbildung 29: Vergleich der Nicotinverteilung in der oberen und unteren Epidermis an der Blattspitze eines ausdifferenzierten Blattes vor und bis zu 4 Tage nach der Verwundung des Blattes (Zahl der Wiederholungen n = 6-10)

Die Bestimmung der Tabakalkaloide in der oberen Epidermis an der Blattspitze zweier benachbarter Blätter zeigt die Abbildung 30. Hier wurde die Nicotinkonzentration vor und bis zu 7 Tage nach der Verwundung des älteren Blattes untersucht. Im unverwundeten Zustand der Pflanze weist das ältere, später zu verwundende Blatt, mit einer Konzentration von 32 mM Nicotin ca. den doppelten Nicotingehalt auf als das benachbarte, jüngere Blatt mit 15 mM Nicotin. Am ersten Tag nach der mechanischen Verwundung des älteren Blattes ist bei beiden Blättern ein Anstieg des Nicotingehalts zu erkennen, der bis zum zweiten Tag um das ca. 2,5-fache von der Ausgangskonzentration ansteigt. Während bis zum vierten Tag nach der Verwundung die Konzentration im verwundeten Blatt sinkt, erreicht sie im benachbarten Blatt nach einem kurzzeitigen Absinken am dritten Tag, am vierten Tag mit ca. 50 mM Nicotin ihren höchsten Gehalt, der bis zum siebten Tag stetig auf ca. 30 mM absinkt. Im verwundeten Blatt bleibt die Konzentration nach dem Absinken bis zum sechsten Tag konstant, bevor sie am siebten Tag noch mal leicht ansteigt, aber den Höchstwert vom zweiten Tag nach der Verwundung nicht mehr erreicht. Insgesamt betrachtet erreicht das ältere Blatt über die acht Tage einen höheren Nicotingehalt als das benachbarte jüngere Blatt. Beide Blätter haben gemeinsam, dass sie direkt nach der Verwundung einen Anstieg der Nicotinkonzentration zeigen. Am siebten Tag nach der Verwundung ist außerdem kein signifikanter Unterschied in der Nicotinkonzentration der beiden Blätter mehr vorhanden.

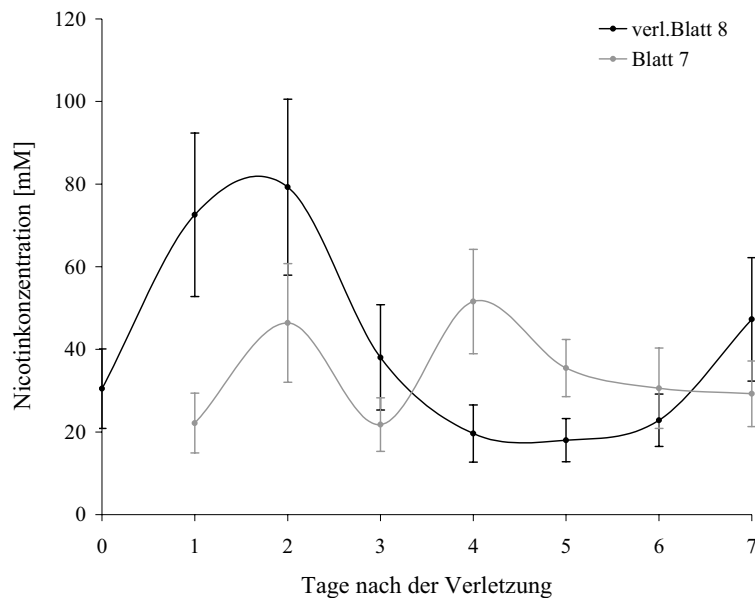


Abbildung 30: Vergleich der Nicotinverteilung in der oberen Epidermis jeweils an der Blattspitze zweier benachbarter Blätter vor und bis zu 7 Tage nach der Verwundung des älteren Blattes (Zahl der Wiederholungen n = 6-10)

Epidermis und Mesophyll

Die bisher dargestellten Ergebnisse bezogen sich auf die obere und untere Epidermis eines Blattes. Um jedoch die Konzentrationsverhältnisse im gesamten Gewebe bestimmen zu können, ist eine Untersuchung des Mesophylls, als ausführendes Organ der Photosynthese unerlässlich.

In der Versuchsserie wurden die obere und untere Epidermis sowie das Mesophyll an der Blattspitze eines ausgewachsenen Blattes untersucht. Das zu untersuchende Blatt wurde in einem unverletzten Zustand der Pflanze und 4 Tage nach einer mechanischen Verwundung des Versuchsblattes beprobt. In Abbildung 31 sind die gemessenen Konzentrationen von Nicotin in den Vakuolen der verschiedenen Gewebeschichten dargestellt. Es wird deutlich, dass das Mesophyll signifikant weniger Nicotin enthält als die obere und untere Epidermis. Die Verwundung der Pflanze zeigt einen leichten Rückgang des Nicotins im Mesophyll, wobei sowohl in der oberen als auch in der unteren Epidermis nahezu keine Veränderung der Nicotinkonzentration zu erkennen ist.

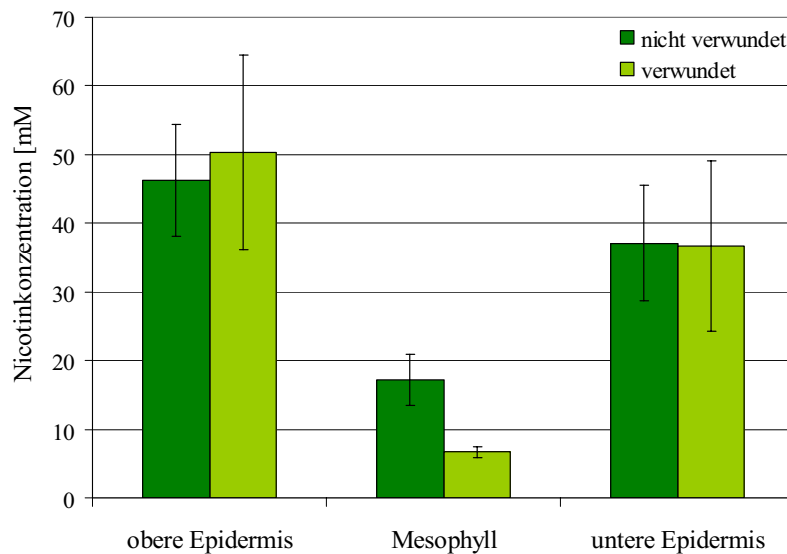


Abbildung 31: Vergleich der Nicotinverteilung [mM] in den verschiedenen Geweben an der Blattspitze eines ausdifferenzierten Blattes vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung des Blattes (Zahl der Wiederholungen n = 6-10)

Trichome

Trichome, als Blatthaare der Tabakpflanze, sind auf der Blattober- und Blattunterseite eines jeden Blattes zu finden. Es gibt verschiedenste Arten von Trichomen, von denen bei der Tabakpflanze drei Typen vertreten sind. Trichome spielen bei den Pflanze-Insekten Interaktionen eine wichtige Rolle, da sie in der Regel den ersten Kontakt mit dem Pflanzenschädling haben (siehe 'Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Nicotiana tabacum* 'Samsun''). Aufgrund dessen wurden verschiedene Versuchsreihen zur Untersuchung der Konzentrationsverhältnisse und der Verteilung der Tabakalkaloide in Trichomen durchgeführt.

In diesem Rahmen fanden folgende Untersuchungen der Alkaloidkonzentration in Einzelzellen von Trichomen statt:

- a) Blattspitze, Ober- und Unterseite des Blattes
- b) entlang der Blattader von der Blattspitze bis zum Blattgrund
- c) Blattspitze, über 4 verschiedene Blattetagen von einem ausdifferenzierten Blatt bis hin zu einem jungen Blatt
- d) Verteilung über das ganze Blatt bei einem ausdifferenzierten und einem jungen Blatt
- e) durch Extraktion ganzer Trichome

Bei der Beprobung der Trichome wurden nur drüsenhaltige lange Trichome beprobt, da diese mit der Mikrokapillare am besten und gezielt angestochen werden konnten.

a) Blattspitze, Ober- und Unterseite des Blattes:

In Abbildung 32 ist die Alkaloidverteilung in Trichomen der Blattober- und Unterseite an der Blattspitze eines ausdifferenzierten Blattes dargestellt. Sowohl die Blattoberseite als auch die Blattunterseite weisen eine Nicotinkonzentration von ca. 280 mM auf, womit zwischen der Blattober- und Unterseite kein Unterschied festzustellen war. Neben dem Hauptalkaloid Nicotin konnten die beiden Nebenalkaloide Nornicotin und Anabasin bestimmt werden. Die Nornicotinkonzentration wurde zu ca. 17 mM und die Anabasinkonzentration zu ca. 11 mM bestimmt. Auch für die beiden Nebenalkaloide ist kein Unterschied zwischen der Konzentration der Blattober- und Unterseite zu erkennen.

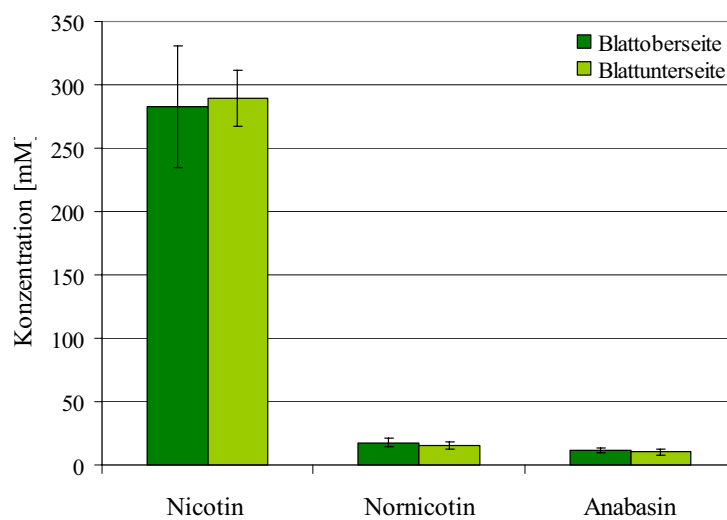


Abbildung 32: Verteilung der Tabakalkaloide in Trichomen der Blattspitze eines ausdifferenzierten Blattes (Zahl der Wiederholungen n = 5-10)

b) entlang der Blattader von der Blattspitze bis zum Blattgrund:

Die Abbildung 33 zeigt den Nicotinverlauf in Trichomen auf der Blattader von der Blattspitze bis hin zum Blattgrund. Es wurden zum einen die Trichome auf der Blattoberseite und zum anderen die der Blattunterseite beprobt. In der Darstellung ist ein deutlicher Gradient von ca. 50 % der Nicotinkonzentration von der Blattspitze bis hin zum Blattgrund erkennbar. Zwischen den Konzentrationen der Blattober- und Unterseite ist kein signifikanter Unterschied ersichtlich.

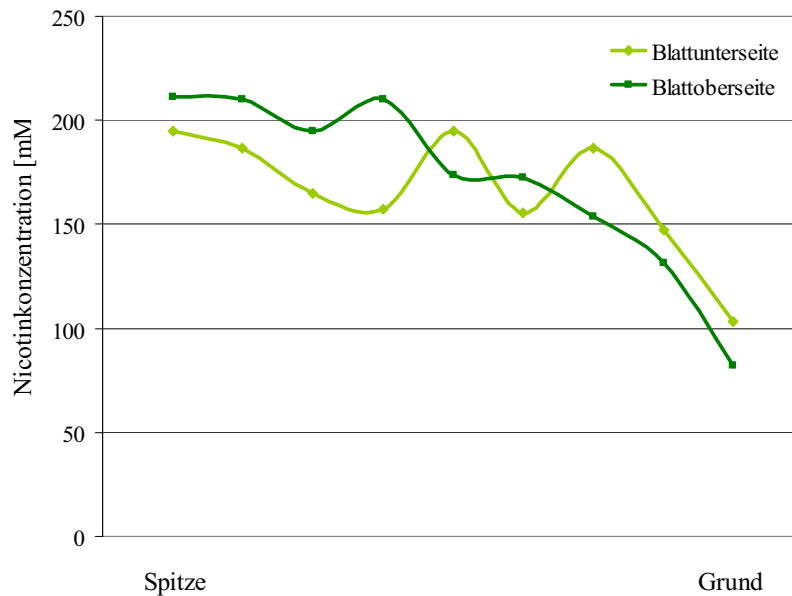


Abbildung 33: Verlauf der Nicotinkonzentration [mM] in Trichomen auf der Blattader der Blattoberseite eines ausdifferenzierten Blattes

Die Nornicotinkonzentration in den Trichomen über den Verlauf der Blattader auf der Blattober- und Unterseite ist in Abbildung 34 dargestellt. Hier ist ebenfalls wie beim Nicotin ein Konzentrationsgradient von der Blattspitze bis hin zum Blattgrund erkennbar. Zwischen den Trichomen der Blattober- und Unterseite ist auch hier kein signifikanter Unterschied vorhanden.

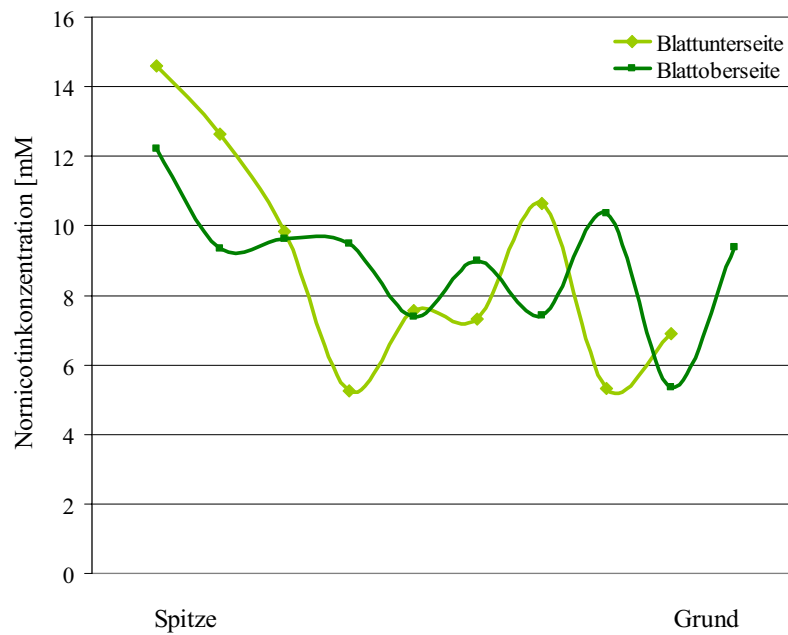


Abbildung 34: Verlauf der Nornicotinkonzentration [mM] in Trichomen auf der Blattader der Blattoberseite eines ausdifferenzierten Blattes

Abbildung 35 zeigt die Konzentration von Anabasin über den Verlauf der Blattader von der Blattspitze bis hin zum Blattgrund. Bei diesem Alkaloid ist genau wie bei den anderen beiden dargestellten Alkaloiden ein Konzentrationsgradient von der Blattspitze bis hin zum Blattgrund erkennbar. Für Anabasin ist ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen der Blattober- und Unterseite vorhanden.

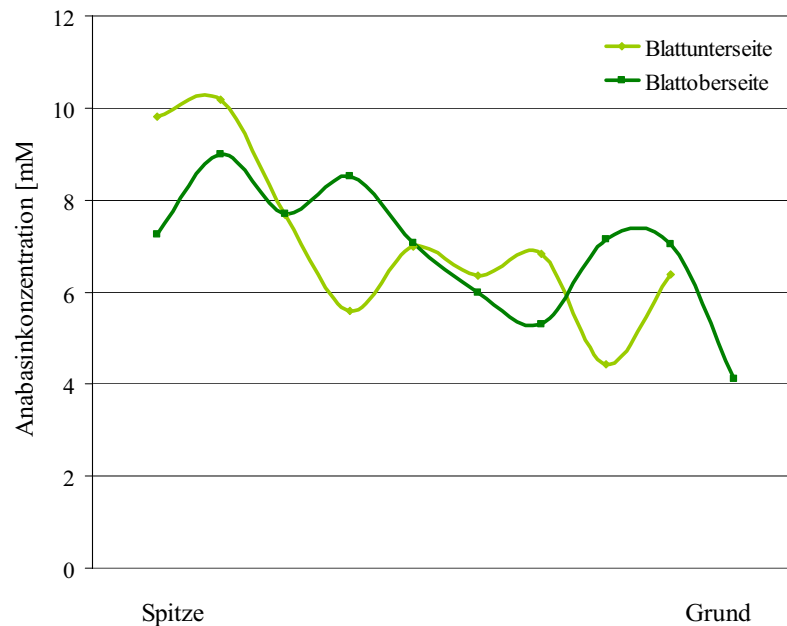


Abbildung 35: Verlauf der Anabasinkonzentration [mM] in Trichomen auf der Blattader der Blattoberseite eines ausdifferenzierten Blattes

Insgesamt ist bei allen drei Alkaloiden Nicotin, Nornicotin und Anabasin zu beobachten, dass ein Konzentrationsgradient von der Blattspitze bis zum Blattgrund vorhanden ist. Zwischen den Konzentrationen in den Trichomen auf der Blattober- und Unterseite besteht kein signifikanter Unterschied. Aufgrund dessen wurde bei den weiteren Versuchsserien die Beprobung nur auf Einzelzellen von Trichomen auf der Blattoberseite beschränkt.

- c) Blattspitze, über 4 verschiedene Blattetagen von einem ausdifferenzierten Blatt bis hin zu einem jungen Blatt :

In Abbildung 36 ist die Nicotinverteilung in Trichomen an der Blattspitze über vier verschiedene Blattetagen dargestellt. Hierbei ist jeweils ein Anstieg der Nicotinkonzentration vom ausdifferenzierten Blatt bis hin zum drittjüngsten beprobten Blatt zu beobachten. Das jüngste beprobte Blatt wiederum zeigt eine deutlich geringere Nicotinkonzentration als die beiden älteren Blätter, aber es ist noch mehr Nicotin vorhanden als im ältesten Blatt. 4 Tage nach der Verwundung des ausdifferenzierten Blattes lässt im jüngsten Blatt ein signifikanter Anstieg der Nicotinkonzentration um fast das doppelte vom unverwundeten Zustand beobachten. Hingegen ist in den beiden ältesten Blättern nur ein leichter Anstieg der Nicotinkonzentration feststellen, während Blatt 3 einen leichten Rückgang zeigt.

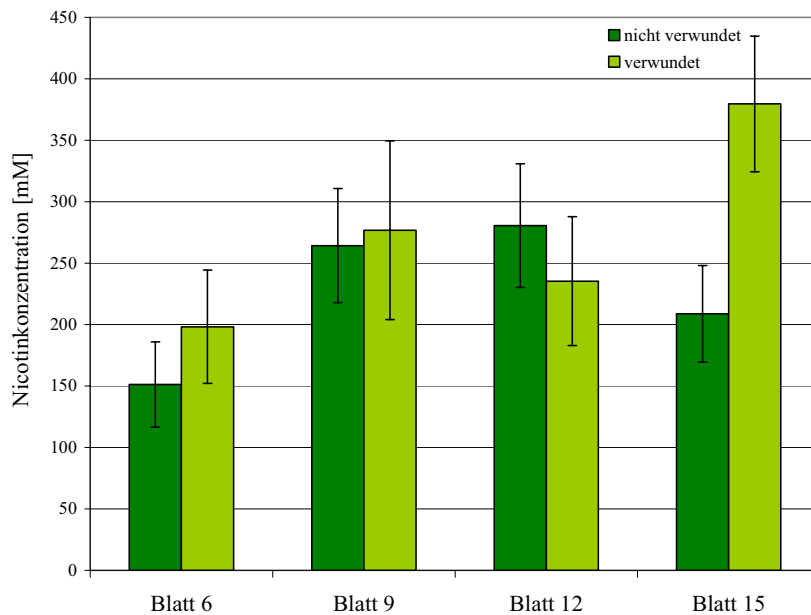


Abbildung 36: Vergleich der Verteilung von Nicotin in Trichomen der Blattoberseite über mehrere Blattetagen, jeweils an der Blattspitze, vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung von Blatt 6; Blatt 6 stellt ein voll ausdifferenziertes Blatt dar, Blatt 15 das jüngste aus der Knospe herausgetretene Blatt (Zahl der Wiederholungen n = 6-10)

Neben dem Hauptalkaloid Nicotin konnten auch die beiden Nebenalkaloide Nornicotin und Anabasin in den Trichomen bestimmt werden. Die Verteilung von Nornicotin zeigt Abbildung 37. Die Konzentrationsverhältnisse hier sind vergleichbar mit denen des Nicotins, d.h. es ist ein Anstieg des Nornicotins bis zum drittjüngsten Blatt zu beobachten. Das jüngste Blatt hingegen zeigt eine deutlich geringere Nornicotinkonzentration als die beiden älteren Blätter. 4 Tage nach der Verwundung des ausdifferenzierten Blattes lässt sich hier im jüngsten Blatt ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Nornicotinkonzentration um fast das Doppelte vom unverwundeten Zustand beobachten. Hingegen ist in den beiden ältesten Blättern nur ein leichter Anstieg der Nornicotinkonzentration feststellen, während Blatt 3 einen leichten Rückgang zeigt.

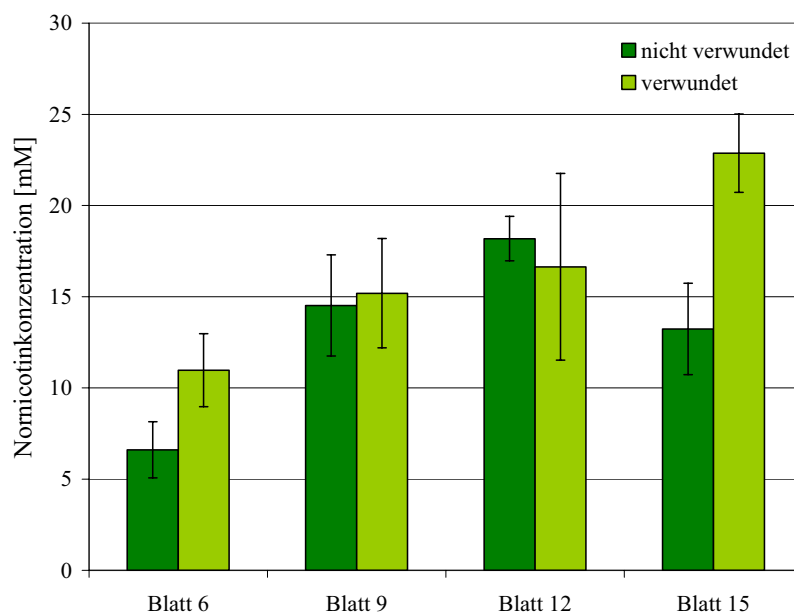


Abbildung 37: Vergleich der Verteilung von Nornicotin in Trichomen der Blattoberseite über mehrere Blättertagen, jeweils an der Blattspitze, vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung von Blatt 6; Blatt 6 stellt ein voll ausdifferenziertes Blatt dar, Blatt 15 das jüngste aus der Knospe herausgetretene Blatt (Zahl der Wiederholungen n = 6-10)

Für das dritte Alkaloid Anabasin zeigt sich in Abbildung 38 im unverwundeten Zustand der Pflanze das gleiche Bild wie es für Nicotin und Nornicotin der Fall ist. Allerdings ist hier vier Tage nach der Verwundung in allen Blättern ein deutlicher Anstieg der Anbasinkonzentration vorhanden. Genauso wie bei den beiden Alkaloiden Nicotin und Nornicotin ist im jüngsten Blatt der Anstieg des Alkaloids signifikant.

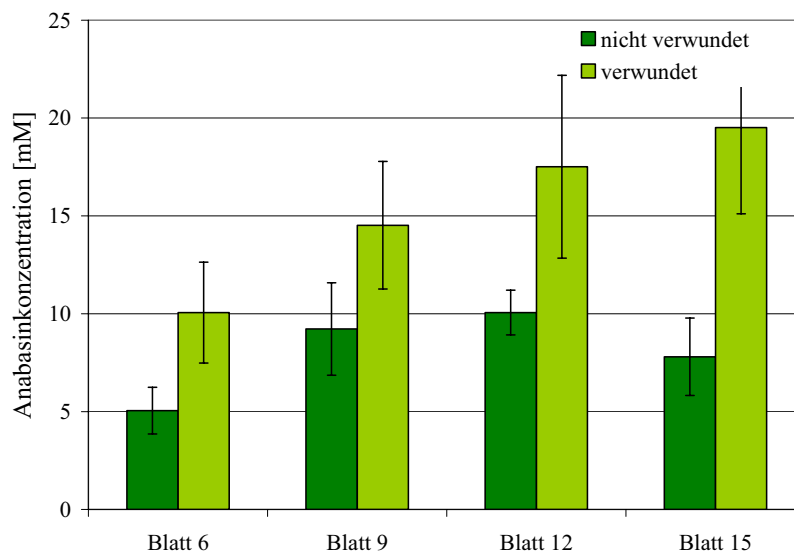


Abbildung 38: Verteilung von Anabasin in Trichomen der Blattoberseite über mehrere Blättetagen, jeweils an der Blattspitze, vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung von Blatt 6; Blatt 6 stellt ein voll ausdifferenziertes Blatt dar, Blatt 15 das jüngste aus der Knospe herausgetretene Blatt (Zahl der Wiederholungen n = 6-10)

d) Verteilung über das ganze Blatt bei einem ausdifferenzierten und einem jungen Blatt: In Abbildung 39 ist die Nicotinverteilung in Trichomen in einem ausdifferenzierten und einem jungen Blatt vor und vier Tage nach Verwundung des ausdifferenzierten Blattes dargestellt. Es ist zu erkennen, dass im ausdifferenzierten Blatt die Blattspitze vor dem Blattinneren, der Blattmitte und dem Blattgrund die höchste Nicotinkonzentration zeigt. Die Außenränder der Blattmitte haben die niedrigste Konzentration. Im Vergleich dazu, liegt im jungen Blatt die höchste Nicotinkonzentration in der Blattmitte vor. Hier konnte aufgrund der kleinen Größe des Blattes nicht mehr zwischen Blattrand und Blattinneres unterschieden werden. Im Blattgrund des jungen Blattes ist die geringste Nicotinkonzentration aller beprobten Blattregionen des ausdifferenzierten und jungen Blattes vorhanden. Vier Tage nach der Verwundung des ausdifferenzierten Blattes zeigt sich eine andere Nicotinverteilung sowohl im ausdifferenzierten als auch im jungen Blatt. Im ausdifferenzierten Blatt ist ein signifikanter Rückgang des Nicotins in der Blattspitze zu beobachten. Während im Blattgrund und im Blattinneren der Blattmitte die Nicotinkonzentration gleich bleibt, zeigt der Blattrand ebenso eine deutliche Abnahme. Hingegen ist im jungen Blatt durchweg eine Zunahme der Nicotinkonzentration zu erkennen. Hier zeigt die Blattspitze vor der Blattmitte und dem Blattgrund mit einer 2,5-fachen Zunahme und 240 mM die höchste Nicotinkonzentration. Insgesamt ist festzustellen, dass nach der Verwundung eine Zunahme der Nicotinkonzentration im jungen Blatt und eine Abnahme im verwundeten, ausdifferenzierten Blatt vorhanden sind. Hier liegt die Vermutung nahe, dass Nicotin durch einen aktiven Transport aus der Vakuole heraus umverteilt wurde. Dieses könnte über einen Nicotin Transporter geschehen, doch ein solcher Transporter ist bislang nicht bekannt.

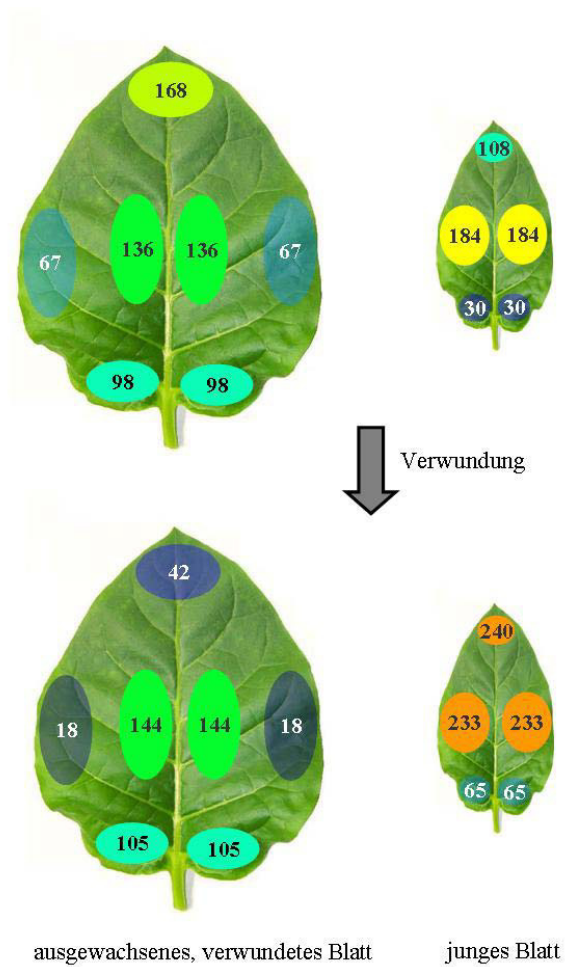


Abbildung 39: Vergleich der Nicotinverteilung über das ganze Blatt in Trichomen auf der Blattoberseite, jeweils in einem ausdifferenzierten Blatt und einem jungen Blatt vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung von dem ausdifferenzierten Blatt (Zahl der Wiederholungen n = 5-8)

Die Verteilung des Tabakalkaloids Nornicotin ist in Abbildung 40 dargestellt. Hier konnte nicht für alle beprobten Blattregionen die Nornicotinkonzentration ermittelt werden, da sie teilweise unter der Nachweisgrenze lag (keine farbigen Konzentrationsfelder auf dem Blatt). So zeigt sich hier insgesamt eine sehr viel niedrigere Konzentration an Nornicotin in den Trichomen als es für Nicotin der Fall ist. Für den unverwundeten Zustand ist zu erkennen, dass das jüngere Blatt die höheren Nornicotinkonzentrationen aufweist als das ausdifferenzierte Blatt. Die Blattspitze hat mit 10 mM die höchste Nornicotinkonzentration und liegt damit doppelt so hoch wie die Blattspitze des ausdifferenzierten Blattes. Die Blattmitte und der Blattgrund liegen mit jeweils 8 mM ein wenig darunter. Im ausdifferenzierten Blatt ist kein Konzentrationsgradient über das Blatt verteilt erkennbar. Vier Tage nach der Verwundung konnte nur noch jeweils an der Blattspitze der Blätter die Nornicotinkonzentration bestimmt werden und während sich im ausdifferenzierten Blatt ein leichter Rückgang zeigt, ist im jungen Blatt eine signifikante Zunahme der Nornicotinkonzentration zu verzeichnen.

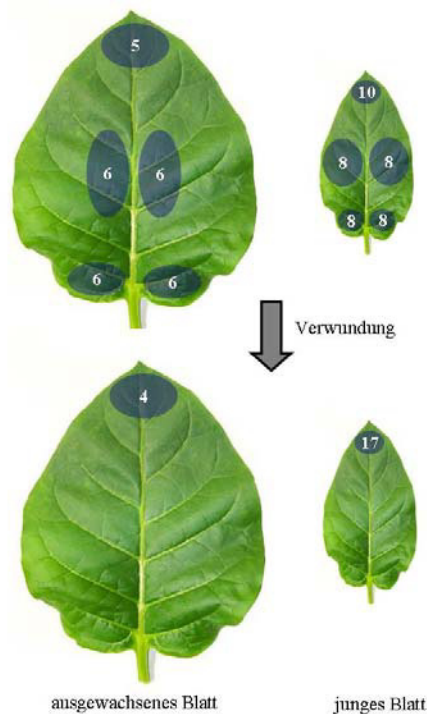


Abbildung 40: Vergleich der Nornicotinverteilung über das ganze Blatt in Trichomen auf der Blattoberseite, jeweils in einem ausdifferenzierten Blatt und einem jungen Blatt vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung von dem ausdifferenzierten Blatt (Zahl der Wiederholungen $n = 5-8$)

Die Verteilung des dritten Tabakalkaloids Anabasin zeigt Abbildung 41. Wie bereits für das Alkaloid Nornicotin erwähnt, konnte auch die Anabasinkonzentration nicht für alle beprobten Blattregionen ermittelt werden, da sie unterhalb der Nachweisgrenze lag. So ist zu beobachten, dass im unverwundeten Zustand das ausdifferenzierte Blatt mehr Anabasin beinhaltet als das junge Blatt. Außerdem zeigt sich anders als für Nornicotin im ausdifferenzierten Blatt ein Konzentrationsgradient von der Blattspitze zum Blattgrund. Als Folge der Verwundung ist vier Tage danach zu beobachten, dass die Anabasinkonzentration in der Blattspitze des ausdifferenzierten Blattes abgenommen hat, während sie in der Blattspitze des jungen Blattes um das dreifache angestiegen ist.

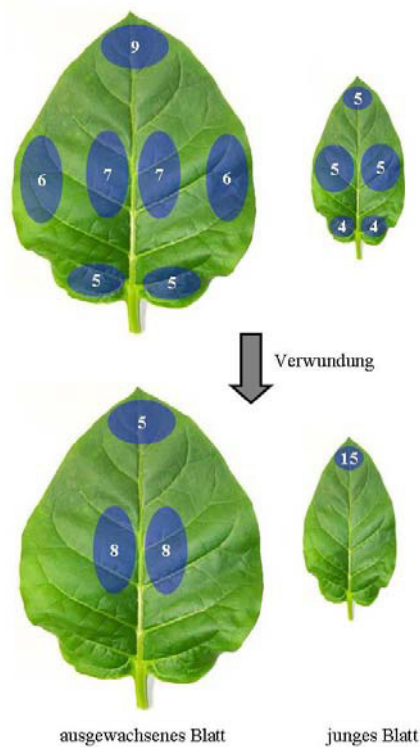


Abbildung 41: Vergleich der Anabasinverteilung über das ganze Blatt in Trichomen auf der Blattoberseite, jeweils in einem ausdifferenzierten Blatt und einem jungen Blatt vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung von dem ausdifferenzierten Blatt (Zahl der Wiederholungen n = 5-8)

e) durch Extraktion ganzer Trichome

Bei der Extraktion von Trichomen wurden 50 Trichome unter einem Mikroskop mit Hilfe einer Pinzette abpräpariert, ausgewogen und nach anschließender Extraktion (siehe Kapitel ‘Pflanzliche Extrakte’) analysiert. Die Trichome wurden jeweils an der Blattspitze eines ausdifferenzierten und eines jungen Blattes entnommen. In Abbildung 42 ist die Extraktion von Trichomen von drei verschiedenen Pflanzen an jeweils einem ausdifferenzierten und einem jungen Blatt dargestellt. Hierbei zeigen die ausdifferenzierten Blätter eine signifikant höhere Nicotinkonzentration als die jungen Blätter. Zwischen den verschiedenen Pflanzen besteht nahezu kein Unterschied in den Nicotinkonzentrationen der ausdifferenzierten bzw. jungen Blätter.

In Abbildung 43 ist die Nicotinverteilung vor und 4 Tage nach Verwundung des ausdifferenzierten Blattes dargestellt. Wie zu erkennen ist, hat sich die Nicotinverteilung umgekehrt, d.h. nach der Verwundung zeigt das jüngere Blatt eine deutlich höhere Nicotinkonzentration als das verwundete, ausdifferenzierte Blatt. Insgesamt betrachtet ist die Summe der Nicotinkonzentration aus ausdifferenziertem und jungem Blatt allerdings gleich geblieben.

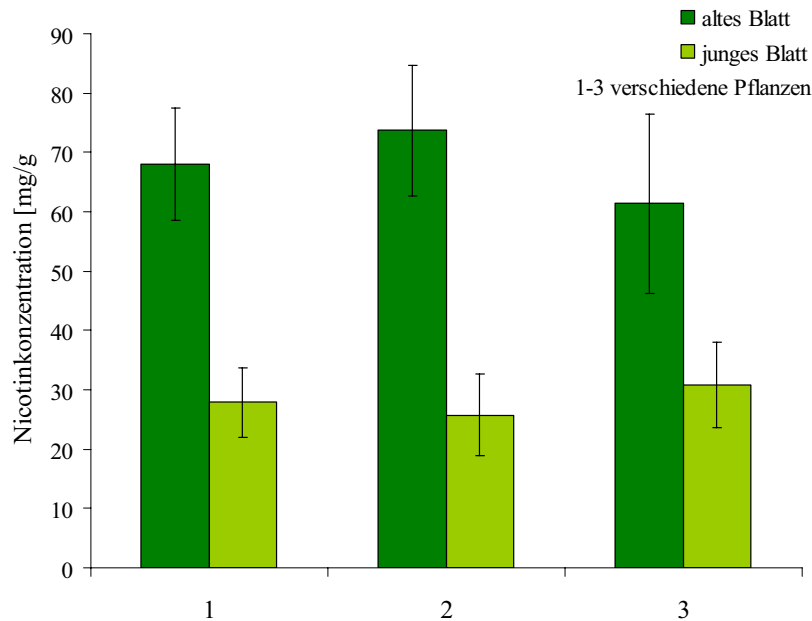


Abbildung 42: Vergleich der Nicotinkonzentration in Trichomen von jeweils einem ausdifferenzierten Blatt und einem jungen Blatt von drei verschiedenen Pflanzen (Zahl der Wiederholungen n = 6-10)

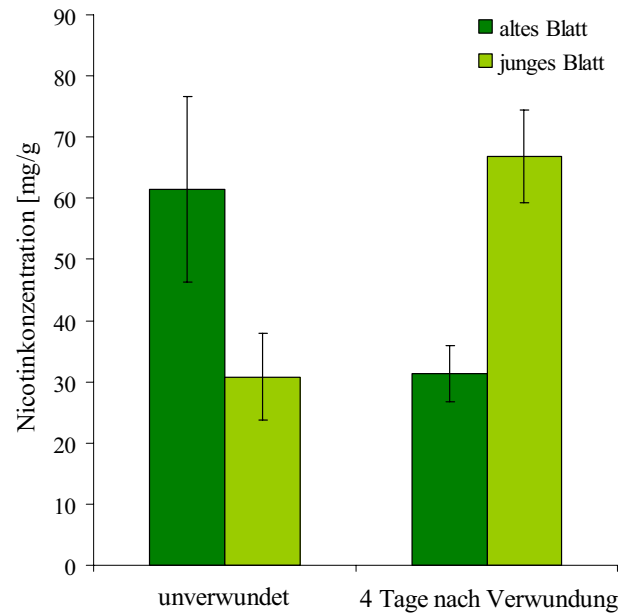


Abbildung 43: Vergleich der Nicotinkonzentration in Trichomen von einem ausdifferenzierten Blatt und einem jungen Blatt vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung (Zahl der Wiederholungen n = 6-10)

3.1.2 Bestimmung der Tabakalkaloide und deren Verteilung innerhalb einer Pflanze bei Ernährung unter Stickstoffmangel

Wie bereits im Kapitel ‘Synthese und Bedeutung von Alkaloiden’ dargestellt, ist die Synthese der Tabakalkaloide für die Pflanze sehr kostenaufwendig. Von der allgemeinen Strukturformel der Alkaloide ist ersichtlich, dass die Pflanze für Synthese der Alkaloide unter anderem Stickstoff benötigt. Bei den nachfolgenden Ergebnissen handelt es sich um Messreihen, die mit Pflanzen durchgeführt wurden, die nicht für die in ihrer Versorgung ausreichende Menge an Stickstoff erhalten haben.

Obere und untere Epidermis

In Abbildung 44 ist die Verteilung von Nicotin in der oberen und unteren Epidermis jeweils an der Blattspitze und am Blattgrund eines ausdifferenzierten Blattes vor und vier Tage nach Verwundung des Blattes dargestellt. Es ist zu erkennen, dass im unverwundeten Zustand an der Spitze sowohl in der oberen als auch in der unteren Epidermis die Nicotinkonzentration höher ist als am Blattgrund. Nach der Verwundung ist ein geringfügiger Anstieg in der oberen Epidermis am Blattgrund und in der unteren Epidermis am Blattgrund und auch an der Blattspitze erkennbar. Insgesamt ist die Nicotinkonzentration in der oberen Epidermis um das vierfache höher als in der unteren Epidermis. Die Ausnahme bildet die Blattspitze nach der Verwundung. Hier beträgt der Unterschied zwischen der oberen und unteren Epidermis das Doppelte.

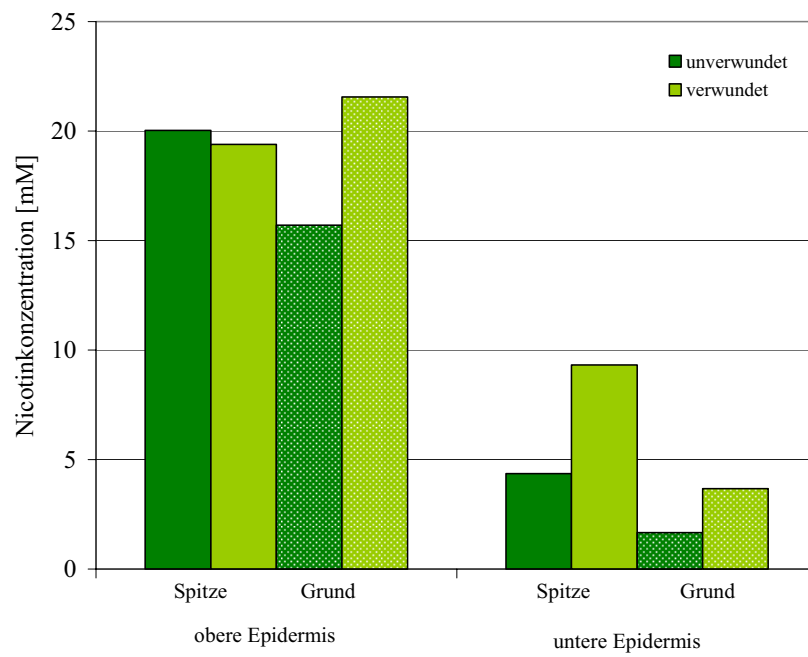


Abbildung 44: Vergleich der Nicotinverteilung in der oberen und unteren Epidermis von Blattspitze sowie Blattgrund eines ausdifferenzierten Blattes vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung des Blattes

Die Verteilung von Nicotin in der oberen und unteren Epidermis einer Pflanze im unverwundeten und verwundeten Zustand ist in Abbildung 45 dargestellt. Nach der Probennahme an der unverletzten Pflanze wurde diese am Probennahmeblatt mechanisch verwundet und die Probennahme 24, 48, 72 und 96 Stunden nach der Verwundung wiederholt. Es ist zu beobachten, dass die obere Epidermis zu jedem Zeitpunkt der Probennahme signifikant mehr Nicotin enthält als die untere Epidermis. Sowohl in der oberen als auch in der unteren Epidermis sinkt die Nicotinkonzentration am ersten Tag nach der Verwundung leicht ab, bevor sie bis zum dritten Tag ansteigt. Die obere Epidermis steigt auch noch am vierten Tag an, während die Konzentration in der unteren Epidermis wieder leicht abfällt. Insgesamt ist jedoch keine Steigerung der Nicotinkonzentration vier Tage nach der Verwundung zu beobachten, denn sowohl in der oberen als auch in der unteren Epidermis erreicht die Nicotinkonzentration in etwa den Wert der Konzentration vor Verwundung der Pflanze.

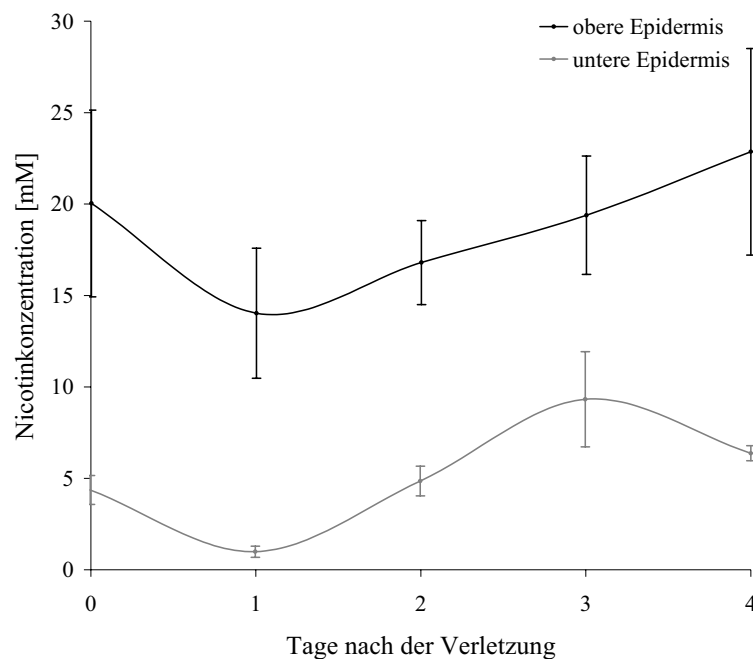


Abbildung 45: Vergleich der Nicotinverteilung in der oberen und unteren Epidermis an der Blattspitze eines ausdifferenzierten Blattes vor und bis zu 4 Tage nach der Verwundung des Blattes (Zahl der Wiederholungen n = 6-10)

Bei den in Abbildung 46 dargestellten Ergebnissen handelt es sich um eine Versuchsserie, bei der zwei benachbarte Blätter vor und bis zu sieben Tage nach der Verwundung des älteren Blattes beprobt wurden. Es ist zu erkennen, dass vor und bis zum sechsten Tag nach der Verwundung kein signifikanter Unterschied in der Nicotinkonzentration der beiden Blätter vorhanden ist. Während beide Blätter am fünften Tag nach der Verwundung einen Anstieg der Nicotinkonzentration auf ca. 70 mM zeigen, gefolgt von einem Rückgang der Nicotinkonzentration am darauf folgenden Tag um mehr als die Hälfte, steigt die Konzentration im älteren, verletzten Blatt am siebten Tag um das vierfache bis auf 120 mM und im benachbarten, jüngeren Blatt um das doppelte auf eine Konzentration von 60 mM. Die höchste Nicotinkonzentration wird somit in beiden Blättern am siebten Tag nach der Verwundung erreicht.

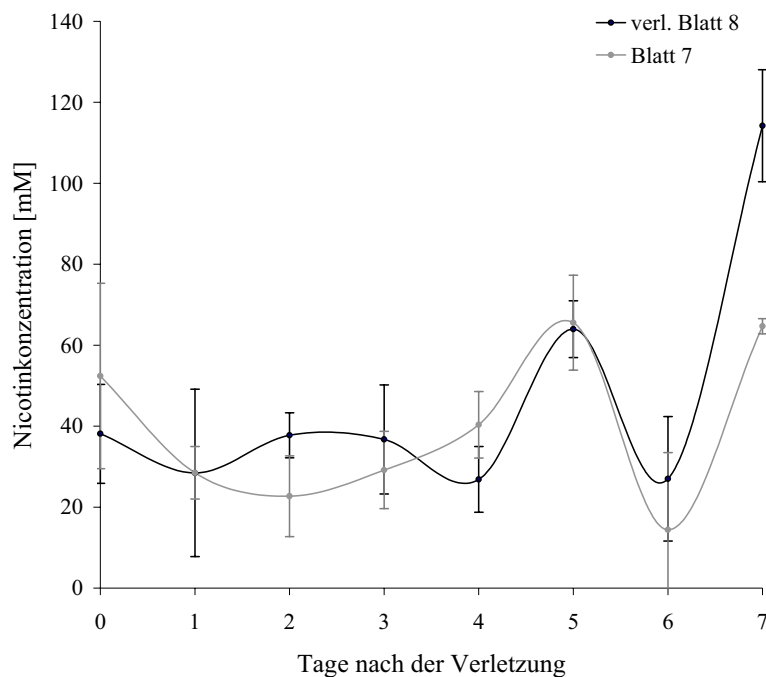


Abbildung 46: Vergleich der Nicotinverteilung in der oberen Epidermis jeweils an der Blattspitze zweier benachbarter Blätter vor und bis zu 7 Tage nach der Verwundung des älteren Blattes (Zahl der Wiederholungen n = 6-10)

Epidermis und Mesophyll

Wie bereits unter 'Bestimmung der Tabakalkaloide und deren Verteilung innerhalb einer Pflanze bei Ernährung unter normalen Bedingungen' beschrieben, wurden bei den in Abbildung 47 dargestellten Ergebnissen neben der oberen und unteren Epidermis auch das Mesophyll in der erläuterten Art und Weise beprobt. Es ist zu erkennen, dass die obere und untere Epidermis sowohl vor als auch nach Verwundung der Pflanze eine höhere Nicotinkonzentration aufweist als das Mesophyll. Vier Tage nach der Verwundung der Pflanze zeigt die obere Epidermis eine signifikant höhere Nicotinkonzentration als die untere Epidermis und das Mesophyll, bei denen nach der Verwundung nahezu keine Änderung zu beobachten ist.

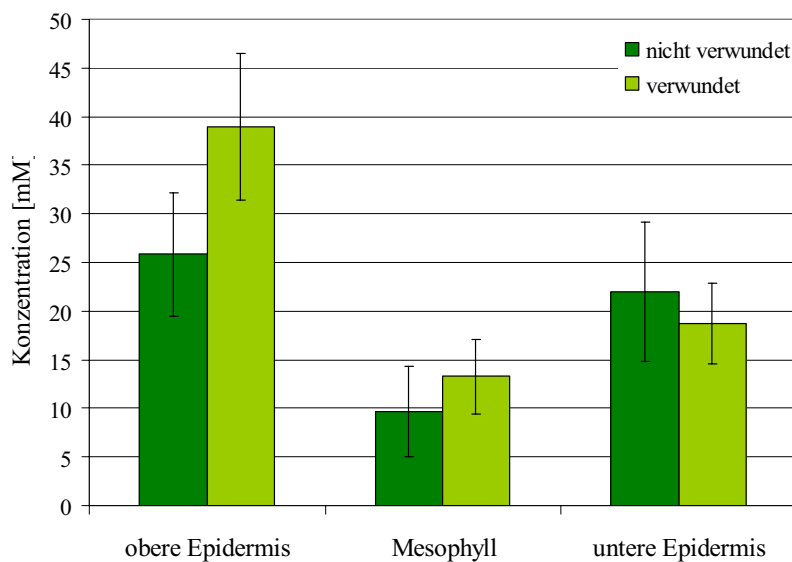


Abbildung 47: Vergleich der Nicotinverteilung [mM] in den verschiedenen Geweben an der Blattspitze eines ausdifferenzierten Blattes vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung des Blattes (Zahl der Wiederholungen n = 6-10)

Trichome

Untersuchungen der Alkaloidkonzentration von Trichomen:

- Blattspitze, über 4 verschiedene Blattetagen von einem ausdifferenzierten Blatt bis hin zu einem jungen Blatt
- Verteilung über das ganze Blatt bei einem ausdifferenziertem und einem jungen Blatt
- Blattspitze, über 4 verschiedene Blattetagen von einem ausdifferenzierten Blatt bis hin zu einem jungen Blatt:

Die in Abbildung 48 dargestellte Nicotinverteilung über vier Blattetagen zeigt, dass je jünger das Blatt, desto höher ist die Nicotinkonzentration. Eine Ausnahme bildet das jüngste beprobte Blatt, dass nahezu die gleiche Konzentration wie das vorherige Blatt zeigt. Vier Tage nach der Verwundung ist ein Rückgang der Nicotinkonzentration im ältesten, verwundeten Blatt zu erkennen, in den beiden nächst jüngeren Blättern ist ein marginaler Anstieg vorhanden, während das jüngste Blatt den höchsten Anstieg zeigt. Insgesamt ist zu beobachten, dass nach der Verwundung das jüngste Blatt mit 250 mM die höchste Nicotinkonzentration aufweist, und damit sechsfach so hoch liegt wie die Konzentration im ältesten, verwundeten Blatt mit 40 mM.

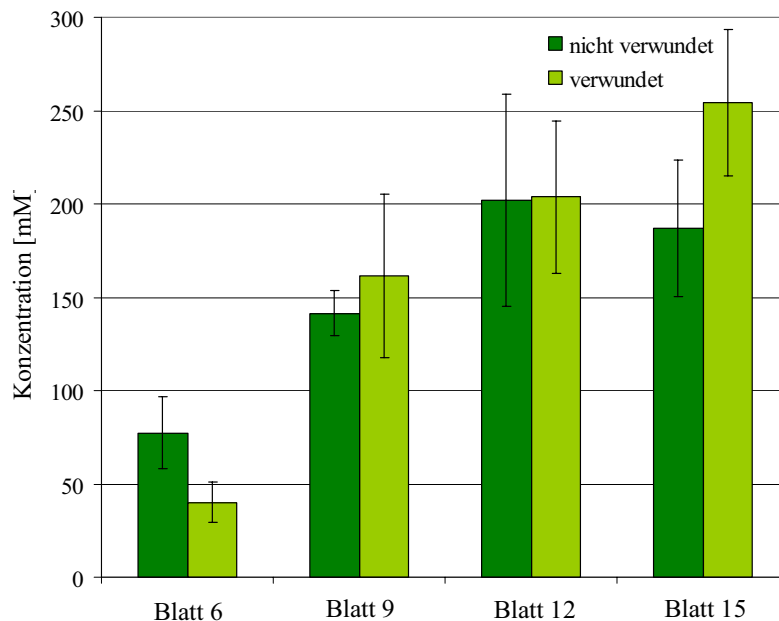


Abbildung 48: Vergleich der Verteilung von Nicotin in Trichomen der Blattoberseite über mehrere Blattetagen, jeweils auf der Blattspitze, vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung von Blatt 6; Blatt 6 stellt ein voll ausdifferenziertes Blatt dar, Blatt 15 das jüngste aus der Knospe herausgetretene Blatt (Zahl der Wiederholungen n = 6-10)

Die in Abbildung 49 dargestellte Nornicotinverteilung über vier Blattetagen einer Tabakpflanze zeigt ein vergleichbares Verhältnis in der Verteilung des Alkaloids wie es für Nicotin der Fall ist. So ist auch hier ein Gradient in der Alkaloidkonzentration vom ausdifferenzierten zum jüngsten Blatt vorhanden. Vier Tage nach der Verwundung ist in den beiden jüngsten Blättern ein Anstieg der Konzentration zu erkennen. Im ausdifferenzierten Blatt zeigt sich ein leichter Rückgang der Nornicotinkonzentration, während sich im zweiten beprobten Blatt keine Änderung sichtbar ist. Wie auch beim Nicotin ist der höchste Anstieg nach der Verwundung im jüngsten Blatt vorhanden, welches mit 20 mM auch die insgesamt höchste Nornicotinkonzentration aufweist.

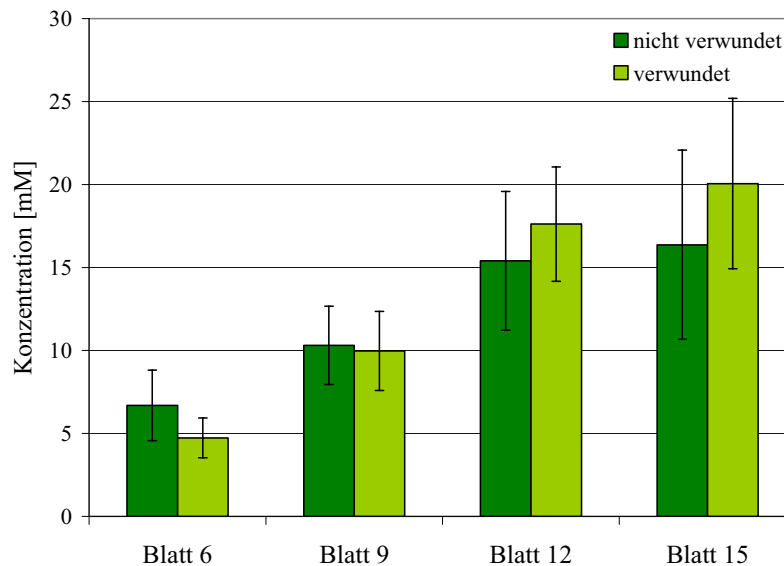


Abbildung 49: Vergleich der Verteilung von Nornicotin in Trichomen der Blattoberseite über mehrere Blattetagen, jeweils auf der Blattspitze, vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung von Blatt 6; Blatt 6 stellt ein voll ausdifferenziertes Blatt dar, Blatt 15 das jüngste aus der Knospe herausgetretene Blatt (Zahl der Wiederholungen n = 6-10)

Die Verteilung des Alkaloids Anabasin ist in Abbildung 50 dargestellt. Anders als bei den beiden Alkaloiden Nicotin und Nornicotin ist hier kein Gradient über die verschiedenen Blattetagen erkennbar. Vier Tage nach der mechanischen Verwundung ist hier nur ein marginaler Unterschied der Konzentration des verwundeten Blattes zu den anderen Blättern erkennbar, das die niedrigste Anabasinkonzentration der Blattetagen zeigt.

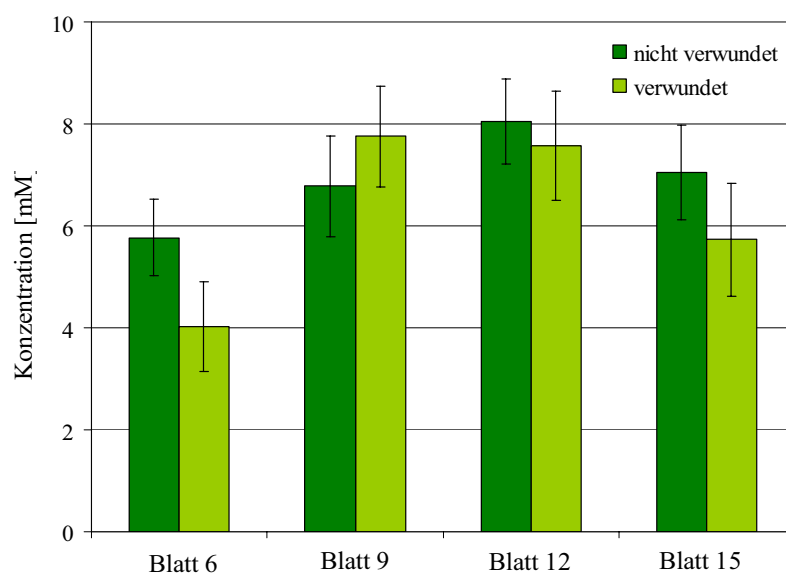


Abbildung 50: Vergleich der Verteilung von Anabasin in Trichomen der Blattoberseite über mehrere Blattetagen, jeweils auf der Blattspitze, vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung von Blatt 6; Blatt 6 stellt ein voll ausdifferenziertes Blatt dar, Blatt 15 das jüngste aus der Knospe herausgetretene Blatt (Zahl der Wiederholungen n = 6-10)

- Verteilung über das ganze Blatt bei einem ausdifferenziertem und einem jungen Blatt:
Die Verteilung des Alkaloids Nicotin in Abbildung 51 zeigt, dass im unverwundeten Zustand das junge Blatt signifikant höhere Nicotinkonzentrationen in den verschiedenen Blattregionen zeigt als das ausdifferenzierte Blatt. In beiden Blättern ist jedoch kein Konzentrationsgradient über das Blatt erkennbar. Im ausdifferenzierten Blatt zeigen die Blattränder der Blattmitte vor dem Blattgrund die höchste Konzentration und niedrigste Konzentration ist an der Blattader der Blattmitte zu finden. Im jungen Blatt hat die Blattspitze mit 130 mM deutlich weniger Nicotin als die restlichen Blattregionen mit ca. 200 mM Nicotin. Das ausdifferenzierte Blatt zeigt mit der Höchstkonzentration von ca. 60 mM signifikant weniger Nicotin als das junge Blatt. Vier Tage nach der Verwundung des ausdifferenzierten Blattes ist in ihm eine Halbierung der Nicotinkonzentration am Blattrand und an der Blattader der Blattmitte zu sehen. Im jungen Blatt verdoppelt sich die Nicotinkonzentration an der Blattspitze während sie im restlichen Blatt nahezu unverändert bleibt. Die Blattspitze zeigt mit einer Nicotinkonzentration von 265 mM nach der Verwundung die insgesamt höchste Nicotinkonzentration vor und nach der Verwundung der Pflanze.

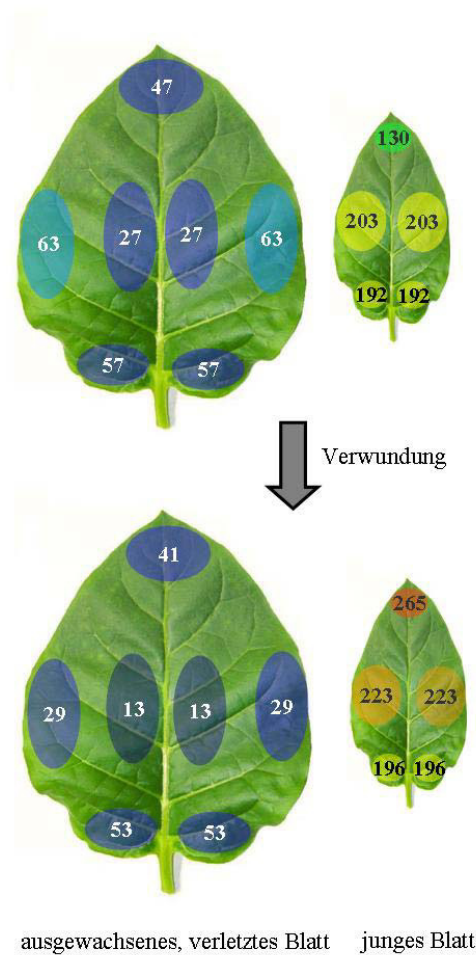


Abbildung 51: Vergleich der Nicotinverteilung über das ganze Blatt in Trichomen auf der Blattoberseite, jeweils in einem ausdifferenzierten Blatt und einem jungen Blatt vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung von dem ausdifferenzierten Blatt (Zahl der Wiederholungen n = 5-8)

Die Verteilung von Nornicotin, welche in Abbildung 52 zu sehen ist, konnte nicht für alle Blattregionen ermittelt werden, denn die Konzentration lag in vielen Proben unterhalb der Bestimmungsgrenze. So konnte im ausdifferenzierten Blatt die Nornicotinkonzentration am Blattrand der Blattmitte zu 5 mM bestimmt werden, während sie am Blattgrund zu 3 mM bestimmt wurde. Im jungen Blatt zeigt der Blattgrund eine Konzentration von 5 mM und die Blattmitte sowie die Spitze 9 mM. Nach der Verwundung konnten im verwundeten, ausdifferenzierten Blatt keine Werte ermittelt werden, während im jungen Blatt nahezu keine Veränderung zum unverwundeten Zustand zu beobachten ist.

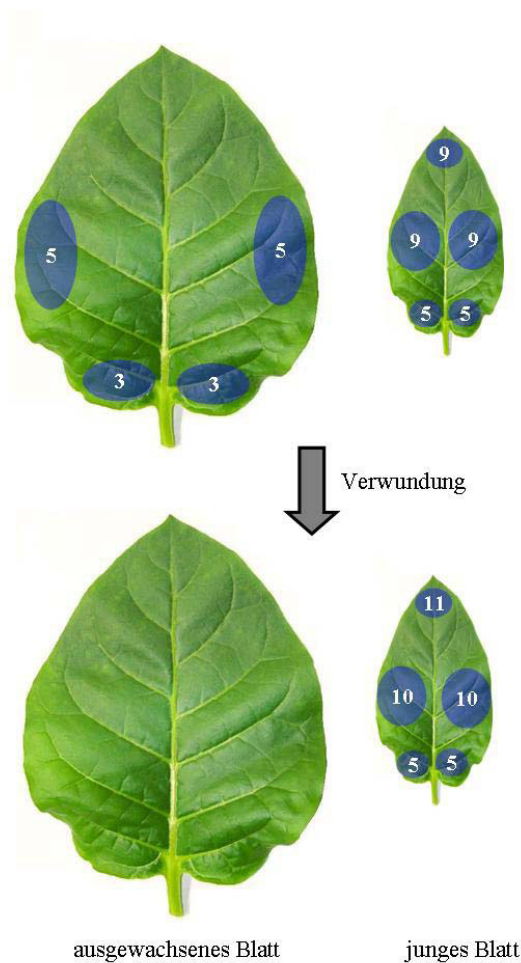


Abbildung 52: Vergleich der Nornicotinverteilung über das ganze Blatt in Trichomen auf der Blattoberseite, jeweils in einem ausdifferenzierten Blatt und einem jungen Blatt vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung von dem ausdifferenzierten Blatt (Zahl der Wiederholungen $n = 5-8$)

Für die Anabasinverteilung (Abbildung 53) verhält es sich wie mit der Nornicotinverteilung. Im ausdifferenzierten Blatt konnte nur die Konzentration am Blattrand der Blattmitte und am Blattgrund bestimmt werden. Die Konzentration im jungen Blatt ist marginal höher als im ausdifferenzierten Blatt. Vier Tage nach der Verwundung konnte im ausdifferenzierten Blatt keine Anabasinkonzentration mehr bestimmt werden. Im jungen Blatt stattdessen hat sich die Anabasinkonzentration an der Blattspitze verdoppelt, während sie auch am Blattgrund und in der Blattmitte leicht zugelegt hat.

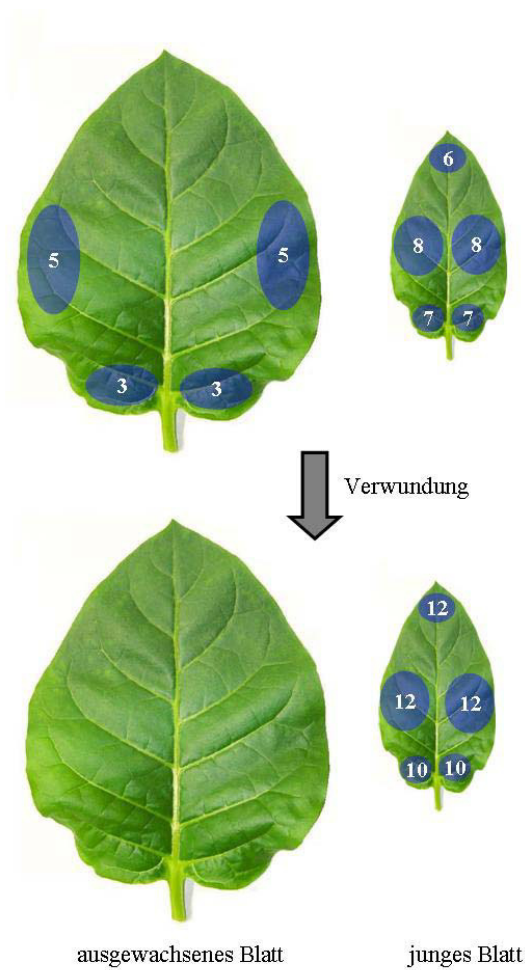


Abbildung 53: Vergleich der Anabasinverteilung über das ganze Blatt in Trichomen auf der Blattoberseite, jeweils in einem ausdifferenzierten Blatt und einem jungen Blatt vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung von dem ausdifferenzierten Blatt (Zahl der Wiederholungen n = 5-8)

3.1.3 Vergleich der Tabakalkaloide und deren Verteilung innerhalb einer Pflanze bei normaler Ernährung und unter Stickstoffmangel

Epidermis und Mesophyll

Die Abbildung 54 zeigt die Verteilung von Nicotin in den verschiedenen Blattgeweben vor und vier Tage nach mechanischer Verwundung des Blattes bei normaler Ernährung und unter Stickstoffmangel. Es ist zu erkennen, dass die obere Epidermis vor und nach der Verwundung bei normaler Ernährung und auch bei Mangelernährung eine höhere Nicotinkonzentration aufweist als die untere Epidermis und das Mesophyll. Das Mesophyll zeigt insgesamt gesehen, die niedrigste Nicotinkonzentration. Sowohl bei der normalen Ernährung als auch bei der Mangelernährung zeigt die obere Epidermis nach der Verwundung eine etwas höhere Nicotinkonzentration als im unverwundeten Zustand. Für die untere Epidermis ist bei beiden Ernährungsbedingungen diesbezüglich kein Unterschied sichtbar. Für das Mesophyll zeigt sich auch bei der Mangelernährung keine Änderung, während bei der normalen Ernährung die Nicotinkonzentration nach der Verwundung halbiert ist. Insgesamt betrachtet zeigt die Pflanze unter der Mangelernährung eine um ca. 43 % niedrigere Nicotinkonzentration für die einzelnen Blattgewebe als die Pflanze der normalen Ernährung.

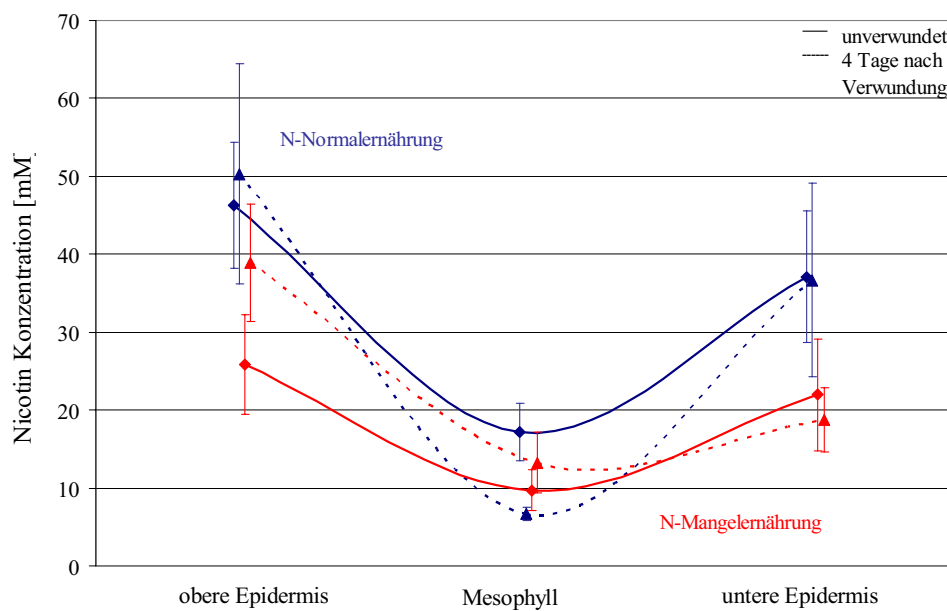


Abbildung 54: Vergleich der Nicotinverteilung [mM] in den verschiedenen Geweben an der Blattspitze eines ausdifferenzierten Blattes vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung des Blattes; blaue Darstellung: Pflanzen unter normalen Bedingungen kultiviert; rote Darstellung: Pflanzen unter Stickstoffmangel (Zahl der Wiederholungen n = 6-10)

Trichome

Untersuchungen der Alkaloidkonzentration von Trichomen:

- Blattspitze, über 4 verschiedene Blattetagen von einem ausdifferenzierten Blatt bis hin zu einem jungen Blatt
- Verteilung über das ganze Blatt bei einem ausdifferenzierten und einem jungen Blatt
- Blattspitze, über 4 verschiedene Blattetagen von einem ausdifferenzierten Blatt bis hin zu einem jungen Blatt:

Die Nicotinverteilung in Trichomen über verschiedene Blattetagen bei normaler und Mangelernährung der Pflanzen in Abbildung 55 zeigt, dass sowohl im unverwundeten als auch im verwundeten Zustand die Nicotinkonzentration um ca. 37 % für die normal ernährte Pflanze höher liegt als für die mangelernährte Pflanze. Für beide Ernährungen konnte gezeigt werden, dass die niedrigste Nicotinkonzentration im jeweils ältesten, ausdifferenzierten Blatt vorhanden ist und sie tendenziell ansteigt je jünger das Blatt ist. Im unverwundeten Zustand erreicht die Nicotinkonzentration im dritten Blatt ein Maximum, um im vierten wieder deutlich abzunehmen.

Nach der Verwundung ist sowohl für die Mangelernährung als auch für die normale Ernährung ein signifikanter Anstieg der Nicotinkonzentration im jüngsten Blatt zu erkennen, während die anderen Blattetagen nahezu keine Veränderungen zeigen. Für die normale Ernährung liegt der Anstieg der Nicotinkonzentration bei 82 % und bei der mangelernährten Pflanze bei 36 %. Im verwundeten Zustand der Pflanze hat das jüngste Blatt der normal ernährten Pflanze mit 360 mM Nicotin eine 1,5-fach höhere Nicotinkonzentration als die mangelernährte Pflanze und zeigt damit die von allen Blattetagen höchste bestimmte Nicotinkonzentration.

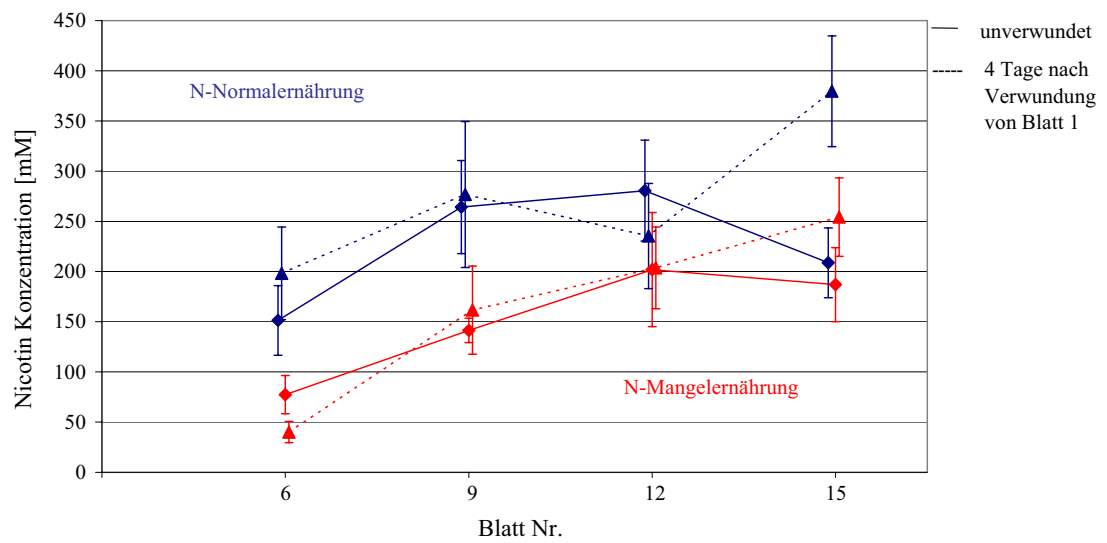


Abbildung 55: Vergleich der Nicotinverteilung in Trichomen der Blattoberseite über mehrere Blattetagen, jeweils auf der Blattspitze, vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung von Blatt 6 bei normaler Ernährung (blaue Darstellung) und bei Stickstoffmangel (rote Darstellung); Blatt 6 stellt ein voll ausdifferenziertes Blatt dar, Blatt 15 das jüngste aus der Knospe herausgetretene Blatt (Zahl der Wiederholungen n = 6-10)

Die Verteilung von Nornicotin über mehrere Blattetagen einer Pflanze (Abbildung 56) zeigt nur eine marginale Differenz zwischen den Alkaloidkonzentrationen der normal ernährten und der mangelernährten Pflanze. Der jeweilige Verlauf der Nornicotinkonzentration über die verschiedenen Blattetagen ist vergleichbar mit dem Verlauf der Nicotinkonzentration. So steigt die Konzentration mit jeder Blattetage an, je jünger das Blatt ist. Eine Ausnahme bildet jeweils das jüngste Blatt im unverwundeten Zustand. Vier Tage nach der Verwundung des ältesten ausdifferenzierten Blattes lässt sich genau wie beim Nicotin ein signifikanter Anstieg im jüngsten Blatt beobachten. So steigt die Nornicotinkonzentration bei normaler Ernährung nach der Verwundung um das 1,8-fache auf 23 mM an. Für die Mangelernährung ist der Anstieg nach der Verwundung zwar weniger deutlich, aber die Konzentration steigt auch hier um ein viertel der Ausgangskonzentration auf 20 mM an.

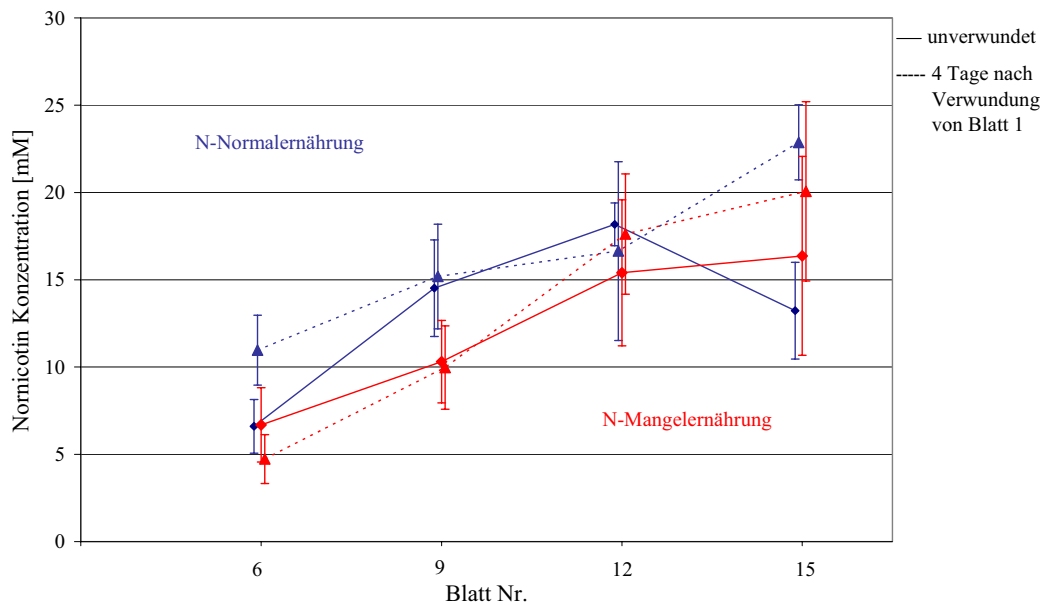


Abbildung 56: Vergleich der Nornicotinverteilung in Trichomen der Blattoberseite über mehrere Blattetagen, jeweils auf der Blattspitze, vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung von Blatt 6 bei normaler Ernährung (blaue Darstellung) und bei Stickstoffmangel (rote Darstellung); Blatt 6 stellt ein voll ausdifferenziertes Blatt dar, Blatt 15 das jüngste aus der Knospe herausgetretene Blatt (Zahl der Wiederholungen n = 6-10)

In Abbildung 57 ist die Verteilung des dritten Alkaloids Anabasin dargestellt. Hier zeigt sich im unverwundeten Zustand kein Unterschied in der Konzentration von normal- und mangelernährten Pflanzen. Im Gegensatz zu den bisher dargestellten Alkaloiden verhält sich das Anabasin nach der Verwundung anders. Während für Nicotin und Nornicotin nach der Verwundung nur ein signifikanter Anstieg der Alkaloidkonzentration im jüngsten Blatt vorhanden war, ist hier für die normal ernährte Pflanze ein signifikanter Anstieg der Anabasinkonzentration in allen Blättern zu beobachten. Für die mangelernährte Pflanze ist kein Unterschied zwischen unverwundeter und verwundeter Pflanze zu erkennen.

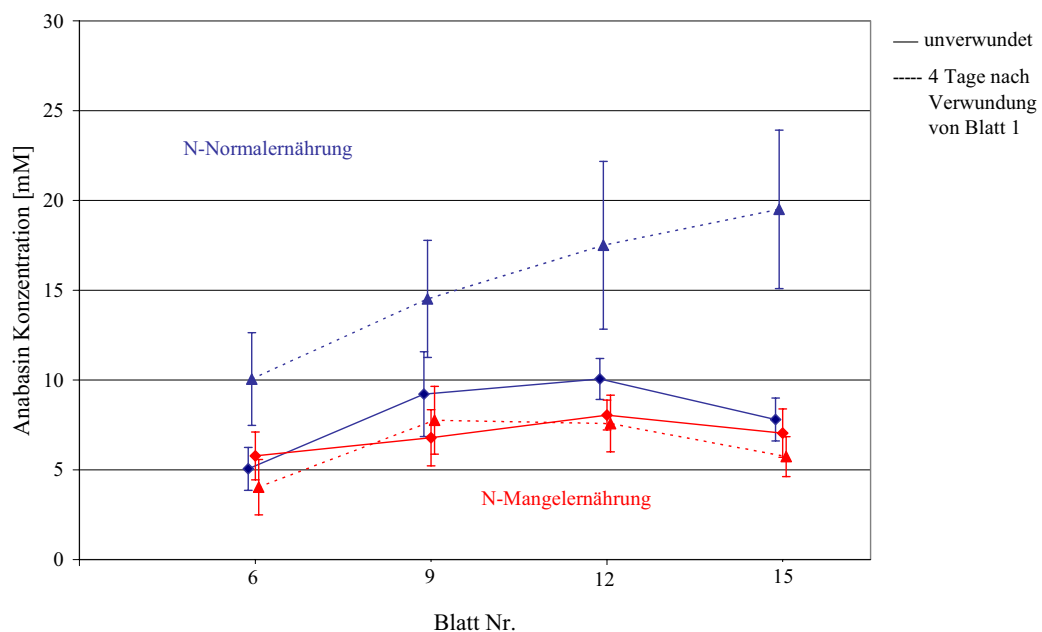


Abbildung 57: Vergleich der Anabasinverteilung in Trichomen der Blattoberseite über mehrere Blattetagen, jeweils auf der Blattspitze, vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung von Blatt 6 bei normaler Ernährung (blaue Darstellung) und bei Stickstoffmangel (rote Darstellung); Blatt 6 stellt ein voll ausdifferenziertes Blatt dar, Blatt 15 das jüngste aus der Knospe herausgetretene Blatt (Zahl der Wiederholungen n = 6-10)

- Verteilung über das ganze Blatt bei einem ausdifferenzierten und einem jungen Blatt:
Die Abbildung 58 stellt die Verteilung von Nicotin bei einer normal- und einer mangelernährten Pflanze jeweils in einem ausdifferenzierten und einem jungen Blatt dar. Im unverwundeten Zustand der Pflanze sind signifikante Unterschiede zwischen der Normal- und der Mangelernährung zu beobachten. So enthält die Blattspitze der normal ernährten Pflanze die 3,5-fache Nicotinkonzentration als die Blattspitze der mangelernährten. In der Blattmitte an der Blattader liegt die Konzentration sogar 5-mal so hoch und am Blattgrund doppelt so hoch wie in der Mangelpflanze. Auffallend ist, dass die Blattränder der Blattmitte beider Pflanzen, d.h. der mangelernährten und der normal ernährten Pflanze, ca. 65 mM Nicotin aufweisen. Bei den jungen Blättern sieht die Nicotinerteilung etwas anders aus. Hier weisen die Blattspitze und die Blattmitte der normal- und der mangelernährten Pflanze nahezu die gleichen Konzentrationen auf. Beim Blattgrund zeigt sich allerdings, dass hier die Nicotinkonzentration bei der mangelernährten Pflanze um das 6,5-fache höher ist als bei der normal ernährten Pflanze. Insgesamt ergibt sich im unverwundeten Zustand für die normal ernährte Pflanze, dass im ausdifferenzierten Blatt höhere Nicotinkonzentrationen vorliegen als im jungen Blatt. Hingegen zeigt die mangelernährte Pflanze im unverwundeten Zustand im jungen Blatt signifikant höhere Konzentrationen als im ausdifferenzierten Blatt.

Bei der Betrachtung der Pflanzen vier Tage nach der Verwundung zeigt sich, dass bei der normal ernährten Pflanze im alten Blatt die Nicotinkonzentration in der Spitze um 75 % reduziert hat, was mit 73 % weniger Nicotin ebenso für die Blattränder der Blattmitte zutrifft. Für den Blattgrund und die Blattmitte an der Blattader ist keine Veränderung sichtbar. Stattdessen ist im jungen Blatt die Nicotinkonzentration an der Blattspitze um 122% gestiegen. Bei der mangelernährten Pflanze ist im alten Blatt ein Rückgang der Nicotinkonzentration in der Blattmitte an der Blattader und am Blattrand jeweils um die Hälfte zu beobachten, während die Blattspitze und der Blattgrund keine Veränderungen aufweisen. Im direkten Vergleich der beiden Ernährungen zeigen beide Blattspitzen der ausdifferenzierten Blätter mit 40 mM die gleiche Nicotinkonzentration. Ein signifikanter Unterschied ist an der Blattader der Blattmitte vorhanden, wo die normal ernährte Pflanze 11-mal so viel Nicotin enthält wie die mangelernährte Pflanze. Am Blattgrund zeigt sich doppelt so viel Nicotin für normal ernährte Pflanze. Für die jungen Blätter allerdings zeigt sich nach der Verwundung kaum noch ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Ernährungen, denn bei beiden Blattspitzen hat sich die Nicotinkonzentration verdoppelt und zeigt mit 240 bzw. 265 mM die höchsten Nicotinkonzentrationen aller untersuchten Proben in dieser Versuchsreihe. Die jeweiligen Blattmitten haben ebenfalls mit 230 mM die gleiche

Konzentration. Eine Ausnahme bildet lediglich der Blattgrund, der bei der mangelernährten Pflanze mit 200 mM keine Änderung zum unverwundeten Zustand der Pflanze aufweist. Obwohl sich zwar die Konzentration des Blattgrunds der normal ernährten Pflanze mit 65 mM verdoppelt hat, liegt die Konzentration am Blattgrund der mangelernährten Pflanze 3-mal so hoch.

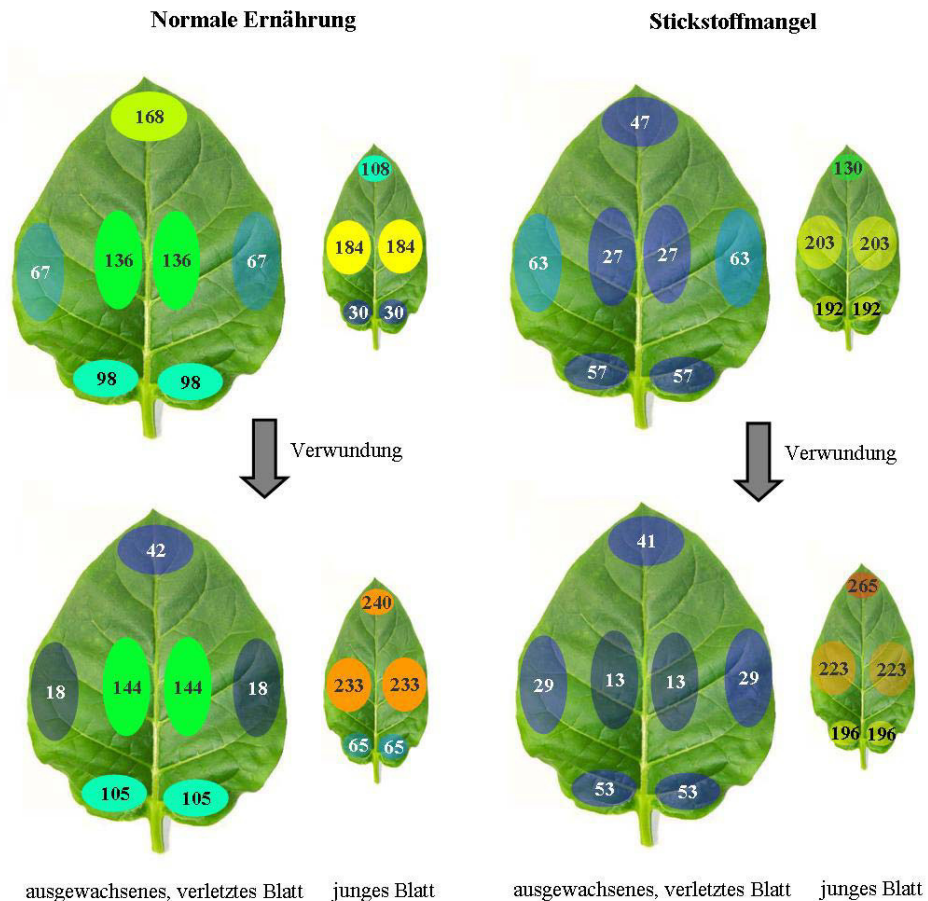


Abbildung 58: Vergleich der Nicotinverteilung über das ganze Blatt in Trichomen auf der Blattoberseite, jeweils in einem ausdifferenzierten Blatt und einem jungen Blatt vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung von dem ausdifferenzierten Blatt; links: bei normaler Ernährung; rechts: bei Ernährung unter Stickstoffmangel (Zahl der Wiederholungen $n = 5-8$)

Für die Nicotininverteilung in Abbildung 69 ist kein signifikanter Unterschied zwischen der normal und der mangelernährten Pflanze zu erkennen. Hier zeigen beide Pflanzen im unverwundeten Zustand in dem jungen Blatt etwas höhere Nicotinkonzentrationen als im ausdifferenzierten Blatt. Nach der Verwundung des ausdifferenzierten Blattes zeigt sich im jungen Blatt der normal ernährten Pflanze eine Zunahme um das 1,7-fache auf 17 mM. Die Spitze der mangelernährten Pflanze weist eine Konzentration von 11 mM auf.

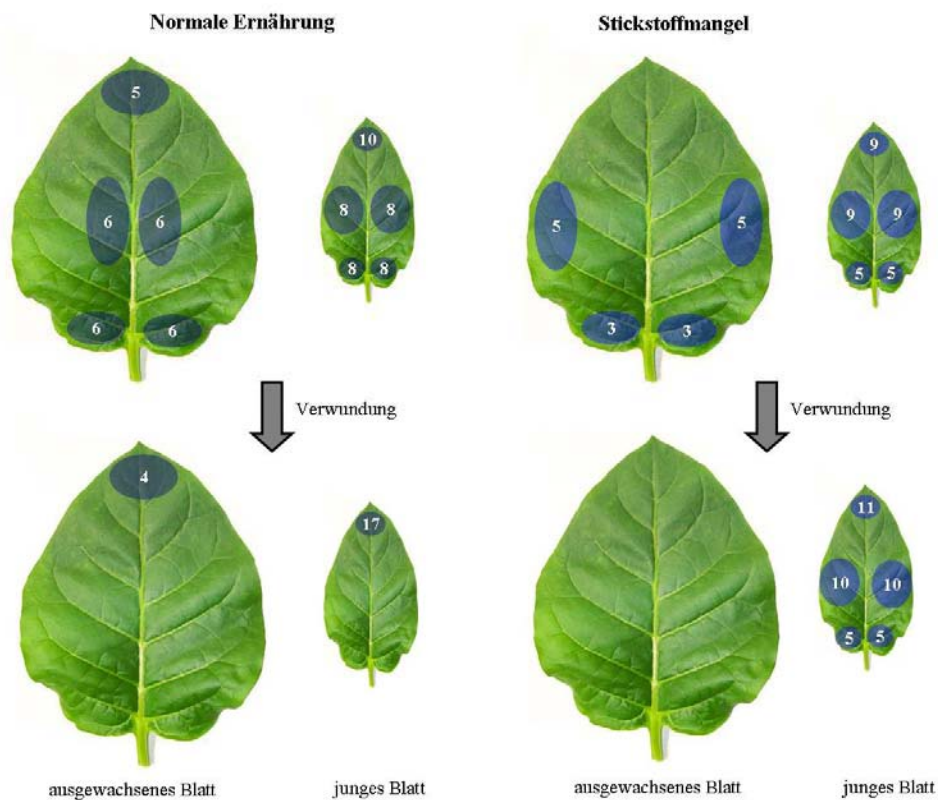


Abbildung 59: Vergleich der Nicotininverteilung über das ganze Blatt in Trichomen auf der Blattoberseite, jeweils in einem ausdifferenzierten Blatt und einem jungen Blatt vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung von dem ausdifferenzierten Blatt; links: bei normaler Ernährung; rechts: bei Ernährung unter Stickstoffmangel (Zahl der Wiederholungen n = 5-8)

In Abbildung 60 sind für die Anabasinverteilung genauso wie bei der Nornicotinverteilung keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen normal- und mangelernährter Pflanze zu beobachten. Zwar zeigt das ausdifferenzierte Blatt der normal ernährten Pflanze im unverwundeten Zustand etwas höhere Werte als das junge Blatt, während es bei der mangelernährten Pflanze umgekehrt ist, doch sie liegen im selben Konzentrationsbereich. Nach der Verwundung zeigen beide Pflanze eine Verdopplung der Anabasinkonzentration an der Blattspitze.

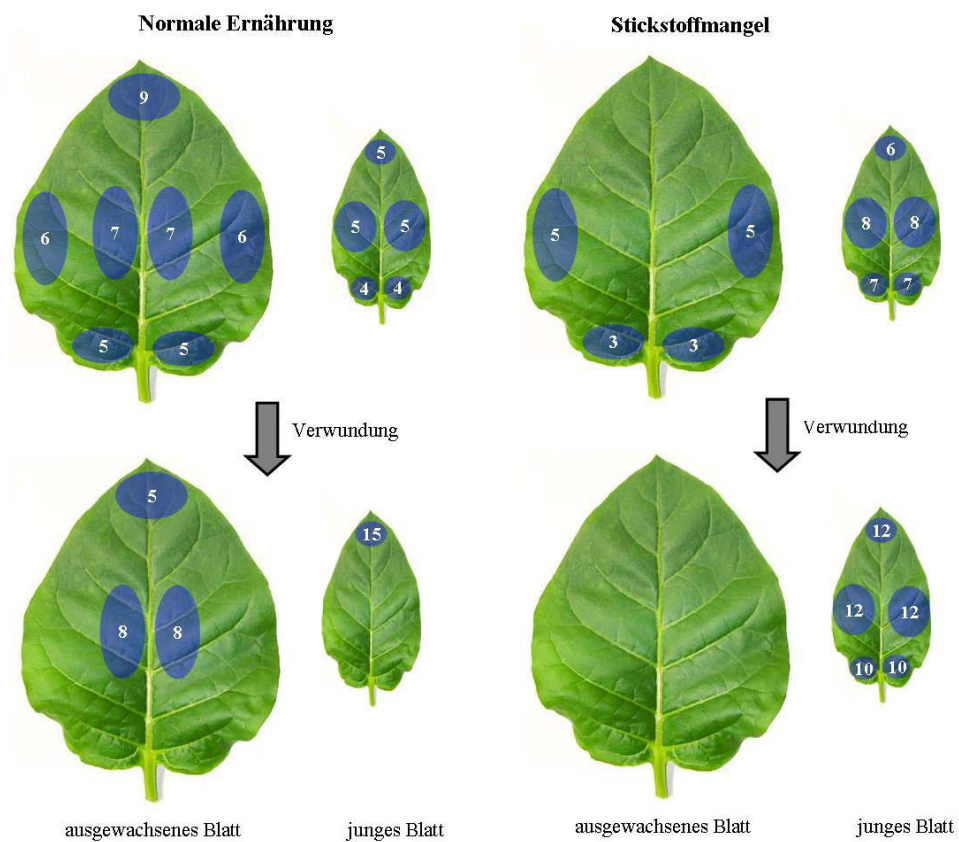


Abbildung 60: Vergleich der Anabasinverteilung über das ganze Blatt in Trichomen auf der Blattoberseite, jeweils in einem ausdifferenzierten Blatt und einem jungen Blatt vor und 4 Tage nach mechanischer Verwundung von dem ausdifferenzierten Blatt; links: bei normaler Ernährung; rechts: bei Ernährung unter Stickstoffmangel (Zahl der Wiederholungen n = 5-8)

Die mit Hilfe der Einzelzellbeprobung ermittelten Ergebnisse zeigen ganz deutlich, dass die Verteilung der Tabakalkaloide nicht homogen ist, sondern von Gewebe zu Gewebe und sogar von Zelle zu Zelle des gleichen Gewebes stark differiert. An anderen Pflanzen wurden bereits Untersuchungen zur Verteilung von Primärmetaboliten durchgeführt, die ebenfalls zeigen, dass die Verteilung der Substanzen stark variieren kann. Leigh et al. untersuchten die Verteilung von Phosphor, Chlorid, Kalium, Calcium und Natrium in Vakuolen von Epidermis- und Mesophyllzellen der Gerste. Sie untersuchten die Verteilung dieser Ionen in Gerstenblättern in Abhängigkeit von der Kalium und Natriumernährung und zeigten, dass unter diesen Wachstumsbedingungen Phosphor nur in Vakuolen des Mesophylls und nicht in der Epidermis vorkommt während Chlorid und Calcium ausschließlich in der Epidermis und Kalium sowie Natrium in beiden Geweben zu finden war [Leigh et al, 1993a]. Zellen verschiedener Gewebearten haben in dem Organismus verschiedene Funktionen zu erfüllen (siehe 'Biologische Grundlagen') und unterscheiden sich daher auch in der Zusammensetzung ihrer Inhaltsstoffe. Dies zeigen auch Dietz et al. bei ihrer Charakterisierung der Kationen- und Anionen-Verteilung zwischen der Epidermis und dem Mesophyll von Gerstenblättern [Dietz et al, 1992b; Dietz et al, 1992c].

Umgekehrt darf jedoch nicht direkt die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Zellen gleicher Gewebearten eine nahezu identische chemische Zusammensetzung aufweisen, da dies nur bedingt richtig ist. Denn Fricke et al. untersuchten anhand von Versuchen an Gerstenblättern, die Konzentrationen verschiedener Ionen, wie Kalium, Calcium, Chlorid, Nitrat und Malat in verschiedenen Zellen der oberen Epidermis und zeigten, dass die Inhaltsstoffe gleicher Zelltypen in ihrer Zusammensetzung und Konzentration erheblich differieren können [Fricke et al, 1995b].

Die oben zitierten Untersuchungen an Pflanzen belegen, dass Pflanzenmetabolite keinesfalls homogen in der Pflanze verteilt sind, sondern sie von Gewebe zu Gewebe und sogar von Zelle zu Zelle stark differieren kann.

Das dieser Effekt auch für den Sekundärmetaboliten Nicotin zutrifft, ist anhand der Versuche an *Nicotiana tabacum* zu sehen. So zeigt eine unter normalen Bedingungen ernährte Pflanze, dass die obere Epidermis mehr Nicotin enthält als die untere Epidermis. Das Mesophyll wiederum weist noch weniger Nicotin auf, als das Epidermisgewebe (siehe Abbildung 54). Diese Nicotinverteilung trifft sowohl für die normal-ernährte als auch für die mangel-ernährte Pflanze zu. Bei der Verteilung von Nicotin in verschiedenen Zellen einer Gewebeart ist zu erkennen, dass eine normal ernährte Pflanze 4 Tage nach der mechanischen Verwundung in der oberen sowie auch in der unteren Epidermis an der Blattspitze einen höheren

Nicotingehalt enthält, als in dem selben Gewebe am Blattgrund (siehe Abbildung 44). Es ist jedoch nicht in allen durchgeführten Versuchen immer die höchste Nicotinkonzentration in der oberen Epidermis vorhanden. Neben der Bestimmung des Zelltyps und der genauen Position, die die Zelle an der Pflanze einnimmt, spielen insbesondere das Alter, das Entwicklungsstadium und der allgemeine gesundheitliche Zustand der Pflanze eine entscheidende Rolle für die Verteilung der Metaboliten. Um solche Nebeneffekte weitestgehend zu vermeiden, wurden die Anzuchtbedingungen standardisiert und die Proben immer von alters- und entwicklungsmäßig vergleichbaren Pflanzen entnommen. Darüber hinaus wurden für jeden Messwert mehrere Proben (n: 4-10) genommen. Da es sich bei Pflanzen allerdings um lebendige Versuchsobjekte handelt, können die genannten Effekte leider nie ganz ausgeschlossen werden.

Pflanzliche Sekundärstoffe übernehmen innerhalb einer Pflanze die unterschiedlichsten Aufgaben. Das Nicotin als Sekundärstoff von *Nicotiana tabacum* fungiert in der Tabakpflanze als Verteidigungstoff gegenüber Feinden und Schädlingen der Pflanze. Mit der pflanzlichen Selbstverteidigung beschäftigten sich schon eine Vielzahl an Wissenschaftlern und stellten hierzu Theorien auf. Die am bekannteste Theorie ist die „Optimal-Plant-Defense“ Theorie (siehe ‘Optimal-Plant-Defense Theorie’). Diese Theorie kann auch im Fall von Nicotin angewendet werden. So entwickelt die Tabakpflanze laut der ersten Hypothese der Theorie ihre Verteidigung in Form von Nicotin, welches ein hochtoxischer Stoff ist. In der zweiten, etwas umfangreicheren Hypothese wird unter anderem beschrieben, dass die Verteidigung sehr kostspielig ist. Dies ist auch im Falle des Nicotins zutreffend, denn die Tabakpflanze muss 5-8 % ihres gesamten Stickstoffhaushalts für die Nicotinbiosynthese aufwenden [Baldwin et al, 1994b; Baldwin et al, 2000b]. Darüber hinaus werden zur Bildung von 1 g Nicotin 3,62g Glucose benötigt [Gershenzon, 1993]. Außerdem ist die Nicotinbiosynthese nicht reversibel, d.h. der einmal in Nicotin investierte Stickstoff kann auch bei dringendem Bedarf der Pflanze nicht wieder zurück gewonnen werden [Baldwin et al, 1994a; Baldwin et al, 1994c].

Weiterhin besagt die zweite Hypothese, dass die pflanzlichen Organismen ihre Verteidigung in direkter Proportion zu dem vom Feind ausgehenden Risiko entwickeln. Werden unter diesem Gesichtspunkt die Ergebnisse betrachtet, so stimmt diese Aussage auch mit den für das Nicotin erhaltenen Ergebnissen überein. Denn bezogen auf die verschiedenen Gewebe wurde gezeigt, dass die Epidermis mehr Nicotin enthält als das Mesophyll, unabhängig von der Ernährung der Pflanze. Nähert sich der Pflanze nun ein Schädling, so findet die erste

Berührung des Schädling mit der Pflanze zuerst auf der Blattober- oder Unterseite und damit auf der oberen bzw. unteren Epidermis statt. Die obere und untere Epidermis sind somit in höherem Masse einem Feind ausgesetzt als die innen liegende Gewebeschicht des Mesophylls, welches sich infolge dessen in der Verteilung des Verteidigungstoffes äußert. Im Vergleich zu den verschiedenen Geweben beinhalten die Trichome von *Nicotiana tabacum* teilweise das bis zu 10-fache mehr an Nicotin. Zudem konnten in den Trichomen auch noch die anderen beiden Tabakalkaloide Nornicotin und Anabasin bestimmt werden. Dieses Ergebnis kann ebenso mit der zweiten Hypothese der OD-Theorie belegt werden, denn die Trichome befinden sich auf der Blattoberfläche der Ober- und Unterseite eines Blattes und sind folglich einem noch höheren Risiko vor einem möglichen Fraßfeind ausgesetzt als die obere und untere Epidermis [Ohmeiss et al., 2000].

Weiter heißt es in der Theorie, dass die Verteidigung immer unter Berücksichtigung der Bedeutung des Gewebes für die Pflanze geschieht. Bei der Betrachtung der Ergebnisse von den Proben aus den Trichomen, so kann hier eindeutig gesagt werden, dass die Pflanze die größte Bedeutung ihrer Gewebe in den jungen Blättern sieht [Baldwin et al., 1995]. Denn hier ist nach der Verwundung der Pflanze ein signifikanter Anstieg der Alkaloidkonzentration, insbesondere die des Nicotins in den jungen Blättern zu erkennen. Darüber hinaus zeigen die Blattspitzen der jungen Blätter die höchste Nicotinkonzentration, was wiederum mit dem Risiko der größten Gefährdung erklärt werden kann. Bei der genauen Betrachtung einer Tabakpflanze ist leicht zu sehen, dass ein Schädling zuerst die Blattspitze angreifen würde, bevor er zum Blattgrund durchgedrungen ist.

Eine weitere Aussage der Theorie ist, dass auf Grund der Kostspieligkeit einer Verteidigung, die Verteidigungsstoffe in der Abwesenheit von Feinden minimiert und sie nur im Falle einer akuten Gefährdung der Pflanze erhöht werden. Diese Aussage kann ebenfalls anhand der erhaltenen Ergebnisse nachvollzogen werden, denn sowohl bei den Proben aus den verschiedenen Geweben, als auch bei den Proben aus den Trichomen ist bei der normalen und der Mangelernährung ein Anstieg des Nicotins nach der Verwundung der Pflanzen zu beobachten [Ohnmeiss et al, 2000].

3.2 Untersuchung der Nicotinverteilung über die Blattetagen von *Nicotiana tabacum* durch Extraktion von Blattsegmenten

In diesem Versuch wurde mit Hilfe von Blattextrakten die Nicotinverteilung untersucht. Hierdurch sollte ein Überblick über die Verteilung von Nicotin über die verschiedenen Blätter einer gesamten Pflanze geschaffen werden, da ein solcher Überblick mit der Methode der Einzelzellbeprobung wegen des aufwendigen Verfahrens der Probennahme nicht möglich war.

Hierzu wurden wiederum Pflanzen aus einer normalen und solche aus einer mangelernährten Aufzucht beprobt. Wie in Kapitel 'Extraktion von Blattsegmenten' beschrieben, wurden pro Blatt insgesamt sechs Stanzlinge, jeweils zwei aus der Blattspitze, zwei aus der Blattmitte und zwei aus dem Blattgrund entnommen. Bei etwas kleineren Blättern konnten entsprechend der Blattgröße weniger Stanzlinge herausgestanzt werden. In den folgenden Abbildungen 61 und 62 ist jeder einzelne Stanzling als ein farbiges Kästchen dargestellt. Bei den Blättern, an deren Spitze nur eine Probe entnommen werden konnte, ist dieses als ein größeres Kästchen zu sehen. Die Farben entsprechen jeweils der Intensität des Nicotiningehalts, welcher aus der nebenstehenden Farbskala entnommen werden kann. Für die grau dargestellten Kästchen konnte auf Grund experimenteller Probleme bei der Extraktion kein Nicotiningehalt ermittelt werden.

3.2.1 Nicotinverteilung bei Ernährung unter normalen Bedingungen

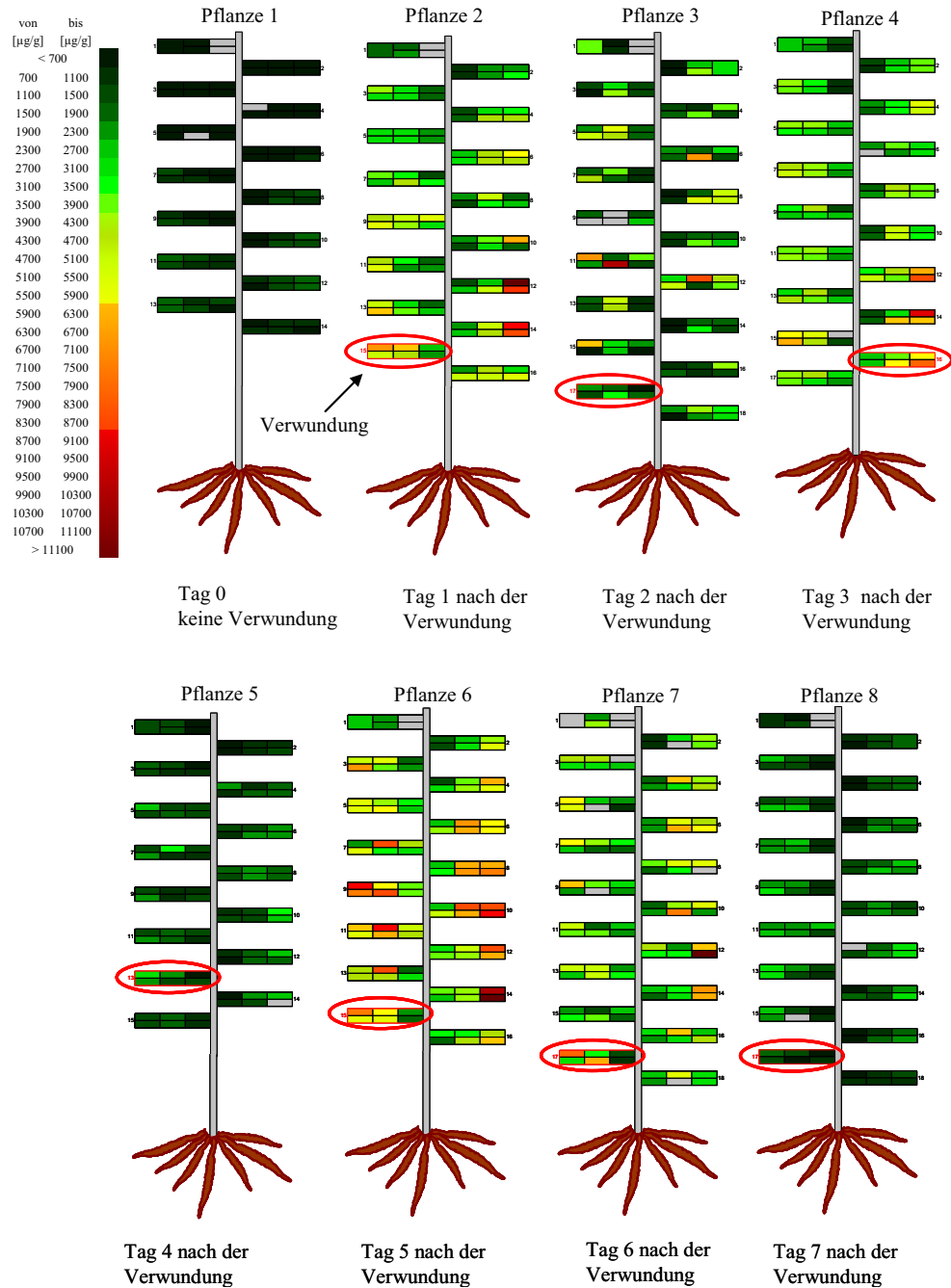
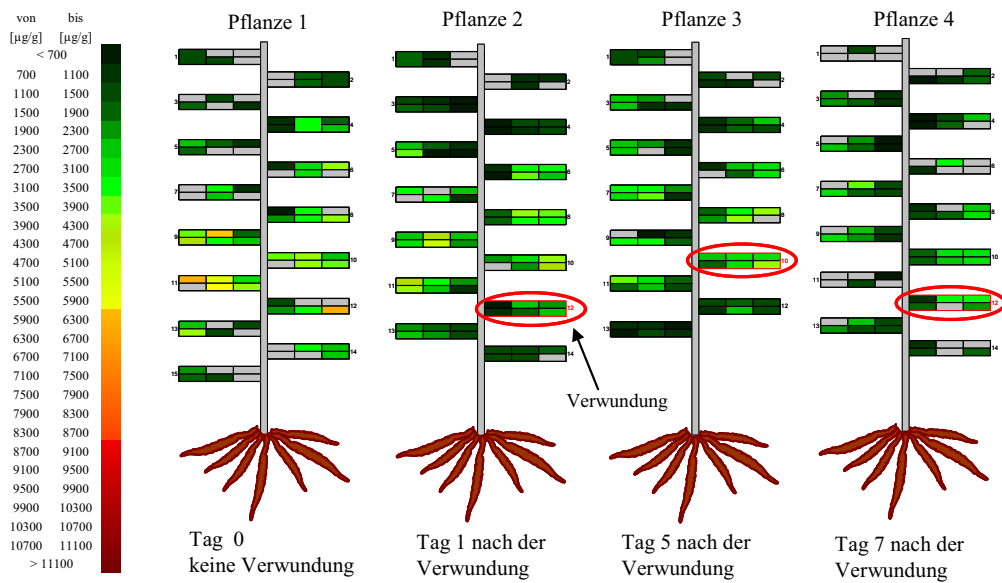


Abbildung 61: Nicotinverteilung über jeweils die einzelnen Blattregionen und Blattetagen einer Pflanze; angefangen bei einer Pflanze ohne mechanische Verwundung bis hin zu einer Pflanze am 7. Tag nach einer mechanischen Verwundung



ersten, fünften und siebten Tag nach der Verwundung darstellen. In dieser Versuchsserie wurde auf Grund der insgesamt hohen Probenanzahl auf die Beprobung der Pflanzen an den übrigen Tagen verzichtet. Im Gegensatz zu der Versuchreihe unter normalen Bedingungen zeigt sich hier eine etwas andere Verteilung des Nicotins, denn die unverwundete Pflanze weist den insgesamt höchsten Nicotingehalt aller untersuchten Mangelpflanzen auf während die anderen drei Pflanzen alle vergleichbare Nicotingehalte haben. Insgesamt lässt sich allerdings auch hier beobachten, dass die Blattspitzen einen höheren Nicotingehalt beinhalten als die Regionen des Blattgrunds.

Im Vergleich dieser Ergebnisse mit denen der Einzelzellbeprobung, ist auffällig, dass sich hier nicht der Effekt zeigt, dass im verwundeten Zustand die jungen Blätter mehr Nicotin aufweisen als die alten ausgewachsenen Blätter. Dieser sehr grundlegende Unterschied könnte aber in der vollkommen unterschiedlichen Probenahme liegen. Während die Einzelzellproben die Nicotingehalte an sehr definierten Stellen wieder spiegeln, zeigen die Stanzlingproben einen Durchschnitt des Nicotingehalts über alle Gewebeschichten eines Blattes. Hinzu kommt noch, dass bei diesen Proben auch noch Zellwandmaterial sowie apoplastische Flüssigkeit und Cytosol in den Extrakten vorhanden war. Das Nicotin befindet sich allerdings, wie bereits erwähnt wurde, nur in der Vakuole einer Zelle. Dies könnte mit hoher Wahrscheinlichkeit der Grund dafür sein, dass die sich teilweise sehr hohen Nicotingehalte in den Trichomen durch die Verdünnung des restlichen Zellmaterials wieder relativieren.

Gerade der Vergleich dieser Ergebnisse der beiden Methoden zeigt wiederum die Stärke der Einzelzellbeprobung, denn ohne deren Ergebnisse wären die teilweise eklatanten Konzentrationsunterschiede in der Nicotinverteilung nicht darstellbar gewesen.

3.3 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Nicotiana tabacum* 'Samsun'

Das bei Pflanzen Sekret abgebende Gewebe besteht häufig aus externen Zellzusammenschlüssen die Organe oberhalb der Epidermis bilden. Hierunter werden beispielsweise Trichome, Salzdrüsen, Röhrengefäße für Harz oder Gummi und Hydathoden verstanden. Die genannten Organe haben alle unterschiedliche Funktionen und sondern größtenteils nicht flüchtige sekundäre Stoffe ab. Die hauptsächliche Funktion des abgebenden Sekrets wird in erster Linie in der Verteidigung gegen Pflanzenschädlinge und sonstige Feinde gesehen, da oberhalb der Epidermis der erste Kontakt des Schädlings und der Pflanze stattfindet. Darüber hinaus sind zahlreiche Oberflächensekrete als Naturprodukte bekannt wie u.a. die Duftöle, Stoffe die als Pharmazeutika verwendet werden, Harze von Koniferen usw.. Ebenso wie Pflanzen an der Blattoberfläche Stoffe freisetzen, produzieren die Wurzeln sekretähnliche Komponenten die an die Rhizosphäre abgegeben werden, wobei es sich hier größtenteils um organische Stoffe wie Zucker, organische Säuren, Aminosäuren u.a. handelt. Die insgesamt durch Sekrete abgegebene Menge an Stoffen kann bei einigen Pflanzen beachtlich groß sein. So produziert *Nicotiana tabacum* bis zu 17 % ihres Blatt-Trockengewichts als Trichomexudat [Wagner, 1991; Wagner et al, 2001].

Trichome kommen bei nahezu allen 'day plant groups' vor. Sie sind sehr frühen Ursprungs und gehen zurück auf die Alge 'Papillate', die aus dem gleichen Zeitalter wie die Rhyniophyten stammt (erste vaskuläre Landpflanze). Trichome bzw. die Fähigkeit Trichome zu bilden, ist genetisch allen Angiospermen ubiquitär. Diese genetische Anlage bestimmt neben der Formation der Trichome auch die Formation der Wurzelhaare. Es gibt eine Vielzahl strukturell verschiedener Trichome wobei die einfachste das einzellige Trichom ist, dass nicht mehr als eine verlängerte Papille darstellt. Auf Grund der Vielzahl unterschiedlicher Trichome wurde von Haberlandt (1914) sowie Metcalfe und Chalk (1950, 1979) versucht, die Trichome zu klassifizieren. Folglich werden Trichome in einzell- oder mehrzellige Trichome eingeteilt. Diese beiden Typen können wiederum Drüsen enthalten oder drüsenfrei sein. Weiterhin können sie mehrarmig, sternförmig, schildartig oder dendritisch ausgebildet sein (siehe Abbildung 69). Oftmals wird allerdings eine Überlappung der Formtypen vorgefunden [Duffey, 1986].

Bei *Nicotiana tabacum* Pflanzen gibt es drei verschiedene Typen von Trichomen. Hierbei wird wiederum zwischen drüsenhaltigen (siehe Abbildung 63) und solche, die keine Drüsen enthalten, unterschieden. Die Trichome, die keine Drüsen enthalten, sind die oft sehr langen Trichome und produzieren keine gummiartigen Substanzen. Bei den drüsenhaltigen Trichomen kommen zwei verschiedene Typen vor. Zum einen gibt es lange Trichome, die eine harzige, klebrige Substanz mit lipophilen Eigenschaften abgeben (siehe Abbildung 65). Diese gummiartige Masse, die sich auf der Blattoberfläche verteilt, enthält u.a. Diterpene, während die kurzen Trichome keine klebrige Substanz frei setzen (siehe Abbildung 64). Stattdessen stoßen die kurzen Trichome nicotinhaltiges Wasser in Form von kleinen Tröpfchen aus. Diese kleinen Wassertröpfchen sammeln sich bei hoher Luftfeuchtigkeit auf der Blattoberfläche rund um die kurzen Trichome an [Meyberg et al, 1991]. Die einmal durch Sekret abgegebenen Substanzen können nach der Ausscheidung nicht mehr in den metabolischen Prozess der Pflanze zurück gelangen [Fahn, 1988].

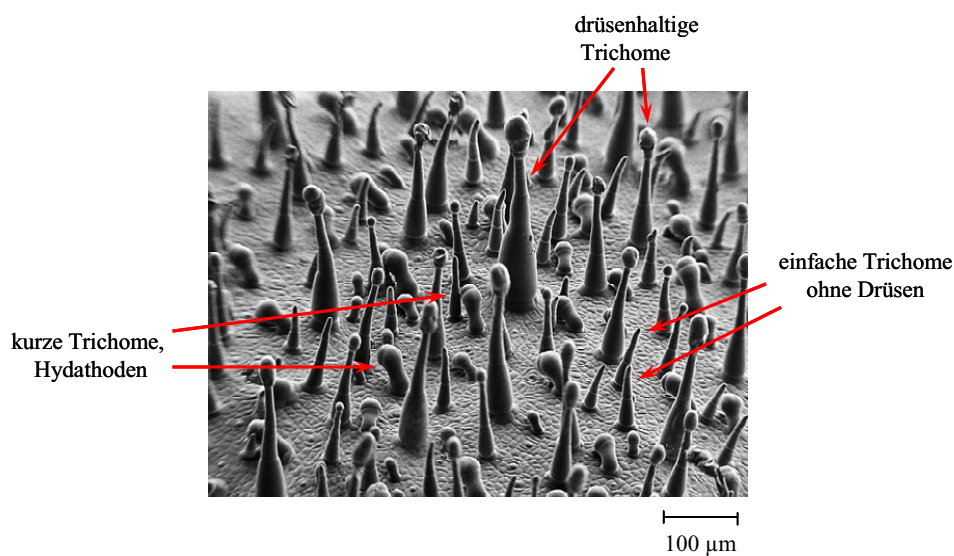


Abbildung 63: Blattausschnitt mit den verschiedenen Typen von Trichomen

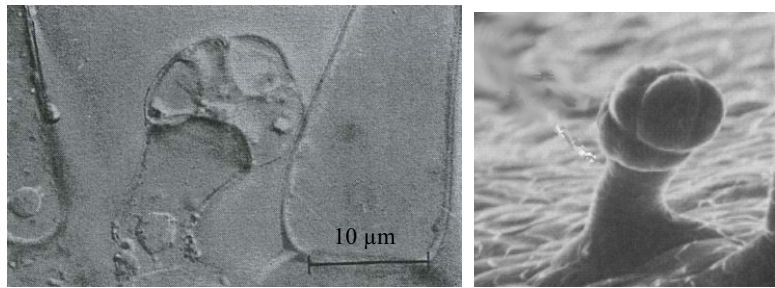


Abbildung 64: Kurze Trichome bzw. Hydathoden, die kleine Wassertropfen absondern

In der näheren Betrachtung eines langen drüsenhaltigen Trichoms lässt sich erkennen, dass der Stängel eines solchen Trichoms aus vier bis sechs Zellen und der Kopf aus einer bis sechs Zellen bestehen (siehe Abbildung 65). Bei jungen Trichomen wurde beobachtet, dass oftmals nur eine Kopfzelle vorhanden war, während ältere Trichome mehrere Kopfzellen aufwiesen. Außerdem können mehrzellige Kopfzellen Kristalle enthalten, die aus Calciumoxalat bestehen (siehe Abbildung 67) meistens beinhalteten die Kopfzellen noch Chloroplasten [Wang et al, 2004]. Die kurzen Trichome bestanden im Wesentlichen aus nur einer Zelle, die den Stengel bildeten, aber auch aus mehreren Kopfzellen, oftmals zwischen 8 und 16 Zellen. Im Gegensatz zu den langen Trichomen besitzen kurze Trichome weder Chloroplasten noch Kristalle in den Kopfzellen.

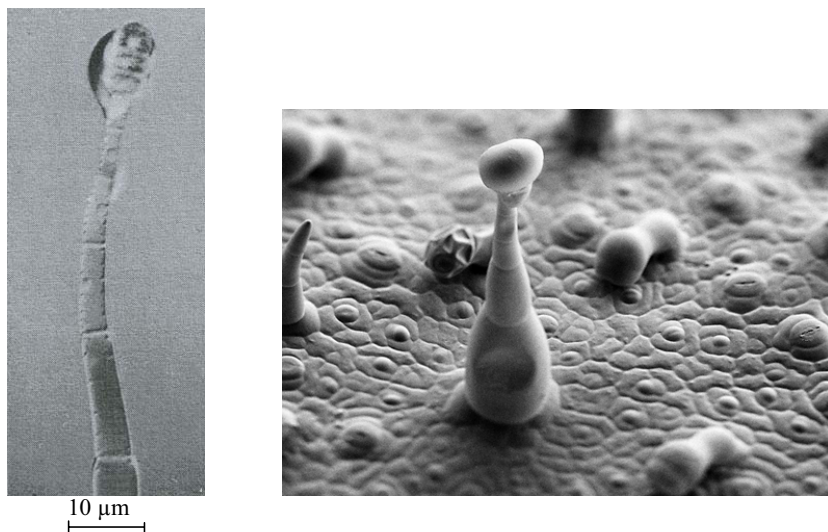


Abbildung 65: Langes, drüsenhaltiges Trichom mit einem Sekrettropfen

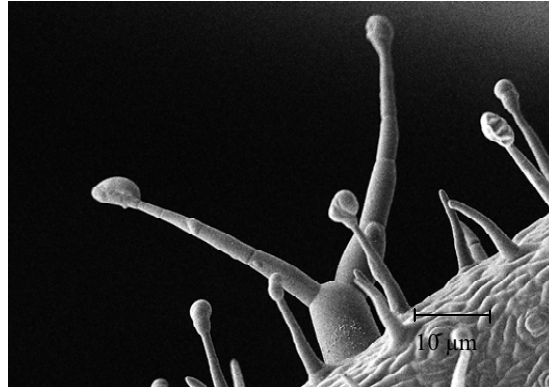


Abbildung 66: Drüsenhaltiges, zweiarmiges Trichom

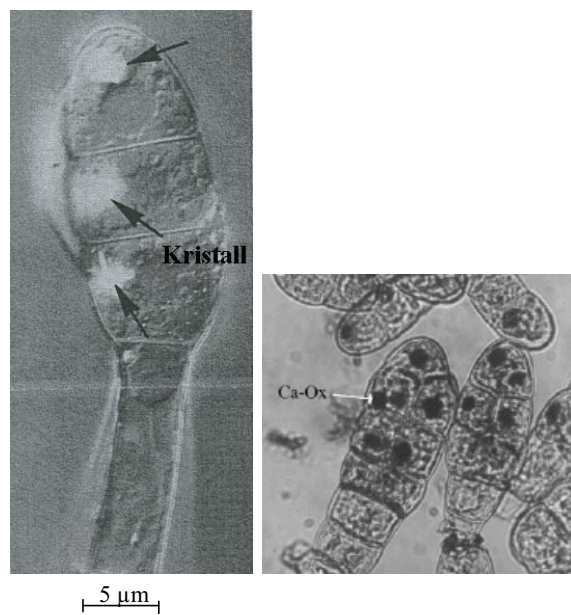


Abbildung 67: Kopf eines langen drüsenhaltigen Trichoms mit Kristallen

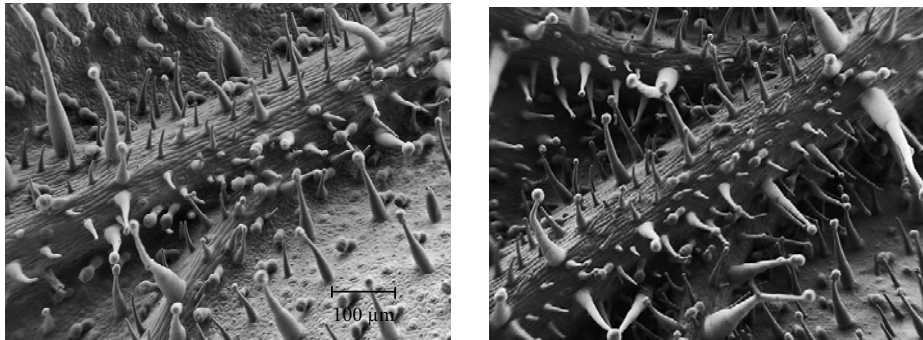


Abbildung 68: Blattader mit einer Vielzahl von Trichomen

In der Forschung über Pflanze/Insekten Interaktionen spielen Trichome insbesondere die drüsenhaltigen Trichome eine wichtige Rolle. Das zentrale Dogma dieser Forschung ist, dass Pflanzen natürliche Produkte zu ihrer eigenen Verteidigung gegen pflanzenfressende Insekten einsetzen [Duffey, 1986]. Diese Form der chemischen Verteidigung kann auf zwei verschiedene Arten die Insekten beeinflussen. Zum einen durch die physikalisch, chemischen Eigenschaften der Verteidigung, worunter die Reflektion des Lichts, das Trichom als Insektenfalle als ganzes sowie die Zähigkeit des Tropfens zu verstehen ist und zum anderen durch die biologischen Eigenschaften, wie die Toxizität oder die nicht nahrhafte Qualität des Exudats. Die sich insbesondere mit den Trichomen befassende Forschung beschreibt die Verteidigung der Pflanze gegenüber Insekten als eine Antwort von Ursache und Wirkung unter mehreren Gesichtspunkten. So stellen die Vielzahl von Trichomen auf einer Blattoberfläche eine physikalische Barriere gegenüber den möglichen feindlichen Insekten dar, denen dadurch der Kontakt zur Blattoberfläche erheblich erschwert wird. Sie können so durch den Wald an Trichomen weder selbst Schutz auf der Blattoberfläche finden, noch nach etwas nahrhaftem suchen oder ihre Eier dort ungehindert ablegen. Abbildungen 68 und 69 zeigt einen solchen Wald an Trichomen, der vorwiegend bei jungen Blättern anzutreffen ist. Im Vergleich dazu ist deutlich erkennbar, dass ausdifferenzierte Blätter weitaus weniger Trichome zeigen. Darüber hinaus können die Trichome toxische Substanzen enthalten, die bei Kontakt oder Nahrungsaufnahme der Insekten mit der Blattoberfläche als Gift auf diese wirken. Außerdem besitzen insbesondere verletzte Trichome die Fähigkeit, gummiartige, harzige und klebrige Substanzen abzusondern, wodurch Insekten auf der Blattoberfläche fixiert werden und letztlich nicht überleben können [Duffey, 1986].

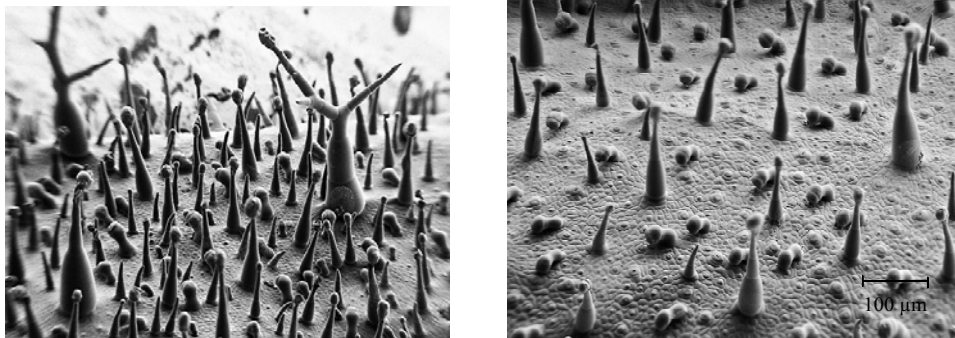


Abbildung 69: Links: junges Blatt mit sehr vielen Trichomen; rechts: ausdifferenziertes Blatt mit deutlich weniger Trichomen als bei dem jungen Blatt

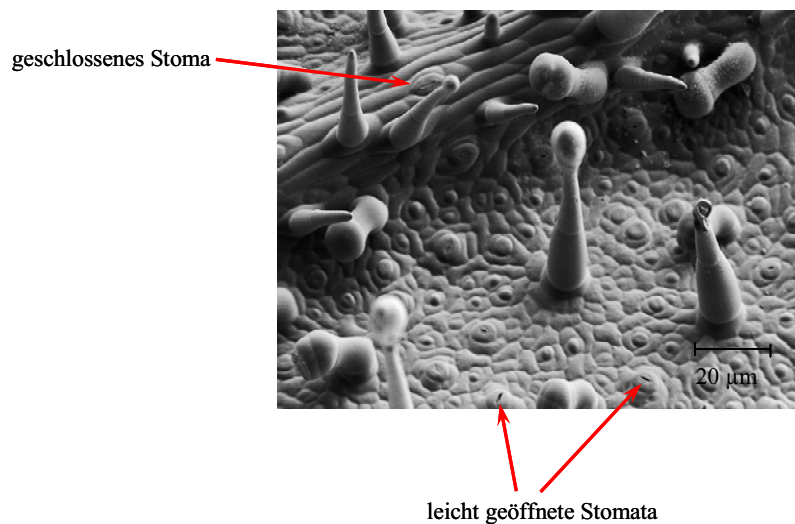


Abbildung 70: Blattausschnitt mit teilweise geschlossenen bzw. leicht geöffneten Stomata

Bereits in verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Trichomexudate Schlüsselkomponenten in den Tabak/Insekt Interaktionen spielen [Severson et al, 1985; Severson et al, 1994b; Jackson et al, 1996]. Neben dem für Pflanzenschädlinge giftigen Nicotin sind hier auch die im Trichomexudat enthaltenen bereits erwähnten Diterpene für die Schädlinge giftig [Severson et al, 1994a]. Darüber hinaus ist bekannt, dass Pflanzen mit wenig Trichomexudat anfällig für insbesondere Blattlausbefall sind [Johnson et al, 1982; Johnson et al, 1992]. Eine enge Assoziation zwischen vermehrter Zuckeresterbildung in

Tabak und damit verbundener Blattlausresistenz fanden Johnson et al. heraus [Johnson et al, 2002]. Später zeigten Wang et al., dass transgener Tabak *Nicotiana tabacum* L., in dem ein Gen zu vermehrter Exudat Bildung mit Diterpenen exprimiert ist, wesentlich resistenter gegenüber Blattlausbefall ist, als Pflanzen bei denen weniger Exudat mit weniger Gehalt an Diterpenen abgegeben wird [Wagner et al, 2004a].

Die Akkumulation von toxischen Substanzen auf der Blattoberfläche ermöglicht deren direkten Kontakt mit Insekten, Pathogenen und Pflanzenschädlingen. Infolge dessen sind die Trichomexudate ideal ausgerichtet auf eine erste Verteidigung des pflanzlichen Organismus, womit die Pflanze währenddessen Zeit gewonnen hat, ihre induzierte Verteidigungsstrategie zu aktivieren [Wagner et al, 2004b].

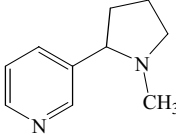
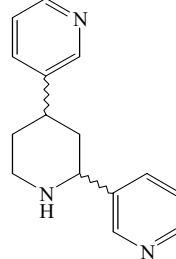
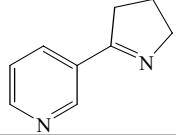
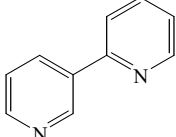
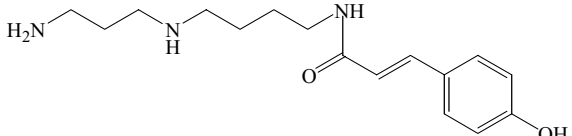
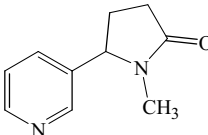
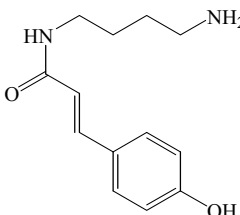
3.4 Untersuchung stickstoffhaltiger Verbindungen in *Nicotiana tabacum* mittels Kapillarelektrophorese/Massenspektrometrie

Die bislang dargestellten Ergebnisse waren auf die Darstellung der drei Tabakalkaloide Nicotin, Nornicotin und Anabasin beschränkt, denn sie wurden mit einer Kapillarelektrophorese mit UV Detektor bestimmt.

Im Folgenden wurden die Versuche neben der Bestimmung der drei Hauptalkaloide des Tabaks auf die Untersuchung anderer stickstoffhaltiger Verbindungen, insbesondere anderer Tabakalkaloide ausgedehnt. Hierzu wurden für die CE-MS Messungen vergleichbare Versuchsreihen zu den bislang dargestellten Ergebnissen durchgeführt.

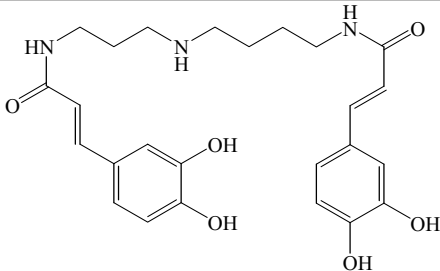
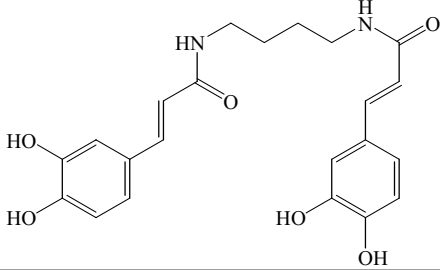
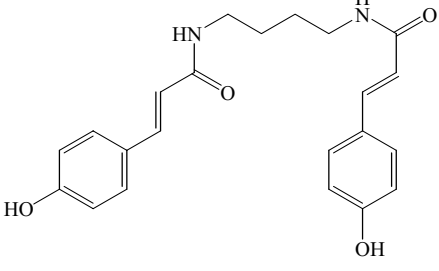
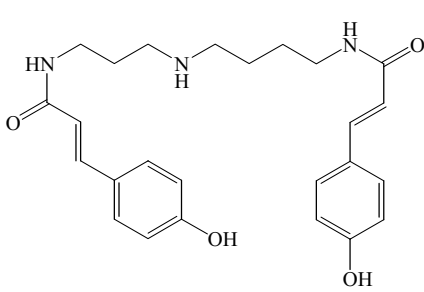
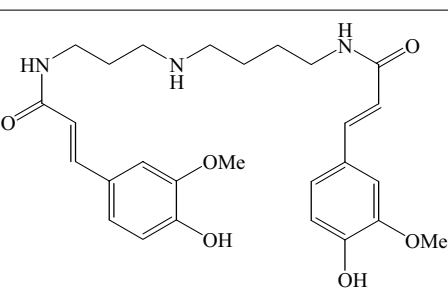
Wie bereits in Kapitel ‘Alkaloide in Pflanzen’ erwähnt, gibt es eine Vielzahl an unterschiedlichsten Alkaloiden in den verschiedensten Pflanzen. Das so genannte „Dictionary of Alkaloids“ [Cordell et al., 1989] beinhaltet alle bekannten Alkaloide und deren Vorkommen in Pflanzen. Mit Hilfe dieses Dictionarys wurden die im Tabak enthaltenen Alkaloide ermittelt und in Tabelle 12 zusammengestellt.

Tabelle 12: Im Tabak vorkommende Alkaloide

Substanz	Molmasse [g/mol]	Struktur
Nicotin	163	
Anatallin	239	
Myosmin	146	
2,3'Bipyridin	156	
Caffeoylspermidin	307	
Conitin	176	
4-Coumaroylputrescin	234	

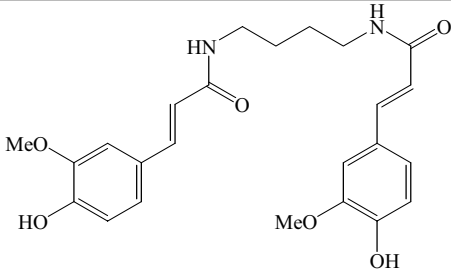
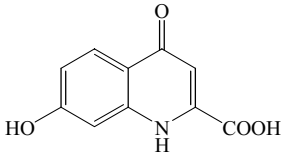
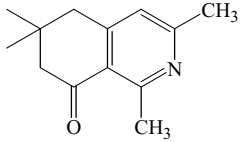
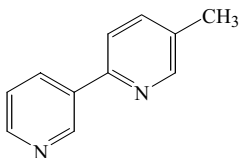
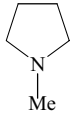
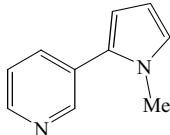
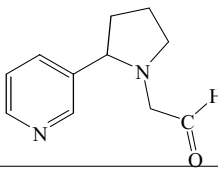
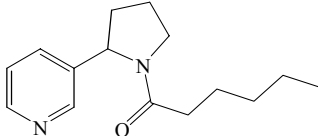
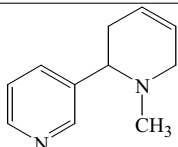
Ergebnisse und Diskussion

Fortsetzung Tabelle 12: Im Tabak vorkommende Alkaloide

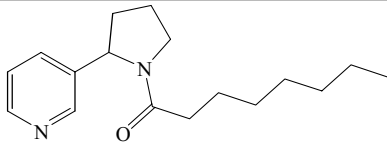
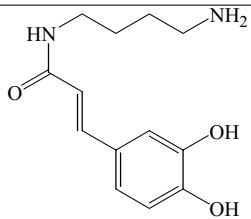
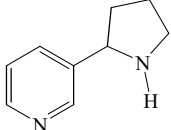
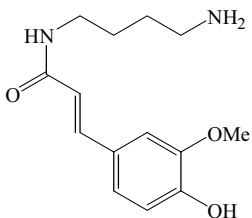
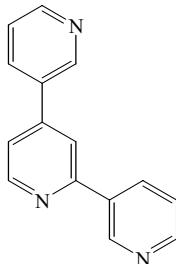
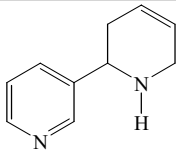
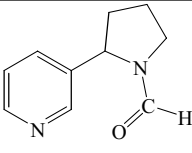
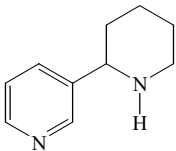
Dicaffeoylputrescin	412	
Dicaffeoylspermidin	470	
Di-4-coumaroylputrescin	380	
Di-4-coumaroylspermidin	438	
Diferuloylspermidin	485	

Ergebnisse und Diskussion

Fortsetzung Tabelle 12: Im Tabak vorkommende Alkaloide

Diferuloylputrescin	440	
1,4-Dihydro-6-hydroxy-4-oxo-2-quinolinoncarbonsäure	205	
6,7-Dihydro-1,3,6,6-tetramethyloisoquinolinon	203	
5-Methyl-2,3'-bipyridin	170	
1-Methylpyrrolidin	85	
3-(1-Methyl(-1H-pyrrol(-2-yl))-pyridin	158	
N-Acetylnornicotin	190	
N-Hexanoylnornicotin	246	
N-Methylanatabin	174	

Fortsetzung Tabelle 12: Im Tabak vorkommende Alkaloide

N-Octanoylnornicotin	274	
Paucin	250	
Nornicotin	148	
Subaphyllin	264	
Nicotellin	233	
Anatabin	160	
N-Formylnornicotin	176	
Anabasin	162	

Alle untersuchten Proben wurden auf das Vorhandensein der in Tabelle 12 dargestellten Alkaloide untersucht. Hierbei war die Durchführung der Versuchsreihen allerdings nicht auf eine quantitative Auswertung der Proben ausgerichtet, sondern zielte vielmehr auf ein Screening anderer als der bislang gemessenen Alkaloide in *Nicotiana tabacum* unter den verschiedensten Bedingungen ab.

Die nachfolgend dargestellten Abbildungen sollen exemplarisch die Bestimmung der Alkaloide für alle untersuchten Proben zeigen.

Abbildung 71 zeigt das Totalionenstrom-Elektropherogramm einer untersuchten Gewebeprobe aus der unteren Epidermis einer normal ernährten Pflanze, die nachfolgend als Probe A bezeichnet wird. Für diese Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, die in Abbildung 72 zu sehen ist.

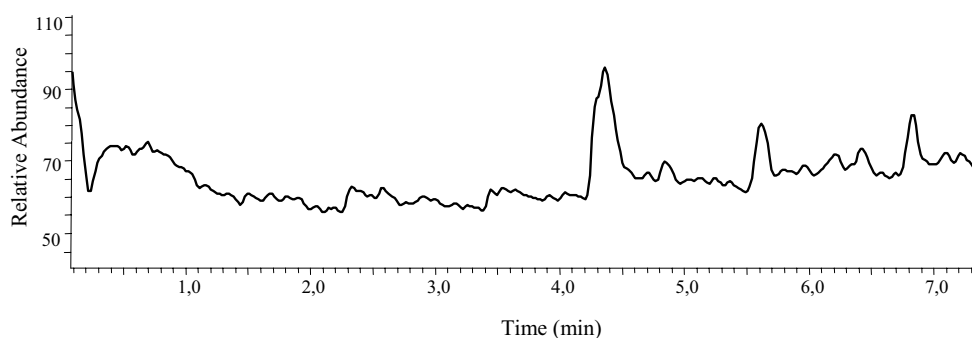


Abbildung 71: Totalionenstrom-Elektropherogramm (TIC) der untersuchten Probe A

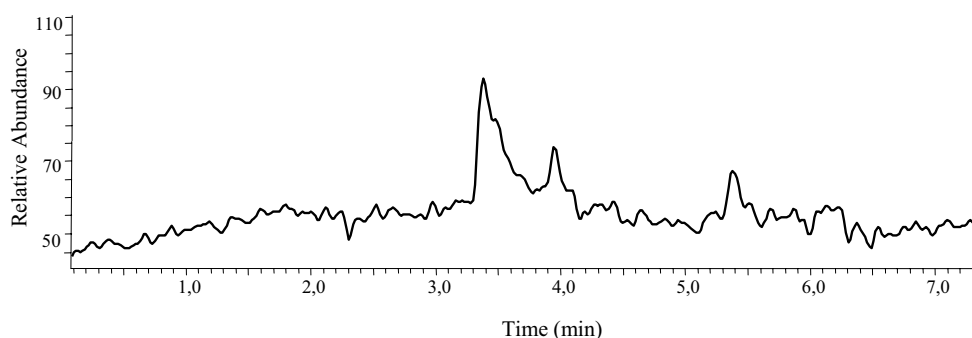


Abbildung 72: Totalionenstrom-Elektropherogramm (TIC) der Doppelbestimmung der untersuchten Probe A

Betrachtet man die beiden Totalionenstrom-Elektropherogramme der untersuchten Probe A im Vergleich, so ist auffallend, dass der erste Peak in der Doppelbestimmung in Abbildung 72 etwa eine Minute früher kommt als in der ersten Messung der Probe in Abbildung 71. Diese Retentionszeitschwankung hat aber nichts mit einem möglichen Unterschied der Peaksubstanzen zu tun, sondern diese Auffälligkeit ist mit dem CE-MS System als solches zu erklären. Das zum Messen der Proben verwendete Gerätesystem war kein kommerziell erhältliches Analysengerät, bei dem Hardware und Software aufeinander abgestimmt sind. Stattdessen wurde eine herkömmliche Kapillarelektrophorese von Beckmann mit einem Massenspektrometer gekoppelt. Folglich war keine auf beide Geräte abgestimmte Software zur Gerätebedienung und Datenaquisition vorhanden. Für jede Messung musste sowohl die Kapillarelektrophorese als auch das Massenspektrometer und die Datenaquisition manuell gestartet werden. Dies geschah im Falle der Kapillarelektrophorese direkt am Gerät und für das Massenspektrometer über eine dem Massenspektrometer dazugehörige Systemsteuerung. Die Datenaquisition musste zusätzlich und möglichst gleichzeitig zu der Kapillarelektrophorese und dem Massenspektrometer gestartet werden. Die Retentionszeitschwankung ist somit mit einem verspäteten manuellen Starten der Software für die Datenaquisition zu erklären. Ähnliche Retentionszeitschwankungen von etwa einer Minute sind auch bei den jeweiligen Elektropherogrammen der identifizierten Einzelsubstanzen zu erkennen (s.u.). Es wurde versucht, durch ein möglichst gleichzeitiges Starten der Kapillarelektrophorese, des Massenspektrometers und der Datenaquisition die Retentionszeitverschiebung auf ein Minimum zu reduzieren. Dies funktionierte jedoch leider nicht bei jeder Analyse, so dass alle Analysen eine mehr oder weniger leichte Retentionsschwankung aufzeigen.

Die Auswertung der Totalionenstrom-Elektropherogramme erfolgte mit Hilfe des Programms zur Auswertung von Massenspektren „Xcalibur“.

Anhand der aus dem „Dictionary of Alkaloids“ [Cordell et al., 1989] ermittelten, im Tabak vorkommenden Alkaloide, wurde jede Probe auf jedes dieser Alkaloide untersucht. Ausgehend von den Totalionenstrom-Elektropherogrammen wurde so anhand der zu den Alkaloiden zugehörigen Molmassen auf der jeweiligen Ionenspur (m/z) das Elektropherogramm ermittelt.

So konnten für die untersuchte Probe A in der ersten Messung auf fünf Ionenspuren Elektropherogramme ermittelt werden, die in der nachfolgenden Abbildung 73 dargestellt sind.

Die so ermittelten Ergebnisse liefern zwar schon recht eindeutige Aussagen über das Vorhandensein von Alkaloiden, doch die Ergebnisse beruhen nur auf den Massen der Substanzen. Eine letztendliche hundertprozentige Identifizierung der Alkaloide wäre nur über eine Strukturbestätigung möglich gewesen. Eine solche Strukturbestätigung hätte ein FT-MS liefern können, womit eine Bestimmung der elementaren Zusammensetzung, wie die Anzahl der N-Atome, möglich gewesen wäre. Eine andere Möglichkeit um die Identifizierung der anhand der Massen gefundenen Alkaloide zu belegen, wären MS-MS Messungen gewesen. Hierbei hätte eine Fragmentierung der Alkaloide stattgefunden, wobei sich für die jeweiligen Alkaloide typische Fragmente hätten bilden müssen. Diese letztendlichen Möglichkeiten der Identifizierung konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr durchgeführt werden.

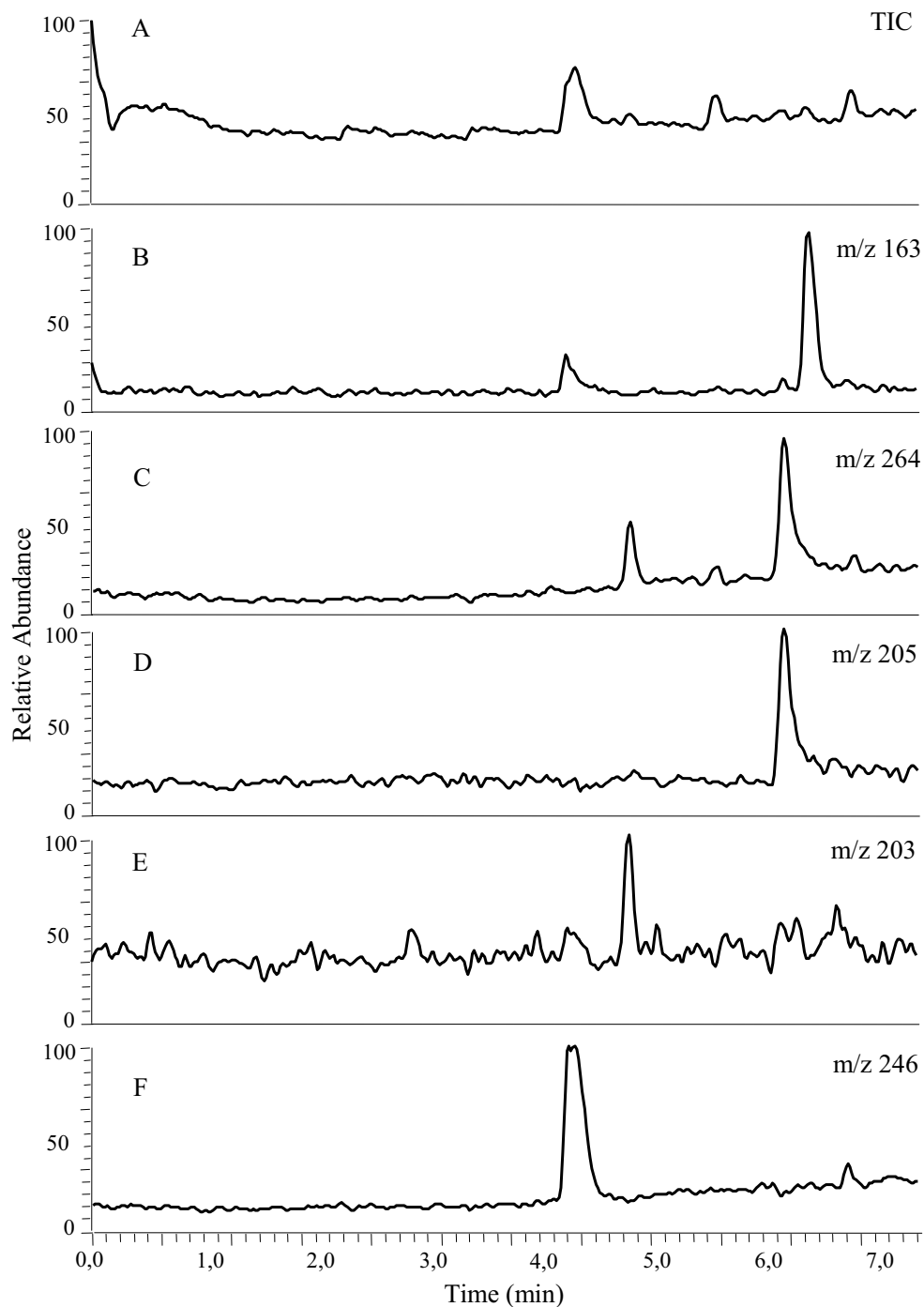


Abbildung 73: Analyse der Probe A. A: Total Ion Current (TIC) Elektropherogramm; B - F: Elektropherogramme auf den Ionenspuren von: m/z 163 (B), m/z 264 (C), m/z 205 (D), m/z 203 (E), m/z 246 (F)

Die fünf auf den jeweiligen Ionenspuren ermittelten Elektropherogramme können den Substanzen Nicotin (B), Subaphyllin (C), 1,4 Dihydro-6-hydroxy-4-oxo-2quinolincarbonsäure (D), 6,7-Dihydro-1,3,6,6-tetramethylisoquinolinon (E) und N-Hexanoylnornicotin (F) zugeordnet werden.

In der Doppelbestimmung der Probe A wurde dasselbe Peakmuster ermittelt wie in der ersten Messung der Probe A. Die Abbildung 74 zeigt übereinander gelegt die jeweiligen Elektropherogramme auf den einzelnen Ionenspuren der genannten Substanzen aus den beiden Messungen der Probe A.

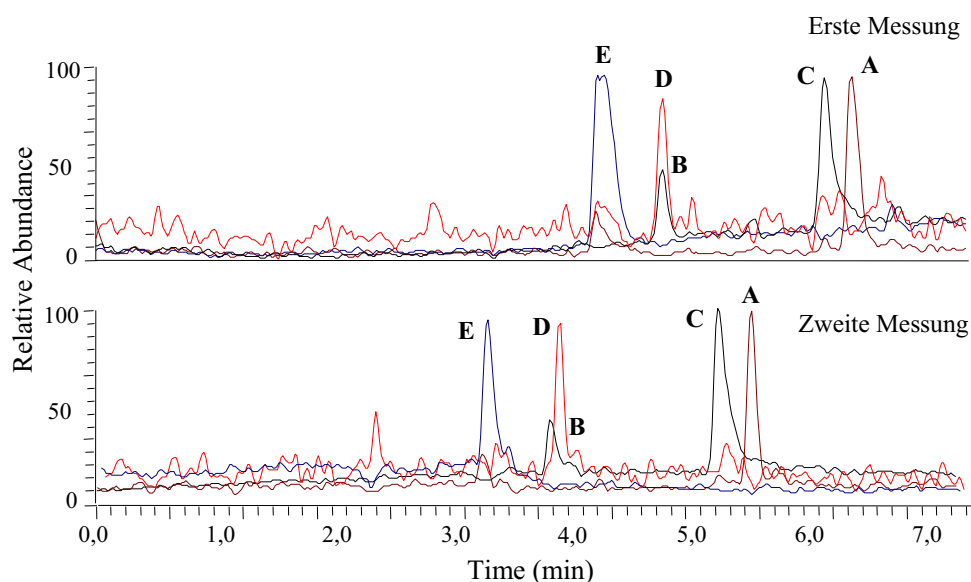


Abbildung 74: Übereinander gelegte Elektropherogramme auf den jeweiligen Ionenspuren der beiden Messungen von Probe A; A: Nicotin, B: Subaphyllin, C: 1,4 Dihydro-6-hydroxy-4-oxo-2quinolinsäure, D: 6,7-Dihydro-1,3,6,6-tetramethyl-isoquinolinon, E: N-Hexanoylnornicotin

Wird auch hier bei den beiden aus den einzelnen Ionenspur-Elektropherogrammen entstehenden Peakmustern die Retentionszeit betrachtet, so zeigt sich bei der zweiten Messung der Probe A ebenfalls wie bei den Totalionenstrom-Elektropherogrammen auch hier eine Retentionszeitschwankung von etwa einer Minute, die die Peaks früher eluieren.

Ungeachtet der Retentionszeitschwankungen, sind jedoch die Differenzen zwischen den Retentionszeiten für die Peaks der jeweiligen Alkaloide in allen ausgewerteten Proben annähernd gleich groß, so dass von identischen Peakmustern in allen Proben gesprochen werden kann.

Die bislang dargestellten Ionenspur-Elektropherogramme sind allerdings noch kein Beweis dafür, dass es sich bei den jeweiligen Peaks auch wirklich um die zugeordneten Alkaloide handelt. Für eine eindeutige und genaue Zuordnung der Alkaloide ist es demnach unerlässlich, sich zu den jeweiligen Ionenspur-Elektropherogrammen zumindest auch die Spektren der einzelnen jeweils in Frage kommenden Substanzen anzuschauen.

Nachfolgend sind die Massenspektren der in Betracht kommenden Peaks aus den jeweiligen Ionenspur-Elektropherogrammen der Probe A abgebildet.

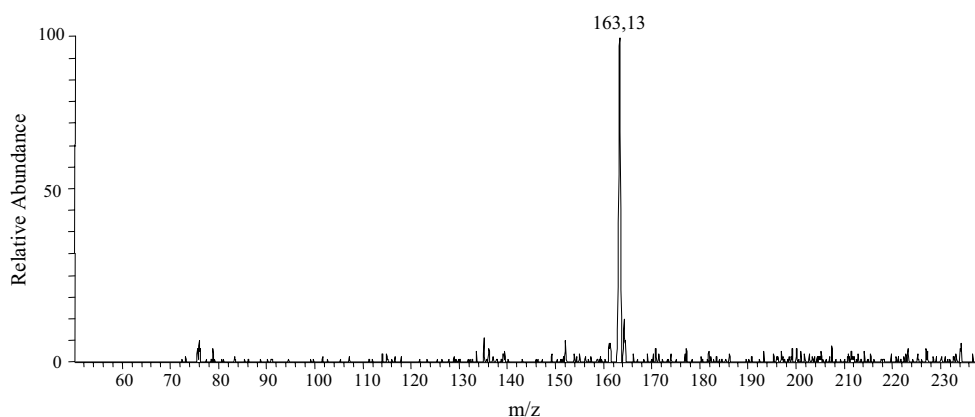


Abbildung 75: Spektrum des anhand der Molmasse 163 identifizierten Nicotins (siehe Abbildung 73)

Die Abbildung 75 zeigt das Spektrum von Nicotin, wobei nur ein Peak auf der Ionenspur m/z 163 zu erkennen ist. Bei dem dargestellten Spektrum wurde eine Untergrundsubtraktion durchgeführt, da es sich bei der gemessenen Probe um eine Realprobe aus nicht auf gereinigtem Pflanzenmaterial gehandelt hat und auf diese Weise eventuelle Störmassen aus Matrixkomponenten eliminiert werden sollten. Der in dem Spektrum vorhandene Peak fällt auf die Masse 163 und entspricht damit der Molmasse des Nicotins.

Die bei den durchgeführten Analysen angewendete Elektrospray-Ionisation zeigt bei optimierten Bedingungen keine Fragmentierung der Substanzen, so dass folglich auch keine Fragmente des Nicotins gebildet werden konnten. Auf Grund dessen ist in dem Spektrum des Nicotin-Peaks nur der Molekularpeak des Nicotins und keine Fragmente davon enthalten.

Bei dem Massenspektrum des auf der Ionenspur m/z 264 (Subaphyllin) gemessenen Peaks verhält es sich analog.

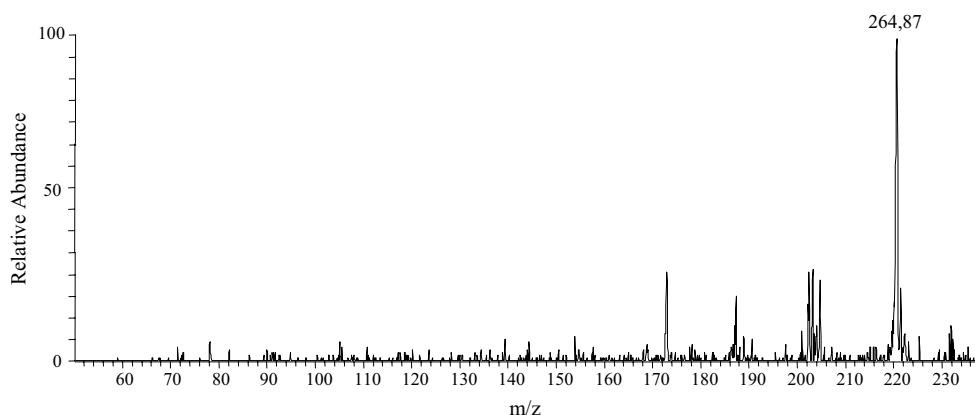


Abbildung 76: Spektrum des anhand der Molmasse 264 identifizierten Subaphyllins (siehe Abbildung 73)

Das Spektrum von Subaphyllin in Abbildung 76 ist wiederum aus bereits genannten Gründen nach einer Untergrundsabstraktion aufgezeigt. Auch hier ist nur der Molekularpeak auf der Ionenspur m/z 264 zu erkennen.

Genau wie beim Nicotin stimmt auch in diesem Spektrum die Masse 264 mit der Molmasse der Substanz Subaphyllin überein.

An dieser Stelle zeigen sich die bereits erwähnten Grenzen der Methode. Mit Hilfe eines FT-MS hätte hier eine Strukturbestätigung den eindeutigen Beweis für die identifizierten Alkaloide geliefert bzw. MS-MS die jeweils typischen Fragmente.

Die dargestellten Elektropherogramme und Spektren stammen aus der ersten Messung der Probe A. Die Ergebnisse aus der zweiten Messung der Probe A decken sich mit den hier dargestellten Ergebnissen. Auf Grund dessen wird hier an dieser Stelle auf ihre Darstellung verzichtet.

Die Elektropherogramme und Spektren der anderen Proben sollen hier an dieser Stelle nicht dargestellt werden. Die jedoch oben diskutierten Eigenschaften der beiden Alkaloide Nicotin und Subaphyllin aus der Probe A stehen exemplarisch für alle anderen in den gesamten Proben gefundenen Alkaloide, da sie für alle diese zutreffend sind.

Nach der Auswertung aller gemessenen Proben in der beschriebenen Art und Weise, ergibt sich nun die folgende Verteilung der Alkaloide in den unterschiedlichen Proben (Tabelle 13).

Beim Betrachten der Ergebnisse der unterschiedlichen Versuchsreihen, fallen auf den ersten Blick die Gewebeproben ins Auge. Die Gewebeproben umfassen Proben aus der oberen und unteren Epidermis sowie aus dem Mesophyll einer normal ernährten Pflanze. Diese Proben sind in der Tabellenübersicht die einzigen, bei denen Nicotin und Nornicotin unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Entsprechende Messungen von Einzelzellproben mit der CE-UV allerdings zeigten Nicotin und Nornicotin. Der Grund für die zu geringen Konzentrationen liegt in dem hohen Verdünnungsfaktor von ca. 1000 der zuvor gepoolten Einzelzellproben, um das für die CE-MS Messungen geforderte Probenvolumen zu erreichen.

Hingegen zeigen alle Proben aus Trichomen und aus den Stanzlingen, die mit der CE-MS vermessen worden waren, dass Nicotin und teilweise auch Nornicotin enthalten ist [Burton et al., 1992].

Bei der weiteren Betrachtung der Ergebnisse ist auffällig, dass alle Einzelzellproben einschließlich der Gewebe-Einzelzellproben N-Hexanoynornicotin enthalten, außer den Stanzlingsproben.

Das Alkaloid Subaphyllin kommt von allen Alkaloiden am zweithäufigsten in den gemessenen Proben vor. Es ist in zwölf von sechzehn Proben vorhanden, wobei hier allerdings kein Unterschied zwischen Einzelzellproben und Stanzlingen gemacht werden kann.

Hinter dem Subaphyllin ist das Di-4-Coumaroylputrescin das dritthäufigste Alkaloid, das in zehn von sechzehn Proben identifiziert werden konnte. Das Vorhandensein von Di-4-Coumaroylputrescin konnte aber keinem bestimmten Gewebe oder Ernährungsstatus zugerechnet werden.

Im Vergleich der Einzelzellproben mit den Stanzlingen konnte neben dem Nicotin die Alkaloide Di-4-Coumaroylspermidin, Diferuloylputrescin, Subaphyllin und 6,7-Dihydro-1,3,6,6-tetramethylisoquinolinon in allen Stanzlingsproben gefunden werden, während sie nur zum Teil in den Einzelzellproben vorhanden waren. Darüber hinaus wurden in den beiden Stanzlingen der normalen Ernährung noch die beiden Alkaloide Anatabin und Diferuloylspermidin gefunden, die ebenfalls in keiner Einzelzellprobe identifiziert werden konnten, das auf die wesentlich höhere Anreicherung dieser Alkaloide in den Stanzlingsextrakten zurückzuführen ist.

Die meisten Alkaloide sind in einer Stanzlingprobe der normalen Ernährung vorhanden. Werden die Stanzlingproben der normalen Ernährung und der Mangelernährung miteinander verglichen, so lässt sich feststellen, dass die Alkaloide 4-Coumaroylputrescin, Diferuloylpermidin und Anatabin in beiden Stanzlingproben der normalen Ernährung vorhanden sind, nicht aber in der Probe der Mangelernährung. Darüber hinaus konnte in einer Stanzlingprobe der normalen Ernährung noch DicaFFEoylputrescin, Di-4-Coumaroylputrescin und 1,4-Dihydro-6-hydroxy-4-oxo-2-quinolincarbonsäure gefunden werden, die in der Mangelernährung nicht vorhanden waren. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse müssten Messungen mit neuen Proben durchgeführt werden.

Für die anderen Alkaloide sind aus diesen Ergebnissen keine weiteren Auffälligkeiten bezüglich ihrer Verteilung innerhalb einer Pflanze, ihres Verhaltens bei Verwundung und bei der unterschiedlichen Ernährung der Pflanze abzuleiten. Um genauere Aussagen diesbezüglich treffen zu können, wären weitergehende Versuchsreihen notwendig. Dabei könnten dann auch die Probleme der genauen Identifizierung der Alkaloide berücksichtigt werden. Als weitere Vorgehensweise zur eindeutigen Identifizierung der Substanzen wären Messungen mit einem FT-MS möglich.

Substanzen	Normale Ernährung				Mangel Ernährung				Gewebe, normale Ernährung				Stanzlinge			
	Blatt jung	Blatt jung verw	Blatt alt	Blatt alt verw	Blatt jung	Blatt jung Verw	Blatt alt	Blatt alt verw	1 obere Epi	2 Untere Epi	3 Meso phyll	4 ober Epi	5 Meso phyll	1 Nor mal	2 Nor mal	Man gel
Nicotin	X	X	X	X	X	X	X	X						X	X	X
Nornicotin	X		X			X									X	
Caffeoylspermidin																
4-Coumaroylputrescin			X	X	X						X			X	X	
Dicaffeoylputrescin			X	X											X	
Dicaffeoylspermidin																
Di-4 Coumaroylputrescin		X	X	X	X	X		X		X		X	X		X	
Di-4 Coumaroylspermidin								X		X				X	X	X
Diferuloylputrescin	X		X											X	X	
Diferuloylspermidin															X	
1,4 Dihydro-6-hydroxy-4-oxo-2 quinolincarbonsäure			X					X		X						
6,7 Dihydro-1,3,6,6 tetramethyl-isoquinolinon					X						X			X	X	X
N-Hexanoylnornicotin	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Subaphyllin			X		X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
Nicotellin																
Anatabin														X	X	
Paucin																
N-Octanoylnornicotin																
N-Methylanatabin																
N-Formylnornicotin																
N-Acetylnornicotin																
3-(1-Methyl-1H-(2-yl))pyridin																
1-Methylpyrrolidin																
5-Methyl-2,3' bipyridin																
Conitin																
2,3' Bipyridin																
Myosmin																
Anatallin																

Tabelle 13: Übersicht über die Verteilung der Alkaloide in den verschiedenen Proben

4 Ausblick

Die Kapillarelektrophorese ermöglicht in der Einzelzellanalyse die simultane Bestimmung sekundärer Pflanzenstoffe, welches im Falle der Tabakalkaloide erfolgreich eingesetzt werden konnte. Diese und die Ergebnisse anderer Versuche [Leigh et al, 1993b; Fricke et al, 1995a; Kehr et al, 1998] zeigen, dass detaillierte Aussagen zu physiologischen Vorgängen ohne solche hoch ortsaufgelösten Untersuchungen häufig nicht möglich sind und damit die Analyse einzelner Zellen ein wichtiges Instrument zur pflanzenphysiologischen Forschung darstellt.

Neben der Methode zur Analyse von Tabakalkaloiden, existieren bereits Methoden zur Bestimmung von anorganischen Anionen, Carbonsäuren und Aminosäuren mit der Kapillarelektrophorese. Darüber hinaus bietet die Kapillarelektrophorese noch vielfältige Möglichkeiten, das Spektrum der erfassbaren Komponenten auf weitere Analytklassen zu erweitern. Denkbar wäre hier auch eine Entwicklung eines so genannten Screenings von Zellinhaltsstoffen. Da das Volumen einer einzelnen Zelle die Anzahl an Analysen beschränkt, wäre es sinnvoll, aus einer so aufwendig gewonnenen Probe möglichst viele Informationen herauszuziehen.

In diesem Zusammenhang bietet die Kopplung der Kapillarelektrophorese mit der Massenspektrometrie ein hohes, noch nicht ausgeschöpftes Potential. Denn gerade auf dem Gebiet der Einzelzellanalyse existieren noch keine veröffentlichten Daten über die Anwendung einer CE-MS Kopplung zur Analyse von Inhaltsstoffen einzelner Pflanzenzellen. Hierzu wäre eine direkte Kopplung des Mikroinjektionssystems der Einzelzellkapillarelektrophorese an ein bestehendes CE-MS notwendig, um die Analyse hoch ortsaufgelöster Proben zu gewährleisten.

Da die Analytik von Einzelzellen eine sehr hohe räumliche und zeitliche Auflösung ermöglicht, könnten auch Vorgänge wie beispielsweise Pathogenbefall von Pflanzen besser verstanden werden. Auch Prozesse in anderen Zelltypen wie Schließ- und Geleitzellen können durch Anwendung dieser Methode besser erfasst werden. Dies könnte auch zu neuen physiologischen Erkenntnissen bei Schließzellbewegungen und Phloembe- und entladung führen.

In Verbindung mit der Leistungsfähigkeit der Analytik sollte in diesem Zusammenhang auch über eine weitere Verbesserung der Einzelzellbeprobung nachgedacht werden. Bei der momentanen Beprobungstechnik von Einzelzellen limitiert die Probenaufbereitung die Anzahl des täglichen Probendurchsatzes. Die aufwendige Probenvorbereitung, d.h. die

Aliquotierung zur Volumenabmessung und internen Standardisierung der vakuolären Probe könnten automatisiert werden. Hier ist auch die rasante Entwicklung von Mikrochips zu nennen. Die so genannten „Lab on a chip“ versprechen großes Potential für die Untersuchung einzelner Zellen, da hier die Verdünnung der Proben keine Rolle mehr spielt. So konnten bereits Aminosäuren, Kohlenhydrate und andere Substanzen mittels Mikrochip nachgewiesen werden [Lacher et al, 2001; Gawron et al, 2001].

Letztlich werden in Zukunft Methoden eine größere Rolle spielen, die weniger in den Stoffwechsel der Pflanzen eingreifen.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand der Modellpflanze *Nicotiana tabacum* die Verteilung sekundärer Pflanzenstoffe in Abhängigkeit unterschiedlicher Stressfaktoren untersucht.

Hierzu wurde die Methode der Einzelzellbeprobung in Verbindung mit der Analyse der Mikroproben mit einer dafür speziell ausgerichteten Kapillarelektrophorese angewendet. Mit dieser Wahl der Untersuchungsmethode waren so Aussagen über die Verteilung der Sekundärstoffe bis auf Zellebene garantiert.

Als sekundäre Pflanzenstoffe der Tabakpflanze wurden die Tabakalkaloide untersucht. Hier stand im Besonderen das mengenmäßig am häufigsten vorkommende Alkaloid Nicotin im Vordergrund. Das Nicotin fungiert in der Tabakpflanze als Abwehrstoff gegenüber Schädlingen und Fraßfeinden. Mit der Beprobung unterschiedlicher Gewebe, wie der oberen und unteren Epidermis, dem Mesophyll und den Trichomen konnte gezeigt werden, dass Nicotin in den einzelnen Zellen dieser Gewebe nicht homogen verteilt ist.

Die Versuche waren auf die Optimierung des Kosten-Nutzen Verhältnisses beim Einsatz der Sekundärstoffe als Abwehrstoffe unter normalen Ernährungsbedingungen und unter limitiertem Ressourcenangebot gerichtet. Als zusätzlicher Stressfaktor wurde den Pflanzen eine mechanische Verwundung zugeführt.

Zur Durchführung der Experimente wurden zunächst Pflanzen unter verschiedenen Bedingungen herangezogen. Da die Pflanzen zum einen unter normalen Bedingungen, zum anderen aber unter limitiertem Stickstoffangebot herangezogen werden sollten, konnte dies nicht in einer Erdkultur geschehen. Folglich wurde eine Aufzucht der Pflanzen in Sandkultur gewählt, um später die Pflanze besser an den Ort der Beprobung führen zu können. Dies wäre bei einer Anzucht in Hydroponikkultur nicht der Fall gewesen. Es wurden Pflanzen unter zwei verschiedenen Ernährungen herangezogen und zwar solche, die ausreichend mit allen Nährstoffen versorgt waren und solche, die weniger Stickstoff bekamen. Der Stickstoff war hier insofern von besonderem Interesse, als das die Tabakpflanze zur Biosynthese ihrer Alkaloide Stickstoff benötigt. Dieser Bedarf an Stickstoff ist nicht unerheblich, denn die Pflanze benötigt dazu 5-8 % ihres gesamten Stickstoffhaushalts für eine Biosynthese, die nicht reversibel ist. Darüber hinaus kostet die Pflanze die Bildung von 1g Nicotin noch 3,62 g Glucose.

Verteilung der Alkaloide in den verschiedenen Geweben

In den Versuchsreihen wurden immer Pflanzen beider Kulturen beprobt. Zunächst stand die Beprobung der unterschiedlichen Gewebe im Vordergrund. Es wurde anfänglich nur die obere und untere Epidermis beprobt, da das Mesophyll als innen liegendes Gewebe einer direkten Beprobung nicht so leicht zugänglich war. Da die Beprobung an lebendigen Pflanzen vollzogen wurde, mussten hier zuerst die Epidermiszellen überwunden werden, um anschließend die Zellen des Mesophylls anstechen zu können. Dieser Schritt konnte letztlich durch ein Anlegen von Überdruck an die Kapillare geschehen. Mit dem Überdruck auf der Kapillare wurde durch die Schicht der Epidermis gestochen, wobei es sich leider nicht vermeiden ließ, dass Zellen der Epidermis verletzt wurden. Allerdings konnte durch den in der Kapillare vorherrschenden Überdruck vermieden werden, dass Zellinhaltsstoffe der Epidermis in die Kapillare gelangten. Mit den so für die obere und untere Epidermis sowie für das Mesophyll erhaltenen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die beiden Epidermisgewebe mehr Nicotin enthalten als das Mesophyll. Im Falle der Stickstoffmangelernährung zeigte sich ein insgesamt um 43 % geringerer Gehalt an Nicotin als in den Pflanzen der normalen Ernährung. Nach der Beprobung der Pflanzen wurden die Pflanzen mechanisch verwundet um durch die Wundreaktion die Nicotinbiosynthese zu induzieren. Vier Tage nach der Verwundung wurde die Probennahme an dem jeweils verletzten Blatt wiederholt und es zeigte sich, dass der Nicotiningehalt in der unteren Epidermis und dem Mesophyll nahezu unverändert blieb, während in der oberen Epidermis ein leichter Anstieg zu verzeichnen war. In allen Gewebeproben konnte nur das Alkaloid Nicotin bestimmt werden, die anderen beiden Alkaloide Nornicotin und Anabasin konnten in keiner der Proben nachgewiesen werden.

Verteilung der Tabakalkaloide in Trichomen

In einer anderen Versuchsreihe wurde nicht das Gewebe, sondern es wurden die Trichome der Blätter beprobt. Wie die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten, verfügen Tabakpflanzen über verschiedene Arten von Trichomen. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde immer dieselbe Art von drüsenhaltigen Trichomen beprobt. Es konnte gezeigt werden, dass der Nicotiningehalt in den Trichomen um das teilweise 10-fache höher liegt als in dem Gewebe der Pflanze. Außerdem konnten in den Proben aus den Trichomen auch die beiden anderen Alkaloide Nornicotin und Anabasin bestimmt werden. Da ein Tabakblatt sowohl auf der Blattober- als auch auf der Blattunterseite Trichome zeigte, wurde zunächst untersucht, ob Unterschiede in dem Alkaloidgehalt der Trichome der beiden Blattseiten

existieren. Diesbezüglich konnten jedoch keine nennenswerten Unterschiede festgestellt werden. Stattdessen wurde ein Konzentrationsgradient von der Blattspitze bis zum Blattgrund auf beiden Blattseiten beobachtet. Die Nicotinkonzentration sank von ca. 200 mM an der Blattspitze um die Hälfte auf ca. 100 mM am Blattgrund. Die anderen beiden Alkaloide waren mengenmäßig signifikant geringer vorhanden. So zeigte Nornicotin an der Blattspitze eine Konzentration von ca. 15 mM, während die von Anabasin mit ca. 10 mM noch geringer war.

Bei der Bestimmung der Nicotinkonzentration in Trichomen jeweils an der Blattspitze verschieden alter Blätter zeigte sich, dass der Alkaloidgehalt mit dem Alter des Blattes abnimmt. Eine Ausnahme bildete hingegen das jüngste Blatt, in dem die Nicotinkonzentration wieder abnahm. Im Vergleich der beiden Ernährungen war im Muster der Alkaloidverteilung kein Unterschied zu sehen. Doch die Stickstoffmangelernährung zeigte insgesamt einen um 33 % geringeren Nicotingehalt als die normal ernährte Pflanze. Für Nornicotin und Anabasin lagen die Gehalte jeweils um 10 % für das Nornicotin und um 20 % für das Anabasin unter den Ergebnissen der normalen Ernährung. Auch in dieser Versuchsreihe wurde den Pflanzen wieder eine Verwundung zugeführt mit dem Ergebnis, dass eine Steigerung des Nicotingehalts in den jüngsten Blättern zu beobachten war. Bei der normalen Ernährung lag diese Steigerung bei 82 % und bei der mangelernährten Pflanze um 36 % im Vergleich zum unverwundeten Zustand der Pflanze.

Die Untersuchung des Nicotingehalts in Trichomen über verschiedene Blattregionen eines Blattes ergab, dass wiederum die Blattspitze die höchste Nicotinkonzentration in Verbindung mit dem bereits festgestellten Gradienten zum Blattgrund hatte. Auch der Blattrand lag in der Konzentration wieder unter der, die in der Blattmitte und an der Blattader bestimmt werden konnte. Weiter zeigte die Blattspitze eines jungen Blattes eine geringere Konzentration als die eines alten, ausgewachsenen Blattes. Wiederum wurde den Pflanzen eine mechanische Verwundung zugeführt, die in einem drastischen Anstieg der Nicotinkonzentration um 122 % an der Spitze des jungen Blattes zu beobachten war. Hingegen sank der Nicotingehalt an der Blattspitze des verletzten, ausgewachsenen Blattes um 75% und am Blattrand um 73%. Die Konzentration in der Blattmitte und am Blattgrund blieb unverändert. Der Vergleich von der Normalernährung und der Mangelernährung zeigt, dass im unverwundeten Zustand der mangelernährten Pflanze die Nicotinkonzentration im alten, ausgewachsenen Blatt um das dreifache an der Blattspitze und sogar um das fünffache in der Blattmitte geringer ist. Im jungen Blatt liegt die Nicotinkonzentration der Mangelpflanze jedoch leicht über der der normal ernährten Pflanze. Nach der Verwundung bleibt dieses Bild der jungen Blätter erhalten. Im verletzten, ausgewachsenen Blatt bleibt die Konzentration der Blattspitze und des

Blattgrunds unverändert, während die Konzentration in der Blattmitte um die Hälfte abnimmt. Die beiden verletzten Blattspitzen der normalen und Mangelernährung zeigen im verwundeten Zustand die gleiche Nicotinkonzentration und die höchste in den Einzelzellproben bestimmte Nicotinkonzentration.

Im Vergleich der Nicotinkonzentrationen von den verschiedenen Geweben zu den Trichomen, konnte festgehalten werden, dass das Gewebe deutlich weniger Nicotin enthält als die Trichome eines Blattes, denn während die höchste im Gewebe ermittelte Nicotinkonzentration bei ca. 50 mM lag, konnten in den Trichomen bis zu 360 mM Nicotin bestimmt werden.

Diese Ergebnisse zeigten Übereinstimmung mit der „Optimal-Plant-Defense“ Theorie, welche sich mit dem Kosten-Nutzen Verhältnis von Pflanzen im Falle einer Verteidigung gegenüber Schädlingen beschäftigt. Die erhaltenen Ergebnisse konnten sowohl für die erste Hypothese als auch für die zweite Hypothese angewandt werden. Die erste Hypothese besagt, dass pflanzliche Organismen eine Verteidigung entwickeln und innerhalb einer Pflanze verteilen, die ihr als Individuum von Vorteil ist und gleichzeitig die Fitness der entsprechenden Pflanzenteile berücksichtigt. Die zweite Hypothese ist etwas umfangreicher, denn sie beschreibt im Einzelnen, dass eine Verteidigung sehr kostspielig ist und damit auch in direkter Relation zur Fitness der Pflanze steht.

Verteilung der Tabakalkaloide in den Stanzlingen

Mit Hilfe von Stanzlingproben wurde die Nicotinverteilung über alle Blattetagen einer Tabakpflanze bestimmt. Die Versuchsreihen sind wie die bisherigen Untersuchungen an normal ernährten und an mangelernährten sowie verwundeten und nicht verwundeten Pflanzen durchgeführt worden. Es ließ sich durchweg an der Blattspitze eine höhere Nicotinkonzentration beobachten als am Blattgrund. Das Muster der Nicotinverteilung in Abhängigkeit der Verwundung war bei den beiden Ernährungen nicht vergleichbar. Während bei der mangelernährten Pflanze der insgesamt höchste Nicotingehalt in der unverwundeten Pflanze vorhanden ist, trifft dies bei der normalen Ernährung für die Pflanze am fünften Tag nach der Verwundung zu. Bei diesen Ergebnissen war im Vergleich zu denen der Einzelzellbeprobung auffällig, dass nicht der Effekt auftrat, dass in den jungen Blättern mehr Nicotin vorhanden war als in den ausgewachsenen Blättern. Es ist jedoch nahe liegend, diesen

Unterschied auf die Unterschiedlichkeit der Proben zurück zu führen. Bei den Stanzlingproben handelt es sich nämlich um einen Durchschnitt des Nicotingehalts über alle Gewebeschichten, wobei sowohl Zellwandmaterial als auch apoplastische Flüssigkeit mit bestimmt wurden. Da Nicotin jedoch ausnahmslos in der Vakuole enthalten ist, könnten die anderen Zellbestandteile eine Verdünnung der Proben zur Folge gehabt haben.

Gerade der Vergleich dieser Ergebnisse der beiden Methoden zeigt wiederum die Stärke der Einzelzellbeprobung, denn ohne deren Ergebnisse wären die teilweise eklatanten Konzentrationsunterschiede in der Nicotinverteilung nicht darstellbar gewesen.

Bestimmung anderer Tabakalkaloide mit der CE-MS

Die Untersuchungen von Einzelzellproben und Stanzlingen mit dem CE-MS zeigten, dass neben den bereits bestimmten Alkaloiden noch weitere Alkaloide in der Tabakpflanze mit der CE-MS nachweisbar sind. Da für die CE-MS Kopplung leider kein Mikroinjektionssystem vorhanden war, mussten mehrere Einzelzellproben gepoolt werden, um überhaupt etwas nachweisen zu können. Diese Messungen waren als Screening nach anderen Tabakalkaloiden gedacht und damit nicht auf eine quantitative, sondern auf eine qualitative Auswertung ausgerichtet. So zeigte sich, dass in den Proben aus den Geweben kein Nicotin nachgewiesen werden konnte. Um hier genauere Aussagen über Unterschiede zwischen Alkaloidvorkommen in normal oder mangelernährten, verwundeten oder nicht verwundeten Pflanzen treffen zu können, wäre eine Optimierung der Methode, des Geräteaufbaus und eine weitere Absicherung der Identifizierung wie beispielsweise mit Standardsubstanzen notwendig, welches aber im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr angedacht war.

6 Literaturverzeichnis

- Aebersold, R., Morrison, H. D. (1990). Analysis of Dilute Peptide Samples by Capillary Zone Electrophoresis. *Journal of Chromatography* 516, 79-88.
- Arentoft, A. M., Michaelsen, S., Sorensen, H. (1993). Determination of oligosaccharides by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography* 652, 517-524,
- Arlt, K., Brandt, S., Kehr, J. (2001). Amino acid analysis in five pooled single plant cell samples using capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence detection. *J.Chromatogr.A* 926, 319-325.
- Baldwin, I. T. (1989). Mechanism of damage-induced alkaloid production in wild tobacco. *Journal of Chemical Ecology* 15, 1661-1680
- Baldwin, I., Karb, M. J. (1995). Plasticity in allocation of nicotine to reproductive parts in *Nicotiana attenuata*. *Journal of Chemical Ecology* 21, 897-909
- Baldwin, I., Karb, M. J., Ohnmeiss, T. E. (1994a). Allocation of ¹⁵N nitrate to nicotine: production and turnover of a damage-induced mobile defense. *Ecology* 75, 1703-1713.
- Baldwin, I., Ohnmeiss, T. E. (1994b). Swords into plowshares? *Nicotiana sylvestris* does not use nicotine as a nitrogen source under nitrogen-limited growth. *Oecologia* 98, 385-392.
- Baldwin, I. T. (1988). Damage-Induced Alkaloids in Tobacco - Pot-Bound Plants Are Not Inducible. *Journal of Chemical Ecology* 14, 1113-1120.
- Baldwin, I. T., Hamilton, W. (2000a). Jasmonate-induced responses of *Nicotiana sylvestris* results in fitness costs due to impaired competitive ability for nitrogen. *Journal of Chemical Ecology* 26, 915-952.
- Baldwin, I. T., Ohnmeiss, T. E. (1994c). Coordination of Photosynthetic and Alkaloidal Responses to Damage in Uninducible and Inducible *Nicotiana-Sylvestris*. *Ecology* 75, 1003-1014.

- Baldwin, I. T., Sims, C. L., Kean, S. E. (1990). The reproductive consequences associated with inducible alkaloidal responses in wild tobacco. *Ecology* 71, 252-262
- Bazzanella, A., Lochmann, H., Tomos, A. D., Bächmann, K. (1998a). Determination of inorganic cations and anions in single plant cells by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 809, 231-239.
- Bean, S., R., Lookhart, G., L. (2000). Ultrafast capillary electrophoretic analysis of cereal storage proteins and its application to protein characterization and cultivar differentiation. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 48, 344-353
- Bergquist, J., Tarkowski, A., Ekman, R., Ewing, A. (1994). Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12912-12916
- Bianco, G., Schmitt-Kopplin, Ph., De Benedetto, G., Kettrup, A., Cataldi, T. R. I. (2002). Determination of glycoalkaloids and relative aglycones by nonaqueous capillary electrophoresis coupled with electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Electrophoresis* 23, 2904-2912
- Bianco, G., Schmitt-Kopplin, Ph., Crescenzi, A., Comes, S., Kettrup, A., Cataldi, T. R. I. (2003). Evaluation of glycoalkaloids in tubers of genetically modified virus Y-resistant potato plants (var. Désirée) by non-aqueous capillary electrophoresis coupled with electrospray ionization mass spectrometry (NACE-ESI-MS). *Analytical Bioanalytical Chemistry* 375, 799-804
- Bringmann, G., Kajahn, I., Neusüß, C., Pelzing, M., Laug, S., Unger, M., Holzgrabe, U. (2005). Analysis of the glucosinolate pattern of *Arabidopsis thaliana* seeds by capillary zone electrophoresis coupled to electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* 26, 1513-1522
- Burton, H. R., Dey, N. K., Bush, L. P. (1992). Distribution of tobacco constituents in tobacco leaf tissue. 1. tobacco-specific nitosamines, nitrate, nitrite, and alkaloids. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 40, 1050-1055
- Campa, C., Schmitt-Kopplin, Ph., Cataldi, T. R. I., Bufo, S. A., Freitag, D., Kettrup, A. (2000). Analysis of cyanogenic glycosides by micellar capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B* 739, 95-100

- Chen, F. T. A., Liu, C. M., Hsieh, Y. Z., Sternberg, J. C. (1991). Capillary Electrophoresis - A New Clinical Tool. *Clinical Chemistry* 37, 14-19.
- Chervet, J. P., Vansoest, R. E. J., Salzmann, J. P. (1992a). Recent Advances in Capillary Liquid-Chromatography - Enhanced Detectability in Bioanalysis. *Lc Gc-Magazine of Separation Science* 10, 866-&.
- Chiari, M., Nesi, M., Carrea, G., Righetti, P. G. (1993). Determination of Total Vitamin-C in Fruits by Capillary Zone Electrophoresis. *Journal of Chromatography* 645, 197-200.
- Chien, R. L., Burgi, D. S. (1992). On-Column Sample Concentration Using Field Amplification in Cze. *Analytical Chemistry* 64, A489-A496.
- Cole, R. B. (1997). Electrospray Ionization Mass Spectrometry. In: *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, ed. R. B. Cole New York: John Wiley & Sons.
- Cordell, G. A., Southon, W., Buckingham, J., (1989). *Dictionary of Alkaloids*, ed. Chapman and Hall New York
- Cruz, L., Moroz, L. L., Gilette, R., Sweedler, J., (1997). Nitrite and nitrate levels in individual molluscan neurons: single-cell capillary electrophoresis. *Journal of Neurochemistry* 69, 110-115
- Dawson, R.F. (1951). Alkaloid Biogenesis .3. Specificity of the Nicotine Nornicotine Conversion. *Journal of the American Chemical Society* 73, 4218-4221.
- Dawson, R. F., Christman, D. R., Dadamo, A., Solt, M. L., Wolf, A. P. (1960a). The Biosynthesis of Nicotine from Isotopically Labeled Nicotinic Acids. *Journal of the American Chemical Society* 82, 2628-2633.
- Dawson, R. F., Christman, D. R., Solt, M. L., Wolf, A. P. (1960b). The Biosynthesis of Nicotine from Nicotinic Acid - Chemical and Radiochemical Yields. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 91, 144-150.
- Day, D. A., Jenkins, C. L. D., Hatch, M. D. (1981). Isolation and Properties of Functional Mesophyll Protoplasts and Chloroplasts from Zea-Mays. *Australian Journal of Plant Physiology* 8, 21-29.

Dewey, L. J., Byerrum, R. U., Ball, C. D. (1955). The Biosynthesis of the Pyrrolidine Ring of Nicotine. *Biochimica et Biophysica Acta* 18, 141-142.

Diaz-Pollan, C., Vidal-Valverde, C. (1998). Niacin determination in legumes by capillary electrophoresis (CE) in comparison with high performance liquid chromatography (HPLC). *Journal High Resolution Chromatography* 21, 81-86

Dietz, K. J., Schramm, M., Betz, M., Busch, H., Durr, C., Martinoia, E. (1992a). Characterization of the Epidermis from Barley Primary Leaves .1. Isolation of Epidermal Protoplasts. *Planta* 187, 425-430.

Dietz, K. J., Schramm, M., Lang, B., Lanzlschramm, A., Durr, C., Martinoia, E. (1992b). Characterization of the Epidermis from Barley Primary Leaves .2. The Role of the Epidermis in Ion Compartmentation. *Planta* 187, 431-437.

Duffey, S. S. (1986). *Insects and the Plant Surface*. London: Edward Arnold Ltd.

Eckerskorn, C. (1998). Massenspektrometrie. In: *Bioanalytik*, ed. F. Lotteich, H.ZorbasHeidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 323-368.

Edwards, J., Coruzzi, G. (1990). Cell-specific gene expression in plants. *Ann.Rev.Genet.* 24, 275-303.

Ewing, A. G., Wallingford, R. A., Curry, P. D. (1988). Chemical-Analysis of Single Cells with Capillary Zone Electrophoresis. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 196, 177-ANYL.

Fahn, A. (1988). Secretory-Tissues in Vascular Plants. *New Phytologist* 108, 229-257.

Felle, H., Bertl, A. (1986). The Fabrication of H⁺-Selective Liquid-Membrane Microelectrodes for Use in Plant-Cells. *Journal of Experimental Botany* 37, 1416-1428.

Fenn, J. B. Electrospray wings for molecular elephants. Nobel Lecture. 154-184. 2002. Nobel Lecture.

Ref Type: Report

Floyd, P. D., Moroz, L. L., Gilette, R., Sweedler, J., V. (1998). CE analysis of nitric oxide synthase related metabolites in single identified neurons. *Analytical Chemistry* 70, 2243-2247

- Fricke, W., Hinde, P. S., Leigh, R. A., Tomos, A. D. (1995). Vacuolar Solutes in the Upper Epidermis of Barley Leaves - Intercellular Differences Follow Patterns. *Planta* 196, 40-49.
- Fricke, W., Leigh, R. A., Tomos, A. D. (1994a). Concentrations of Inorganic and Organic Solutes in Extracts from Individual Epidermal, Mesophyll and Bundle-Sheath Cells of Barley Leaves. *Planta* 192, 310-316.
- Fricke, W., Leigh, R. A., Tomos, A. D. (1994b). Epidermal Solute Concentrations and Osmolality in Barley Leaves Studied at the Single-Cell Level - Changes Along the Leaf Blade, During Leaf Aging and NaCl Stress. *Planta* 192, 317-323.
- Fricke, W., Leigh, R. A., Tomos, D. (1993a). Solute Compartmentation Between Mesophyll, Bundle Sheath and Epidermal-Cells of Barley Leaves. *Plant Physiology* 102, 33.
- Fricke, W., Pritchard, J., Leigh, R. A., Tomos, A. D. (1994b). Cells of the Upper and Lower Epidermis of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Leaves Exhibit Distinct Patterns of Vacuolar Solutes. *Plant Physiol* 104, 1201-1208.
- Friesen, J. B., Leete, E. (1990). Biosynthesis of the Tobacco Alkaloids and Related-Compounds .52. Nicotine Synthase - An Enzyme from *Nicotiana* Species Which Catalyzes the Formation of (S)-Nicotine from Nicotinic-Acid and 1-Methyl-Delta'-Pyrrolinium Chloride. *Tetrahedron Letters* 31, 6295-6298.
- Gawron, A., Martin, S., Lunte, S. (2001). Microchip electrophoretic separation systems for biomedical and pharmaceutical analysis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 14, 1-12.
- Gershenzon, J. (1993). The Cost of Plant Chemical Defense Against Herbivory: a Biochemical Perspective. In: *Insect-Plant Interactions*, ed. E.A.Bernays CRC Press, 105-173.
- Giersch, C., Heber, U., Kaiser, G., Walker, D. A., Robinson, S. P. (1980). Intracellular Metabolite Gradients and Flow of Carbon During Photosynthesis of Leaf Protoplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 205, 246-259.
- Gilman, S. D., Ewing, A. G. (1995). Analysis of single cells by capillary electrophoresis with on-column derivatization and laser-induced fluorescence detection. *Analytical Chemistry* 67, 58-64

- Harms, J., Schwedt, G. (1994). Applications of capillary electrophoresis in element speciation analysis of plant and food extracts. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 350, 93-100
- Harvey, D. M. R., Thorpe, J. R. (1986). Some Observations on the Effects of Salinity on Ion Distributions and Cell Ultrastructure in Wheat Leaf Mesophyll-Cells. *Journal of Experimental Botany* 37, 1-7.
- Heldt, H. W. (1999). *Pflanzenbiochemie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Hermes, D. A., Mattson, W. J. (1992). The Dilemma of Plants - to Grow Or Defend. *Quarterly Review of Biology* 67, 283-335.
- Huang, C. X., Vansteveninck, R. F. M. (1989). Maintenance of Low Cl⁻ Concentrations in Mesophyll-Cells of Leaf Blades of Barley Seedlings Exposed to Salt Stress. *Plant Physiology* 90, 1440-1443.
- Hogan, B. L., Yeung E. S. (1992). Determination of intracellular species at the level of a single erythrocyte via capillary electrophoresis with direct and indirect fluorescence detection. *Analytical Chemistry* 64, 2841-2845
- Ingestad, T. (1979). Definition of Optimum Nutrient-Requirements in Birch Seedlings .3. Influence of Ph and Temperature of Nutrient Solution. *Physiologia Plantarum* 46, 31-35.
- Ingestad, T. (1982). Relative Addition Rate and External Concentration - Driving Variables Used in Plant Nutrition Research. *Plant Cell and Environment* 5, 443-453.
- Iribarne, J. V., Thomson, B. A. (1976). Evaporation of Small Ions from Charged Droplets. *Journal of Chemical Physics* 64, 2287-2294.
- JACKANIC.TM, Byerrum, R. U. (1966). Incorporation of Aspartate and Malate Into Pyridine Ring of Nicotine. *Journal of Biological Chemistry* 241, 1296-&.
- Jackson, D. M., Daneshmandi, D. A. (1996). Nicotiana Leaf Surface Components and Their Effects on Insect Pests and Disease. In: *Plant Cuticles: An Integrated Functional Approach*, ed. G.KerstiensOxford, England, UK: BIOS Scientific Publishers, 231-254.
- Jacobsen, O. (1882). In: *Handwörterbuch der Chemie*, ed. A.LadenburgBreslau: Verlag E. Trewendt, 213.

- Jiang, T., F., Ou, Q., Y., Shi, Y., P. (2003). Separation and determination of phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis* species by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 986, 163-167
- Jimidar, M., Hamoir, T. P., Foriers, A., Massart, D. L. (1993). Comparison of Capillary Zone Electrophoresis with High-Performance Liquid-Chromatography for the Determination of Additives in Foodstuffs. *Journal of Chromatography* 636, 179-186.
- Johnson, A. W., Severson, R. F. (1982). Physical and chemical leaf surface characteristics of aphid resistant and susceptible tobacco. *Tobacco Science* 26, 98-102.
- Johnson, A. W., Severson, R. F., Jackson, D. M. (1992). Sources of resistance to insect pests of tobacco. *CORESTA Info Bull.* 3/4, 151-175.
- Johnson, A. W., Sisson, V. A., Snook, M. E., Fortnum, B. A., Jackson, D. M. (2002). Aphid resistance and leaf surface chemistry of sugar ester producing tobaccos. *Journal of Entomological Science* 37, 154-165.
- Kaiser, G., Martinoia, E., Wiemken, A. (1982). Rapid Appearance of Photosynthetic Products in the Vacuoles Isolated from Barley Mesophyll Protoplasts by A New Fast Method. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 107, 103-113.
- Kebarle, P., Tang, L. (1993). From Ions in Solution to Ions in the Gas-Phase - the Mechanism of Electrospray Mass-Spectrometry. *Analytical Chemistry* 65, A972-A986.
- Kehr, J., Hustiak, F., Walz, C., Willmitzer, L., Fisahn, J. (1998). Transgenic plants changed in carbon allocation pattern display a shift in diurnal growth pattern. *Plant J.* 16, 497-503.
- Kehr, J., Wagner, C., Willmitzer, L., Fisahn, J. (1999). Effect of modified carbon allocation on turgor, osmolality, sugar and potassium content, and membrane potential in the epidermis of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) plants. *Journal of Experimental Botany* 50, 565-571.
- Kisaki, T., Tamaki, E. (1966). Phytochemical Studies on Tobacco Alkaloids .X. Degradation of Tobacco Alkaloids and Their Optical Rotatory Changes in Tobacco Plants. *Phytochemistry* 5, 293-&.

- Koroleva, O. A., Farrar, J. F., Tomos, A. D., Pollock, C. J. (1997). Patterns of solute in individual mesophyll, bundle sheath and epidermal cells of barley leaves induced to accumulate carbohydrate. *New Phytologist* 136, 97-104.
- La, S., Kim, A., Kim, J. H., Choi, O. K., Kim, K. R. (2002). Profiling and screening analysis of 27 aromatic amino acids by capillary electrophoresis in dual modes. *Electrophoresis* 23, 1080-1089
- Lacher, N., Garrison, K., Martin, S., Lunte, S. (2001). Microchip capillary electrophoresis/electrochemistry. *Electrophoresis* 22, 2526-2536.
- Lee, T.T., Yeung, E.S. (1992). Quantitative determination of native proteins in individual human erythrocytes by capillary zone electrophoresis with laser -induced fluorescence detection. *Analytical Chemistry* 64, 3045-51
- Leete, E. (1955). The Biogenesis of Nicotine. *Chemistry & Industry* 537.
- Leete, E. (1977). Biosynthesis and Metabolism of the Tobacco Alkaloids. *Recent Adv.Chem.Comp.Tob.Smoke* 365-388.
- Leete, E., Chedekel, M. R. (1972). Aberrant Syntheses in Higher-Plants .2. Aberrant Formation of (-)-N-Methylanabasine from N-Methyl-Delta-1 Piperideinium Chloride in *Nicotiana-Tabacum* and *N-Glauca*. *Phytochemistry* 11, 2751-&.
- Leete, E., Chedekel, M. R. (1974). Metabolism of Nicotine in *Nicotiana-Glauca*. *Phytochemistry* 13, 1853-1859.
- Lehmann, W. D. (1996). Massenspektrometrie Der Biochemie. In: *Massenspektrometrie der Biochemie* Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Lehmann, W.-D. (1991). Physikalische Methoden in der Chemie: Massenspektrometrie. *Chemie in unserer Zeit* 6, 308-316.
- Leigh, R. A., Chater, M., Storey, R., Johnston, A. E. (1986). Accumulation and subcellular distribution of cations in relation to the growth of potassium-deficient barley. *Plant, Cell and Environment* 9, 595-604.
- Leigh, R. A., Storey, R. (1993). Intercellular compartmentation of ions in barley leaves in relation to potassium nutrition and salinity. *Journal of Experimental Botany* 44, 755-762.

- Liu, Y. M., Sheu, S. J. (1994). Determination of the 6 major flavonoids in scutellariae radix by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta* 288, 221-226
- Lochmann, H., Bazzanella, A., Bächmann, K. (1998). Analysis of solutes and metabolites in single plant cell vacuoles by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 817, 337-343.
- Lochmann, H., Bazzanella, A., Kropsch, S., Bächmann, K. (2001). Determination of tobacco alkaloids in single plant cells by capillary electrophoresis. *J.Chromatogr.A* 917, 311-317.
- Lookhart, G., L., Bean, S., R., Jones, B., L. (1999). Separation and characterization of barley (*Hordeum vulgare* L.) hordeins by free zone capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 20, 1605-1612
- Lunte, C. E., Scott, D. O., Kissinger, P. T. (1991). Sampling Living Systems Using Microdialysis Probes. *Analytical Chemistry* 63, A773-&.
- Lunte, S. M., Oshea, T. J. (1994). Pharmaceutical and Biomedical Applications of Capillary Electrophoresis/Electrochemistry. *Electrophoresis* 15, 79-86.
- Mateus, L., Cherkaoui, S., Christen, P., Veuthey, J., L. (1998). Capillary electrophoresis for the analysis of tropane alkaloids: pharmaceutical and phytochemical applications. *Journal of Biomedical Analysis* 18, 815-125
- Meyberg, M., Krohn, S., Brummer, B., Kristen, U. (1991). Ultrastructure and Secretion of Glandular Trichomes of Tobacco-Leaves. *Flora* 185, 357-363.
- Mikell, J. R., Ganzera, M., Khan, I. A., (2001). Analysis of sesquiterpenes in *Valeriana officinalis* by capillary electrophoresis. *Pharmazie* 56, 946-948
- Morin, P., Dreux, M. (1993). Factors influencing the separation of ionic and nonionic chemical natural compounds in plant-extracts by capillary electrophoresis. *Journal of Liquid Chromatography* 16, 3735-3755
- Mounicou, S., Vacchina, V., Szpunar, J., Potin-Gautier, M., Lobinski, R. (2001). Determination of phytochelatin by capillary zone electrophoresis with electrospray tandem mass spectrometry detection (CZE-ES MS/MS). *Analyst* 126, 624-632

- Nishimura, N., Zhang, J., Abo, M., Okubo, A., Yamazaki, S. (2001). Application of capillary electrophoresis to the simultaneous determination of betaines in plants. *Analytical Sciences* 1, 103-106
- Nultsch, W. (2001). *Allgemeine Botanik*. Thieme Verlag 11.Auflage
- Ochocka, R. J., Rajzer, D., Kowalski, P., Lamparczyk, H. (1995). Determination of coumarins from *chrysanthemum-segetum* L by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 709, 197-202
- Ohnmeiss, T. E., Baldwin, I. T. (2000). Optimal defense theory predicts the ontogeny of an induced nicotine defense. *Ecology* 81, 1765-1783
- Olefirowicz, T. M., Ewing, A. G. (1990a). Capillary electrophoresis in 2 and 5 microns diameter capillaries: application to cytoplasmic analysis. *Analytical Chemistry* 62, 1872-1876.
- Olefirowicz, T. M., Ewing, A. G. (1990b). Dopamine concentration in the cytoplasmic compartment of single neurons determined by capillary electrophoresis. *J.Neurosci.Methods* 34, 11-15.
- Olefirowicz, T. M., Ewing, A. G. (1991). Capillary Electrophoresis for Sampling Single Nerve-Cells. *Chimia* 45, 106-108.
- Pritchard, J., Fricke, W., Tomos, A. D. (1996). Turgor-regulation during extension growth and osmotic stress of maize roots. An example of single-cell mapping. *Plant and Soil* 187, 11-21.
- Rabel, S. R., Stobaugh, J. F. (1993). Applications of Capillary Electrophoresis in Pharmaceutical Analysis. *Pharmaceutical Research* 10, 171-186.
- Rozan, P., Kuo, Y. H., Lambein, F. (2001). Amino acids and seedlings of the genus *Lens*. *Phytochemistry* 58, 281-289
- Saitoh, F., Noma, M., Kawashima, N. (1985). The Alkaloid Contents of 60 *Nicotiana* Species. *Phytochemistry* 24, 477-480.
- Schmitt-Kopplin, P., Frommberger, M. (2003). Capillary electrophoresis-mass spectrometry: 15 years of developments and applications. *Electrophoresis* 24, 3837-3867.

- Schultz, N. M., Huang, L., Kennedy, R. T. (1995). Capillary Electrophoresis Based Immunoassay to Determine Insulin Content and Insulin-Secretion from Single Islets of Langerhans. *Analytical Chemistry* 67, 924-929.
- Scocir, E., Prosek, M., Strazisar, M., Golob, T., Plestenjak, A. M. (1997). Quantitative determination of some amino acids in maize seed and seaweed by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Microcolumn Separations* 9, 451-457
- Severson, R. F., Arrendale, R. F., Chortyk, O. T., Green, C. R., Thome, F. A., Stewart, J. L., Johnson, A. W. (1985). Isolation and Characterization of the Sucrose Esters of the Cuticular Waxes of Green Tobacco Leaf. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33, 870-875.
- Severson, R. F., Eckel, R. V. W., Jackson, D. M., Sisson, V. A., Stephenson, M. G. (1994a). Aphicidal Activity of Cuticular Components from *Nicotiana-Tabacum*. *Natural and Engineered Pest Management Agents* 551, 172-179.
- Shaner, L. M., Brown, P. R. (2000). Single cell analysis using capillary electrophoresis. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 23, 975-997
- Shapiro, A. D., Gutsche, A. T., (2003). Capillary electrophoresis-based profiling and quantitation of total salicylic acid and related phenolics for analysis of early signaling in *Arabidopsis* disease resistance. *Analytical Biochemistry* 320, 223-233
- Shihabi, Z. K. (1992). Clinical-Applications of Capillary Electrophoresis. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 22, 398-405.
- Steuer, W., Grant, I., Erni, F. (1990). Comparison of High-Performance Liquid-Chromatography, Supercritical Fluid Chromatography and Capillary Zone Electrophoresis in Drug Analysis. *Journal of Chromatography* 507, 125-140.
- Stöckigt, J., Sheludko, Y., Unger, M., Gerasimenko, I., Warzecha, H., Stöckigt, D. (2002). High-performance liquid chromatography, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic-electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Journal of Chromatography A* 967, 85-113
- Tenberken, B., Bächmann, K. (1997). Development of new methods for the analysis of single cloud-, fog- and raindrops by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 775, 372-377.

- Tenberken, B., Ebert, P., Hartmann, M., Kibler, M., Mainka, A., Prokop, T., Roder, A., Bächmann, K. (1996). Analysis of single raindrops in the nl range by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 745, 209-215.
- Tomlinson, A. J., Guzman, N. A., Naylor, S. (1995). Enhancement of concentration limits of detection in CE and CE-MS: a review of on-line sample extraction, cleanup, analyte preconcentration, and microreactor technology. *Journal Capillary Electrophor.* 2, 247-266.
- Tomos, A. D., Sharrock, R. A. (2001). Cell sampling and analysis (SiCSA): metabolites measured at single cell resolution. *Journal of Experimental Botany* 52, 623-630.
- Wagner, G. J. (1991). Secreting Glandular Trichomes - More Than Just Hairs. *Plant Physiology* 96, 675-679.
- Wagner, G. J., Wang, E. (2001). Exploiting the ooze: engineering surface secretion systems of plants. Secretion systems of plants may be molecular farming and pest/disease resistance factories of the future. *AgBiotechNet* 3, 1-3.
- Wagner, G. J., Wang, E., Shepherd, R. W. (2004b). New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany* 93, 3-11.
- Walker, D. J., Smith, S. J., Miller, A. J. (1995). Simultaneous Measurement of Intracellular Ph and K⁺ Or NO₃⁻ in Barley Root-Cells Using Triple-Barreled, Ion-Selective Microelectrodes. *Plant Physiology* 108, 743-751.
- Wallingford, R. A., Ewing, A. G. (1988). Capillary Zone Electrophoresis with Electrochemical Detection in 12.7- μ m Diameter Columns. *Analytical Chemistry* 60, 1972-1975.
- Wang, E. M., Hall, J. T., Wagner, G. J. (2004). Transgenic *Nicotiana Tabacum* L. with enhanced trichome exudate cembratrieneols has reduced aphid infestation in the field. *Molecular Breeding* 13, 49-57.
- Wang, Z. Y., Kelly, J. M., Kovar, J. L. (2004). In situ dynamics of phosphorus in the rhizosphere solution of five species. *Journal of Environmental Qual.* 33, 1387-1392
- Whitehouse, C. M., Dreyer, R. N., Yamashita, M., Fenn, J. B. (1985). Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers. *Analytical Chemistry* 57, 675-679.

- Williams, M. L., Thomas, B. J., Farrar, J. F., Pollock, C. J. (1993a). Visualizing the Distribution of Elements Within Barley Leaves by Energy-Dispersive X-Ray Image Maps (Edx Maps). *New Phytologist* 125, 367-372.
- Williams, P. E., Marino, M. A., Delrio, S. A., Turni, L. A., Devaney, J. M. (1994). Analysis of DNA restriction fragments and polymerase chain-reaction products by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 680, 525-540
- Williams, S. J., Goodall, D. M., Evans, K. P. (1993b). Analysis of Anthraquinone Sulfonates - Comparison of Capillary Electrophoresis with High-Performance Liquid-Chromatography. *Journal of Chromatography* 629, 379-384.
- Wyn Jones, R. G., Brady, C. J., Speirs, J. (1979). Ionic and Osmotic Relations in Plant Cells. In: *Recent advances in the biochemistry of cereals*, ed. D.L.Laidman, R.G.Wyn Jones London, New York, San Francisco: Academic Press, 63-103.
- Xiao, Y. X., Feng, Y. P., Da, S. L., Yeung, E. S. (2004). Progress in single-cell analysis by capillary electrophoresis. *Progress in Chemistry* 16, 543-553
- Xu, J., Chen, Z., Yu, J. C., Tan, C. (2002). Simultaneous determination of inorganic anions, carboxylic and aromatic carboxylic acids by capillary zone electrophoresis with direct UV detection. *Journal of Chromatography A* 942, 289-294
- Xue, Q., Yeung, E. S. (1994a). Variability of intracellular lactate dehydrogenase isoenzymes in single human erythrocytes. *Analytical Chemistry* 66, 1175-1178
- Xue, Q., Yeung, E. S. (1994b). Indirect fluorescence determination of lactate and pyruvate in single erythrocytes by capillary electrophoresis. *Journal Chromatography A* 661, 287-295
- Yamashita, M., Fenn, J. B. (1984). Electrospray Ion-Source - Another Variation on the Free-Jet Theme. *Journal of Physical Chemistry* 88, 4451-4459.
- Yang, K. S., Gholson, R. K., Waller, G. R. (1965). Studies on Nicotine Biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* 87, 4184-&.
- Yang, S. S., Smetena, I., Goldsmith, A. I. (1996). Evaluation of micellar electrokinetic capillary chromatography for the analysis of selected tobacco alkaloids. *Journal of Chromatography A* 746, 131-136

- Yi, C., Huang, D., Gratzl, M. (1996). Complexometric determination of metal ions by microscopic diffusional titration. *Analytical Chemistry* 68, 1580-1584
- Yoshida, D. (1969a). Effect of Agmatine on Putrescine Formation in Tobacco Plants. *Plant and Cell Physiology* 10, 923-&.
- Yoshida, D. (1969b). Formation of Putrescine from Ornithine and Arginine in Tobacco Plants. *Plant and Cell Physiology* 10, 393-&.
- Yoshida, D., Mitake, T. (1966). Agmatine and N-Carbamylputrescine As Intermediates in Formation of Nicotine by Tobacco Plants. *Plant and Cell Physiology* 7, 301-&.
- Zhang, L. L., Yeung, E. S. (1996). Postcolumn reactor in capillary electrophoresis for laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography* 734, 331-337
- Zhen, R. G., Koyro, H. W., Leigh, R. A., Tomos, A. D., Miller, A. J. (1991). Compartmental Nitrate Concentrations in Barley Root-Cells Measured with Nitrate-Selective Microelectrodes and by Single-Cell Sap Sampling. *Planta* 185, 356-361.
- Zhou, J., Heckert, D. M., Zuo, H. (1999). On-line coupling of in vivo microdialysis with capillary electrophoresis/electrochemistry. *Analytica Chimica Acta* 379 307-317.
- Zabzdyr, J. L., Lillard, S. J. (2001). New approaches to single-cell analysis by capillary electrophoresis. *Trac-trends in Analytical Chemistry* 20, 467-476

Danke...

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Philippe Schmitt-Kopplin für die Betreuung meiner Arbeit, seine ständige Diskussionsbereitschaft und sein großes Interesse an dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Schurr bedanke ich mich ganz herzlich für die ansprechende Themenstellung und die Bereitschaft zu wissenschaftlicher Diskussion sowie für die Unterstützung der Kooperationen mit anderen Arbeitsgruppen.

Ich danke Herrn PD Dr. Philippe Schmitt-Kopplin und Herrn Prof. Dr. Ulrich Schurr für die sehr gute Zusammenarbeit zwischen der GSF und dem Forschungszentrum Jülich.

Herrn Prof. Dr. Goettlein danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes sowie Herrn Prof. Dr. Dr. Kettrup für die Übernahme des zweiten Prüfers.

Dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Knut Bächmann an der Technischen Universität Darmstadt danke ich für die Einarbeitung in die Einzelzellanalytik.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Björn Thiele für seine praktischen und fachlichen Ratschläge und Hilfestellungen sowie für die große Unterstützung während meiner gesamten Zeit am Forschungszentrum Jülich.

Danke sage ich auch an Dr. Hinrich Lühring für seine Hilfsbereitschaft und wertvolle Anregungen beim Aufbau der Einzelzellanalytik.

Herrn Dr. Walter Schröder danke ich für die Mithilfe bei der Erstellung der Aufnahmen mit dem Elektronenmikroskop.

Für die gute Zusammenarbeit im Bereich der CE-MS Messungen möchte ich mich bei Moritz Frommberger von der GSF bedanken.

Bei Beate Uhlig und Andrea Neuwohner bedanke ich mich für Unterstützung bei der Pflanzenanzucht.

Herrn Prof. Dr. Klaus Günther danke ich für die zeitweise Betreuung meiner Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mir dies alles ermöglicht und mich bei allen Entscheidungen unterstützt haben.

1. **Energiemodelle in der Bundesrepublik Deutschland. Stand der Entwicklung**
IKARUS-Workshop vom 24. bis 25. Januar 1996
herausgegeben von S. Molt, U. Fahl (1997), 292 Seiten
ISBN: 3-89336-205-3
2. **Ausbau erneuerbarer Energiequellen in der Stromwirtschaft**
Ein Beitrag zum Klimaschutz
Workshop am 19. Februar 1997, veranstaltet von der Forschungszentrum Jülich GmbH und der Deutschen Physikalischen Gesellschaft
herausgegeben von J.-Fr. Hake, K. Schultze (1997), 138 Seiten
ISBN: 3-89336-206-1
3. **Modellinstrumente für CO₂-Minderungsstrategien**
IKARUS-Workshop vom 14. bis 15. April 1997
herausgegeben von J.-Fr. Hake, P. Markewitz (1997), 284 Seiten
ISBN: 3-89336-207-X
4. **IKARUS-Datenbank - Ein Informationssystem zur technischen, wirtschaftlichen und umweltrelevanten Bewertung von Energietechniken**
IKARUS. Instrumente für Klimagas-Reduktionsstrategien
Abschlußbericht Teilprojekt 2 „Datenbank“
H.-J. Laue, K.-H. Weber, J. W. Tepel (1997), 90 Seiten
ISBN: 3-89336-214-2
5. **Politiksznarien für den Klimaschutz**
Untersuchungen im Auftrag des Umweltbundesamtes
Band 1. Szenarien und Maßnahmen zur Minderung von CO₂-Emissionen in Deutschland bis zum Jahre 2005
herausgegeben von G. Stein, B. Strobel (1997), 410 Seiten
ISBN: 3-89336-215-0
6. **Politiksznarien für den Klimaschutz**
Untersuchungen im Auftrag des Umweltbundesamtes
Band 2. Emissionsminderungsmaßnahmen für Treibhausgase, ausgenommen energiebedingtes CO₂
herausgegeben von G. Stein, B. Strobel (1997), 110 Seiten
ISBN: 3-89336-216-9
7. **Modelle für die Analyse energiebedingter Klimagasreduktionsstrategien**
IKARUS. Instrumente für Klimagas-Reduktionsstrategien
Abschlußbericht Teilprojekt 1 „Modelle“
P. Markewitz, R. Heckler, Ch. Holzapfel, W. Kuckshinrichs, D. Martinsen, M. Walbeck, J.-Fr. Hake (1998), VI, 276 Seiten
ISBN: 3-89336-220-7

8. **Politiksznarien für den Klimaschutz**
Untersuchungen im Auftrag des Umweltbundesamtes
Band 3. Methodik-Leitfaden für die Wirkungsabschätzung von Maßnahmen zur Emissionsminderung
herausgegeben von G. Stein, B. Strobel (1998), VIII, 95 Seiten
ISBN: 3-89336-222-3
9. **Horizonte 2000**
6. Wolfgang-Ostwald-Kolloquium der Kolloid-Gesellschaft
3. Nachwuchstage der Kolloid- und Grenzflächenforschung
Kurzfassungen der Vorträge und Poster
zusammengestellt von F.-H. Haegel, H. Lewandowski, B. KrahI-Urban (1998),
150 Seiten
ISBN: 3-89336-223-1
10. **Windenergieanlagen - Nutzung, Akzeptanz und Entsorgung**
von M. Kleemann, F. van Erp, R. Kehrbäum (1998), 59 Seiten
ISBN: 3-89336-224-X
11. **Policy Scenarios for Climate Protection**
Study on Behalf of the Federal Environmental Agency
Volume 4. Methodological Guideline for Assessing the Impact of Measures for Emission Mitigation
edited by G. Stein, B. Strobel (1998), 103 pages
ISBN: 3-89336-232-0
12. **Der Landschaftswasserhaushalt im Flußeinzugsgebiet der Elbe**
Verfahren, Datengrundlagen und Bilanzgrößen
Analyse von Wasserhaushalt, Verweilzeiten und Grundwassermilieu im
Flußeinzugsgebiet der Elbe (Deutscher Teil). Abschlußbericht Teil 1.
von R. Kunkel, F. Wendland (1998), 110 Seiten
ISBN: 3-89336-233-9
13. **Das Nitratabbauvermögen im Grundwasser des Elbeeinzugsgebietes**
Analyse von Wasserhaushalt, Verweilzeiten und Grundwassermilieu im
Flußeinzugsgebiet der Elbe (Deutscher Teil). Abschlußbericht Teil 2.
von F. Wendland, R. Kunkel (1999), 166 Seiten
ISBN: 3-89336-236-3
14. **Treibhausgasminderung in Deutschland zwischen nationalen Zielen und internationalen Verpflichtungen**
IKARUS-Workshop am 27.05.1998, Wissenschaftszentrum Bonn-Bad
Godesberg. Proceedings
herausgegeben von E. Läge, P. Schaumann, U. Fahl (1999), ii, VI, 146 Seiten
ISBN: 3-89336-237-1

15. **Satellitenbildauswertung mit künstlichen Neuronalen Netzen zur Umweltüberwachung**
Vergleichende Bewertung konventioneller und Neuronaler Netzwerkalgorithmen und Entwicklung eines integrierten Verfahrens
von D. Klaus, M. J. Canty, A. Poth, M. Voß, I. Niemeyer und G. Stein (1999), VI, 160 Seiten
ISBN: 3-89336-242-8
16. **Volatile Organic Compounds in the Troposphere**
Proceedings of the Workshop on Volatile Organic Compounds in the Troposphere held in Jülich (Germany) from 27 – 31 October 1997
edited by R. Koppmann, D. H. Ehhalt (1999), 208 pages
ISBN: 3-89336-243-6
17. **CO₂-Reduktion und Beschäftigungseffekte im Wohnungssektor durch das CO₂-Minderungsprogramm der KfW**
Eine modellgestützte Wirkungsanalyse
von M. Kleemann, W. Kuckshinrichs, R. Heckler (1999), 29 Seiten
ISBN: 3-89336-244-4
18. **Symposium über die Nutzung der erneuerbaren Energiequellen Sonne und Wind auf Fischereischiffen und in Aquakulturbetrieben**
Symposium und Podiumsdiskussion, Izmir, Türkei, 28.-30.05.1998.
Konferenzbericht
herausgegeben von A. Özdamar, H.-G. Groehn, K. Ülgen (1999), IX, 245 Seiten
ISBN: 3-89336-247-9
19. **Das Weg-, Zeitverhalten des grundwasserbürtigen Abflusses im Elbeeinzugsgebiet**
Analyse von Wasserhaushalt, Verweilzeiten und Grundwassermilieu im Flußeinzugsgebiet der Elbe (Deutscher Teil). Abschlußbericht Teil 3.
von R. Kunkel, F. Wendland (1999), 122 Seiten
ISBN: 3-89336-249-5
20. **Politiksznarien für den Klimaschutz**
Untersuchungen im Auftrag des Umweltbundesamtes
Band 5. Szenarien und Maßnahmen zur Minderung von CO₂-Emissionen in Deutschland bis 2020
herausgegeben von G. Stein, B. Strobel (1999), XII, 201 Seiten
ISBN: 3-89336-251-7
21. **Klimaschutz durch energetische Sanierung von Gebäuden. Band 1**
von J.-F. Hake, M. Kleemann, G. Kolb (1999), 216 Seiten
ISBN: 3-89336-252-2

22. **Electroanalysis**
Abstracts of the 8th International Conference held from 11 to 15 June 2000 at the University of Bonn, Germany
edited by H. Emons, P. Ostapczuk (2000), ca. 300 pages
ISBN: 3-89336-261-4
23. **Die Entwicklung des Wärmemarktes für den Gebäudesektor bis 2050**
von M. Kleemann, R. Heckler, G. Kolb, M. Hille (2000), II, 94 Seiten
ISBN: 3-89336-262-2
24. **Grundlegende Entwicklungstendenzen im weltweiten Stoffstrom des Primäraluminiums**
von H.-G. Schwarz (2000), XIV, 127 Seiten
ISBN: 3-89336-264-9
25. **Klimawirkungsforschung auf dem Prüfstand**
Beiträge zur Formulierung eines Förderprogramms des BMBF
Tagungsband des Workshop „Klimaforschung“, Jülich, vom 02. bis 03.12.1999
von J.-Fr. Hake, W. Fischer (2000), 150 Seiten
ISBN: 3-89336-270-3
26. **Energiezukunft 2030**
Schlüsseltechnologien und Techniklinien
Beiträge zum IKARUS-Workshop 2000 am 2./3. Mai 2000
herausgegeben von U. Wagner, G. Stein (2000), 201 Seiten
ISBN: 3-89336-271-1
27. **Der globale Wasserkreislauf und seine Beeinflussung durch den Menschen**
Möglichkeiten zur Fernerkundungs-Detektion und -Verifikation
von D. Klaus und G. Stein (2000), 183 Seiten
ISBN: 3-89336-274-6
28. **Satelliten und nukleare Kontrolle**
Änderungsdetektion und objektorientierte, wissensbasierte Klassifikation von Multispektralaufnahmen zur Unterstützung der nuklearen Verifikation
von I. Niemeyer (2001), XIV, 206 Seiten
ISBN: 3-89336-281-9
29. **Das hydrologische Modellsystem J2000**
Beschreibung und Anwendung in großen Flußgebieten
von P. Krause (2001), XIV, 247 Seiten
ISBN: 3-89336-283-5
30. **Aufwands- und ergebnisrelevante Probleme der Sachbilanzierung**
von G. Fleischer, J.-Fr. Hake (2002), IV, 64 Blatt
ISBN: 3-89336-293-2

31. **Nachhaltiges Management metallischer Stoffströme**
Indikatoren und deren Anwendung
Workshop, 27.-28.06.2001 im Congresscentrum Rolduc, Kerkrade (NL)
herausgegeben von W. Kuckshinrichs, K.-L. Hüttner (2001), 216 Seiten
ISBN: 3-89336-296-7
32. **Ansätze zur Kopplung von Energie- und Wirtschaftsmodellen zur Bewertung zukünftiger Strategien**
IKARUS-Workshop am 28. Februar 2002, BMWi, Bonn. Proceedings
herausgegeben von S. Briem, U. Fahl (2003), IV, 184 Seiten
ISBN: 3-89336-321-1
33. **TRACE. Tree Rings in Archaeology, Climatology and Ecology**
Volume 1: Proceedings of the Dendrosymposium 2002,
April 11th – 13th 2002, Bonn/Jülich, Germany
edited by G. Schleser, M. Winiger, A. Bräuning et al., (2003), 135 pages, many
partly coloured illustrations
ISBN: 3-89336-323-8
34. **Klimaschutz und Beschäftigung durch das KfW-Programm zur CO₂-Minderung und das KfW-CO₂-Gebäudesanierungsprogramm**
von M. Kleemann, R. Heckler, A. Kraft u. a., (2003), 53 Seiten
ISBN: 3-89336-326-2
35. **Klimaschutz und Klimapolitik: Herausforderungen und Chancen**
Beiträge aus der Forschung
herausgegeben von J.-Fr. Hake, K. L. Hüttner (2003), III, 231 Seiten
ISBN: 3-89336-327-0
36. **Umweltschutz und Arbeitsplätze, angestoßen durch die Tätigkeiten des Schornsteinfegerhandwerks**
Auswertung von Schornsteinfeger-Daten
von M. Kleemann, R. Heckler, B. Krüger (2003), VII, 66 Seiten
ISBN: 3-89336-328-9
37. **Die Grundwasserneubildung in Nordrhein-Westfalen**
von H. Bogen, R. Kunkel, T. Schöbel, H. P. Schrey, F. Wendland (2003), 148
Seiten
ISBN: 3-89336-329-7
38. **Dendro-Isotope und Jahrringbreiten als Klimaproxis der letzten 1200 Jahre im Karakorumgebirge/Pakistan**
von K. S. Treydte (2003), XII, 167 Seiten
ISBN: 3-89336-330-0
39. **Das IKARUS-Projekt: Energietechnische Perspektiven für Deutschland**
herausgegeben von P. Markewitz, G. Stein (2003), IV, 274 Seiten
ISBN: 3-89336-333-5

40. **Umweltverhalten von MTBE nach Grundwasserkontamination**
von V. Linnemann (2003), XIV, 179 Seiten
ISBN: 3-89336-339-4
41. **Climate Change Mitigation and Adaptation: Identifying Options for Developing Countries**
Proceedings of the Summer School on Climate Change, 7-17 September 2003, Bad Münstereifel, Germany
edited by K. L. Hüttner, J.-Fr. Hake, W. Fischer (2003), XVI, 341 pages
ISBN: 3-89336-341-6
42. **Mobilfunk und Gesundheit: Risikobewertung im wissenschaftlichen Dialog**
von P. M. Wiedemann, H. Schütz, A. T. Thalmann (2003), 111 Seiten
ISBN: 3-89336-343-2
43. **Chemical Ozone Loss in the Arctic Polar Stratosphere: An Analysis of Twelve Years of Satellite Observations**
by S. Tilmes (2004), V, 162 pages
ISBN: 3-89336-347-5
44. **TRACE. Tree Rings in Archaeology, Climatology and Ecology**
Volume 2: Proceedings of the Dendrosymposium 2003, May 1st – 3rd 2003, Utrecht, The Netherlands
edited by E. Jansma, A. Bräuning, H. Gärtner, G. Schleser (2004), 174 pages
ISBN: 3-89336-349-1
45. **Vergleichende Risikobewertung: Konzepte, Probleme und Anwendungsmöglichkeiten**
von H. Schütz, P. M. Wiedemann, W. Hennings et al. (2004), 231 Seiten
ISBN: 3-89336-350-5
46. **Grundlagen für eine nachhaltige Bewirtschaftung von Grundwasserressourcen in der Metropolregion Hamburg**
von B. Tetzlaff, R. Kunkel, R. Taug, F. Wendland (2004), 87 Seiten
ISBN: 3-89336-352-1
47. **Die natürliche, ubiquitär überprägte Grundwasserbeschaffenheit in Deutschland**
von R. Kunkel, H.-J. Voigt, F. Wendland, S. Hannappel (2004), 207 Seiten
ISBN: 3-89336-353-X
48. **Water and Sustainable Development**
edited by H. Bogen, J.-Fr. Hake, H. Vereecken (2004), 199 pages
ISBN: 3-89336-357-2
49. **Geo- and Biodynamic Evolution during Late Silurian / Early Devonian Time (Hazro Area, SE Turkey)**
by O. Kranendonck (2004), XV, 268 pages
ISBN: 3-89336-359-9

50. **Politiksznarien für den Umweltschutz**
Untersuchungen im Auftrag des Umweltbundesamtes
Langfristsznarien und Handlungsempfehlungen ab 2012 (Politiksznarien III)
herausgegeben von P. Markewitz u. H.-J. Ziesing (2004), XVIII, 502 Seiten
ISBN: 3-89336-370-X
51. **Die Sauerstoffisotopenverhältnisse des biogenen Opals lakustriner Sedimente als mögliches Paläothermometer**
von R. Moschen (2004), XV, 130 Seiten
ISBN: 3-89336-371-8
52. **MOSYRUR: Water balance analysis in the Rur basin**
von Heye Bogena, Michael Herbst, Jürgen-Friedrich Hake, Ralf Kunkel, Carsten Montzka, Thomas Pütz, Harry Vereecken, Frank Wendland (2005), 155 Seiten
ISBN: 3-89336-385-8
53. **TRACE. Tree Rings in Archaeology, Climatology and Ecology**
Volume 3: Proceedings of the Dendrosymposium 2004, April 22nd – 24th 2004, Birmensdorf, Switzerland
edited by Holger Gärtner, Jan Esper, Gerhard H. Schleser (2005), 176 pages
ISBN: 3-89336-386-6
54. **Risikobewertung Mobilfunk: Ergebnisse eines wissenschaftlichen Dialogs**
herausgegeben von P. M. Wiedemann, H. Schütz, A. Spangenberg (2005), ca. 380 Seiten
ISBN: 3-89336-399-8
55. **Comparison of Different Soil Water Extraction Systems for the Prognoses of Solute Transport at the Field Scale using Numerical Simulations, Field and Lysimeter Experiments**
by L. Weihermüller (2005), ca. 170 pages
ISBN: 3-89336-402-1
56. **Effect of internal leaf structures on gas exchange of leaves**
by R. Pieruschka (2005), 120 pages
ISBN: 3-89336-403-X
57. **Temporal and Spatial Patterns of Growth and Photosynthesis in Leaves of Dicotyledonous Plants Under Long-Term CO₂- and O₃-Exposure**
by M. M. Christ (2005), 125 pages
ISBN: 3-89336-406-4
58. **Öffentliche Kommunikation über Klimawandel und Sturmflutrisiken Bedeutungskonstruktion durch Experten, Journalisten und Bürger**
von H. P. Peters, H. Heinrichs (2005), 231 Seiten, CD
ISBN: 3-89336-415-3

59. **Umsatz verschiedener Ernterückstände in einem Bodensäulenversuchssystem – Einfluss auf die organische Bodensubstanz und den Transport zweier Xenobiotika**
von N. Drewes (2005), 221 Seiten
ISBN: 3-89336-417-X
60. **Evaluierung der CO₂-Minderungsmaßnahmen im Gebäudebereich**
von M. Kleemann, P. Hansen (2005), 84 Seiten
ISBN: 3-89336-419-6
61. **TRACE. Tree Rings in Archaeology, Climatology and Ecology**
Volume 4: Proceedings of the Dendrosymposium 2005,
April 21st – 23rd 2005, Fribourg, Switzerland
edited by Ingo Heinrich, Holger Gärtner, Michel Monbaron, Gerhard Schleser
(2006), 313 pages
ISBN: 3-89336-425-0
62. **Diffuse Nitrateinträge in die Grund- und Oberflächengewässer von Rhein und Ems**
Ist-Zustands- und Maßnahmenanalysen
von R. Kunkel, F. Wendland (2006), 130 Seiten
ISBN: 3-89336-437-4
63. **Abhängigkeit des Wurzelwachstums vom Lichtregime des Sprosses und deren Modifikation durch Nährstoffe sowie im Gravitropismus**
von Kerstin A. Nagel (2006), 119 Seiten
ISBN: 3-89336-443-9
64. **Chancen und Risiken zukünftiger netzgebundener Versorgung**
Ein multi-kriterielles Verfahren zur Bewertung von Zukunftsszenarien
von C. R. Karger, W. Hennings, T. Jäger (2006), 296 Seiten
ISBN: 3-89336-445-5
65. **Die Phosphatbelastung großer Flusseinzugsgebiete aus diffusen und punktuellen Quellen**
von B. Tetzlaff (2006), 287 Seiten
ISBN: 3-89336-447-1
66. **Fate of veterinary pharmaceuticals in soil: An experimental and numerical study on the mobility, sorption and transformation of sulfadiazine**
by A. Wehrhan (2006), XXII, 134 pages
ISBN: 3-89336-448-X
67. **Biomacromolecules of Fossil Algae, Spores and Zooclasts from Selected Time Windows of Proterozoic to Mesozoic Age as Revealed by Pyrolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry – A Biogeochemical Study**
by S. Dutta (2006), XVI, 139 pages
ISBN: 3-89336-455-2

68. **Bestimmung der Nicotinverteilung und anderer Stickstoffverbindungen in den Blattgeweben von *Nicotiana tabacum* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen durch Einzelzellanalyse, Kapillarelektrophorese und der Massenspektrometrie**
von K. Wieland (2006), X, 189 Seiten
ISBN: 3-89336-458-7



Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Band/Volume 68
ISBN 3-89336-458-7

Umwelt
Environment