Mikroskopisch-chemische Analyse von Blättern der als volksmedizinische Pflanze genutzten *Premna oblongata* Miq. (Verbenaceae)

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
- Dr. rer. nat. -
des Departments Biologie
der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Agoes Mardiono Jacoeb
aus Brebes, Indonesien

Hamburg, August 2008

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. R. LIEBEREI
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. G. ADAM
Tag der Disputation: 21. Dezember 2007

Hamburg, den 07. Dezember 2007

Universität Hamburg
Fakultät
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung 1
2. Material und Methoden 7
2.1. Chemikalien 7
2.2. Kultivierung der Pflanzen 11
2.3. Probenahme 11
2.3.1. Probenahme für die mikroskopische Untersuchung der Blätter 11
2.3.2. Probenahme der Blätter zur Bestimmung von Hydrokolloiden und von Uronsäure 12
2.3.3. Probenahme der jungen Blätter zur Bestimmung der Hydrokolloide 12
2.4. Bestimmung der Blattflächen und des Blattumfangs 12
2.5. Bestimmung der Zellflächen und des Zellumfangs 13
2.5.1. Herstellung der Blattdünnschnitte 13
2.5.2. Durchführung der Färbungen 13
2.5.3. Herstellung der Semidünnschnitte 14
2.5.4. Durchführung der Färbungen 14
2.5.5. Bestimmung der Zellfläche und des –umfangs der Blattproben 15
2.5.6. Bilddokumentation 15
2.6. Bestimmung des Blatt-Tockenmasse 15
2.7. Gewinnung der Hydrokolloide 15
2.7.1. Gewinnung der Hydrokolloide ausgewachsener Blätter 15
2.7.2. Gewinnung der Hydrokolloide junger Blätter 16
2.8. Prüfung auf Reinheit der Hydrokolloide 16
2.9. Bestimmung des Pektin- und Uronsäuregehaltes sowie des Esterifizierungsgrades des Pektins 16
2.9.1. Bestimmung des Esterifizierungsgrades und des Pektingehaltes nach dem Titrationsverfahren 16
2.9.2. Bestimmung der Uronsäure 17
2.10. Nachweis der Monosaccharide der Hydrokolloide durch gaschromatografische Analyse 17
2.10.1. Reinigung der Hydrokolloide junger und ausgewachsener Blätter 17
2.10.2. Hydrolyse und Derivatisierung der Hydrokolloide 19
2.10.3. Gaschromatografie der Referenzsaccharide und der Hydrokolloide 19

3. Ergebnisse 21
3.1. Blattanatomie ... 21
3.1.1. Blattstiel ... 21
3.1.2. Lamina ... 33
3.2. Blattmasse ... 38
3.3. Blattfläche ... 40
3.4. Flächen von Epidermiszellen der Blattstiele und der Hauptnerven ... 43
3.5. Umfang von Epidermiszellen der Blattstiele und der Hauptnerven ... 46
3.6. Fläche von Epidermiszellen der Lamina ... 50
3.7. Umfang der Epidermiszellen der Lamina ... 52
3.8. Gehalte an Hydrokolloiden in ausgewachsenen Blättern ... 54
3.8.1. Hydrokolloidgehalte ausgewachsener Blätter bezogen auf die Blatt-Frischmasse und die Blatt-Trockenmasse ... 54
3.8.2. Hydrokolloidgehalte bezogen auf die Blattfläche ... 58
3.9. Reinheit der Hydrokolloide ... 60
3.10. Charakterisierung der Hydrokolloide ... 63
3.10.1. Pektingehalt und Esterifizierungsgrad ... 63
3.10.2. Pektingehalt bezogen auf die Blatt-Frischmasse und -Trockenmasse ... 68
3.10.3. Pektingehalt bezogen auf die Blattfläche ... 72
3.10.4. Uronsäuregehalt nach MHDP-Test ... 74
3.11. Analyse der Hydrokolloide mit Hilfe der Gaschromatografie ... 76
3.11.1. Gaschromatografische Untersuchung der Referenzsaccharide ... 76
3.11.2. Qualitative Zusammensetzung der Hydrokolloide ... 84
3.11.3. Quantitative Zusammensetzung der Hydrokolloide ... 85
3.11.4. Gehalt an Hydrokolloiden junger Blätter ... 88
4. Diskussion 91
4.1. Blattanatomie und ihre Hydrokolloide ... 91
4.2. Hydrokolloidzusammensetzung ... 95
4.3. Analyse-Methoden ... 97
5. Zusammenfassung 102
6. Verzeichnisse 105
6.1. Abkürzungsverzeichnis ... 105
6.2. Abbildungsverzeichnis ... 108
6.3. Tabellenverzeichnis ... 112

6.4. Literaturverzeichnis 114
7. Anhang 119
8. Danksagung 124

1. Einleitung

Die Nutzung von Hydrokolloiden aus Pflanzen als Lebensmittel bzw. als modifizierender Bestandteil in anderen Lebensmitteln ist schon lange bekannt. So hat sich beispielsweise die Anwendung von Schleimendosperm von *Ceratonia siliqua* L. (Johannisbrot), *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze (Tara) und *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub. sowie Citrus- und Apfelpektin als Stabilisatoren oder Emulgatoren schon lange etabliert.

In Taiwan, China, Malaysia, Indonesien und auf den Philippinen wird für die Zubereitung von Desserts in einigen Fällen Gel zugegeben, das von bestimmten Pflanzenblättern gewonnen wird. In Taiwan und China dienen die Blätter von *Mesona procumbens* Hemsl. für die **Hsin tsao**-Produktion. In Malaysia ist das Produkt als **Cincau** oder **Lengkong** bekannt. Als Gelquelle dienen hier die Blätter von *Cyclea barbata* L. Während der Saft von *Premna oblongata*-Blättern auf den Philippinen volkmedizinisch zur Behandlung von Husten verwendet wird (PERRY und METZGER, 1979), wird das Gel in Indonesien als Nachtisch genutzt. Auf den Philippinen wird es **Alagau** genannt (QUISUMBING, 1951), in Indonesien ist es als **Cincau, Camcauh, Terwulu** oder **Tarawulu** bekannt. SUNANTO (1995) hat die Blätter von *Cyclea barbata* L., *Mesona palustris* Bl. und *Melastoma polyandrum* B. als Gelquelle beschrieben. Nach Angaben von KOOIMAN (1969) sind *Gardenia jasmoides* Ellis und *Stephanis hernandifolia* Walp alternative Quellen zur Herstellung von **Cincau**.

Cincau hitam oder schwarzes **Cincau** und **Cincau hijau** oder grünes **Cincau** sind zwei aus Pflanzenblättern hergestellte Gel-Arten, die in Indonesien zu finden sind. Während schwarzes **Cincau** aus *Mesona palustris* hergestellt wird, dienen *Cyclea barbata* L. oder *Premna*-Arten als Schleimquelle für grünes **Cincau**. Schwarzes **Cincau** ist grundsätzlich eine Mischung von Blattschleim, Maniok-Stärke und Zusatzmineralien. Als Mineralienquelle dienen traditionell die Verbrennungsreste von Reisstroh oder Kokosschalen, die **Abu qi** genannt werden. Die aus **Abu qi** und Wasser gemischte und danach durch Textilwatte filtrierte Extraktlösung wird zum Kochen von getrockneten Blättern und Stängeln benutzt. Danach wird die Mischung abgekühlt und durch Textilwatte filtriert. Der Extrakt wird wieder erhitzt, anschließend gibt man Maniok-Stärke dazu. Nach der Abkühlung wird das Gel in kleine Würfel

geschnitten. Verfeinert mit gelöstem braunen Zucker oder Sirup und Eis werden diese Würfel bereits als Nachtisch verwendet. Sie werden in Restaurants oder auf der Straße, besonders während der Trockenzeit, verkauft. Bei der Zubereitung von grünem **Cincau** wird kein **Abu qi** benutzt. Die frischen Blätter von *Premna*-Arten oder von *Cyclea barbata* L. werden mit gekochtem Wasser aufgeweicht, geknetet und durch Textilwatte filtriert. Danach geliert die Flüssigkeit.

Cincau ist nur einige Tage haltbar. Danach bricht es auf; es kommt zum Wasserverlust. Einige Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Produktqualität zu verbessern, vor allem der Einsatz von unterschiedlichen Salzen in Kombination mit verschiedenen Hydrokolloiden. SUMARTI (1999) hat die Einflüsse von Magnesiumchlorid und Methylcellulose auf die Gel-Qualität von *Cyclea barbata* L. Miers erforscht. Weiterhin hat KURNIAWAN (1999) den Einfluss des pH-Wertes, die Zugabe von Xanthan-Gum und von Eisen(II)-sulfat auf die Gel-Qualität der gleichen Spezies experimentell untersucht. CAMUS (2000) hat versucht, die Gel-Qualität von *Premna oblongifolia* Merr. durch Zusatz von Alginsäure und niedrigmethyliertem Pektin zu verbessern.

Unter der Familie Verbenaceae sind ca. 100 Gattungen mit 2600 Arten bekannt. Sie sind meistens in den tropischen und subtropischen Gebieten verbreitet, insbesondere in den temperierten Gebieten der Südhemisphäre und weniger in den temperierten Gebieten der Nordhemisphäre. Von der Gattung *Premna* sind 180 Arten zu finden (MELCHIOR, 1964). Nach Angaben von WU und RAVEN (1994) gibt es jedoch weltweit ca. 200 Arten, darunter 46 Arten, die in China zu finden sind. HOOCKER (1885) notierte 34 in Indien verbreitete Arten.

Nach LAM und VAN DEN BRINK (1921) ist *P. oblongata* auf Java, Sumbawa, Timor und Celebes (Sulawesi) beheimatet. Andere Arten sind *P. derryana, P. cordifolia, P. parasitica, P. sterculifolia, P. ruttenii, P. borneensis, P. curranii, P. timoriana, P. ceramensis, P. punctulata, P. divaricata, P. perakensis, P. cauliflora, P. kunstleri, P. trichostoma, P. oblongifolia, P. rufidula, P. rotundifolia, P. sessilifolia, P. littoralis, P. flavescens, P. parviflora, P. nervosa, P. wrayi, P. integrifolia, P. macrophylla, P. depauperata, P. leucostoma, P. lativolia, P. pubescens, P. tomentosa und P. cumingiana*. KOORDERS und VALETON (1914) beschäftigten sich zusätzlich mit 10 *Premna*-Arten aus Java und beschrieben vor allem die Blüten und Früchte.

Nach Angaben von QUISUMBING (1951) und TORKELSON (1996) wurde *Premna oblongata* Miq. auch als *Premna odorata* Blanco, *Premna curanii* H. Lam, *Premna pubescens* Blume var. *odorata* H. Lam, *Premna serratifolia* Blanco oder *Premna vestita* Schauer beschrieben. Diese Spezies bestehen aus var. *puberula* H. J. Lam und var. *subglabra* H. J. Lam (LAM, 1919). Weiterhin korrigierten LAM und VAN DEN BRINK (1921) die Zuordnung der var. *subglabra,* in dem sie sie als eigene Art *Premna oblongifolia* Merr. herausstellten. Auf den Philippinen kann man die Pflanzen auf den Batan-Inseln, Nord-Luzon und Mindanau finden. In diesen Gebieten findet man zusätzlich *P. cumingiana, P. nauseosa* und *P. herbaceae. P. cumingiana* wird von den Einheimischen Magalas, Maparai oder Magilik genannt und wächst in Nord-Luzon, Palawan und Mindanao sowie in Celebes (Sulawesi). *P. nauseosa* wird als Alagau-Gubat, Ananghit oder Angsuan bezeichnet. Diese Art ist nur auf den Philippinen zu finden. *P. herbaceae* hat den lokalen Name Huniyan und ist in den Philippinen von Cagayan, Isabela, Bontoc, Luzon bis Mindanao bekannt. Diese Art ist auch in Indien, Siam und Hainan beheimatet.

Premna-Arten haben eine weltweit ethnobotanische Bedeutung. BURKILL et al. (1935) beschrieben die Nutzung verschiedener *Premna*-Arten. Auf den Philippinen wurde das Holz der *P. nauseosa* kommerziell für Gebäude genutzt. In Indien haben die Einheimischen mit dem Holz der *P. bengalensis* Brücken gebaut sowie ihre Blätter als Heilmittel gekaut. In den Regionen der Malayischen Inseln wird *P. divaricata*, das auch Akar rachun tikus, Akar buas tunggal oder Akar melor padang gennant wird, als Heilmittel verwendet. Während die jungen Blätter der *P. cordifolia* als Lebensmittel dienen, werden ihre ausgewachsenen Blätter und Wurzeln als fiebervertreibendes Mittel genutzt. Die Wurzel wird zur Heilung von Asthma verwendet (HEYNE, 1927). Das Holz der *P. integrifolia* wurde in den Regionen der Malayischen Inseln für Fahrradpedale oder Messergriffe genutzt. QUISUMBING (1951) berichtete über die Nutzung von *Premna*-Arten. Die Blätter der *P. nauseosa* dienen als Ersatz für *Piper betle*. Sie werden zusammen mit Samen von *Areca catechu* gekaut. Die Blätter von *P. cumingiana* werden als Heilmittel gegen Schwellungen verwendet.

Premna oblongata Miq. ist ein Strauch oder ein kleiner Baum. Man findet diese Spezies auf Luzon und Java. Seine Blätter sind länglich oder eiförmig und die Blattbasis rund. Die Lamina ist auf beiden Seiten mehr oder weniger weich behaart. Auf der unteren Seite des Stiels und der Hauptnerven sind braune Haare zu finden.

Der Stiel misst 1,5 bis 3,5 cm. Die Blüte ist eine Doldentraube, der Kelch jeder Einzelblüte ist fast haarlos, wenig drüsig und ganz zart. Die Krone misst 0,2 cm und ist haarlos oder wenig behaart. Der Fruchtknoten ist verkehrt eiförmig und haarlos mit einer Länge von 0,3 bis 0,4 cm und einem Durchmesser von 0,15 bis 0,20 cm (LAM, 1919; LAM und VAN DEN BRINK, 1921). Die jungen Zweige oder Stängel sind mit kurzen und dünnen braunen Haaren bedeckt, verlieren diese aber zuweilen schnell (BACKER und VAN DEN BRINK, 1968).

Premna oblongata Miq. bietet einige Vorteile als Pektinquelle. Sie ist einfach durch Stecklinge zu vermehren, so dass die Pektinherstellung nicht abhängig von der Erntezeit ist. Des Weiteren sind die Pektine durch einfache Trocknung der Blätter nach einigen Monaten bzw. Jahren noch zu gewinnen. Botanisch wurde die Pflanze bis jetzt kaum beschrieben, besonders über ihre Histologie, die Speicherorte für Pektin und dessen Zusammensetzung sind bis jetzt noch keine Angaben aus der Literatur bekannt.

Das Pflanzenhydrokolloide Nahrungsmittel und Bestandteile vieler Drogen sind, ist seit langem bekannt (SMITH und MONTGOMERY, 1959; TSCHIRCH, 1912). Sie kommen als normale Inhaltsstoffe im Entwicklungsablauf des Pflanzenreiches vor, z.B. bei den Familien Asteraceae, Menispermaceae, Plantaginaceae und Verbenaceae (STEINEGGER und HÄNSEL, 1968; ODENTHAL, 1984; BRÄUTIGAM, 1985). Spitzwegerich oder *Plantago lanceolata* ist wegen seiner blutstillenden, blutreinigenden, schleimlösenden, fiebervertreibenden und wundenheilenden Wirkungen bekannt (BRÄUTIGAM, 1985). Die Samenschale von Leinsamen (*Linum usitatissimum*) enthält Hydrokolloide, die durch Zugabe von Wasser aufquellen und als Abführmittel Verwendung finden. Hydrokolloide der *Tamus communis* sind seit langem auch zur Bekämpfung von Rheumatismus, Gicht, Hexenschuss und Neuralgien bekannt (HOLZACH und FLÜCK, 1950).

Pflanzenhydrokolloide sind immer attraktive Objekte für Botaniker und Lebensmittelchemiker. Bis jetzt wurden zahlreiche Nachweis- und Bestimmungsmethoden veröffentlicht. Während chemische Nachweismethoden viel aufwendiger sind, bietet die mikroskopische Analyse einfachere Methoden zur Qualitätsbeurteilung. Über die Nachweismöglichkeiten des Schleimendosperms hat DEUTSCHMANN (1976) geschrieben. DECKE (1980) hat die Ontogenie des Schleimendosperms von *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub. mikroskopisch untersucht. Weiterhin hat FLINT (1994) mikroskopische Prüfmethoden zum

qualitativen Nachweis und zur Qualitätssicherung der Hydrokolloide pflanzlicher Herkunft in Lebensmitteln entwickelt. Über die chemische Zusammensetzung der Blatthydrokolloide von *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae) wird von BRÄUTIGAM (1985) ausführlich berichtet. EL AFFRY (1978) publizierte über den Pektingehalt von Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*). Weiterhin entwickelten sich die Nachweismethoden in der Pektinanalytik von den konventionellen mikroskopischen Verfahren wie der Anwendung der Rutheniumrotfärbung oder der Hydroxylamin-$FeCl_3$-Behandlung bis zu den relativ modernen Verfahren wie der Anwendung der Antikörper JIM5 und JIM8 sehr schnell.

Durch die sprunghafte Entwicklung in der gaschromatografischen Analytik ist die Identifizierung der Pektinmonosaccharide erleichtert worden. Die Pektine werden durch Hydrolyse oder Methanolyse in Monomere gespalten, die nach der Derivatisierung als Silylether gaschromatografisch bestimmt werden. Die Strukturcharakterisierung der Monomeren wird unter anderem durch Kopplung der Gaschromatografie mit der Massenspektrometrie ermöglicht. KIWITT-HASCHEMIE (1994) hat sich mit der strukturellen Charakterisierung von Pektinen und anderen Nichtstärke-Polysacchariden sowie ihrem Nachweis in Lebensmitteln beschäftigt.

Die Voraussetzung für den Erfolg des gaschromatografischen Verfahrens ist die optimale Gewinnung, Reinigung und Hydrolyse der Proben. Die Gewinnung der Pektine als Bestandteil der Blattzellwand erfolgt mit Hilfe eines Mörsers und Pistills oder eines Homogenisators wie z. B. eines Ultraturraxes unter gleichzeitiger Bindung der gelösten Substanz an komplexierende Salze oder Behandlung mit Chelatbildnern wie Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA), Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure (EGTA) oder trans-1,2-Cyclohexylendinitrilotetraessigsäure (CDTA) (JARVIS, 1982). Die Abtrennung von Stärke wird meist durch Amylase- oder DMSO-Behandlung erreicht (BOUVENG und LINDBERG, 1965). Proteine werden durch Zugabe von Protease oder einer Mischung aus 5-Sulfosalicylsäure und gesättigter NaCl-Lösung entfernt (BLASCHEK, 1991; PREUß und THIER, 1982). Eine Mischung aus Dichlormethan und Aceton dient zur Fettentfernung. Durch Zugabe von methanolischer Salzsäure bei hoher Temperatur werden die Pektine in ihre monomeren Zucker zerlegt, die weiterhin nach Silylierung gaschromatografisch bestimmt werden können.

In der vorliegenden Arbeit werden die anatomischen Merkmale der Blätter und ihr Pektingehalt untersucht, wobei Veränderungen über die Vegetationsperiode und die Variabilität zwischen einzelnen Pflanzen besonders berücksichtigt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Acetylchlorid (Fluka GmbH, Buchs, Schweiz)

Astrablau-Safranin-Lösung

0,25 g Astrablau (Merck, Darmstadt) werden mit 50 ml 0,5 %iger Essigsäure gelöst. Parallel werden 50 ml 0,5 %ige wässrige Safranin-Lösung hergestellt. Beide Lösungen werden gemischt.

Blaukorn NPK-Dünger

Die Zusammensetzung ist in der Tabelle 1 beschrieben.

Tabelle 1: Zusammensetzung des verwendeten Blaukorn NPK-Düngers (Compo GmbH & Co KG, Münster)

Zusammensetzung	Anteil [%]
Ammoniumstickstoff	8
Nitratstickstoff	7
Neutral-ammoncitrat- und wasserlösliches Phosphat	5
wasserlösliches Kaliumoxid	20
Gesamtmagnesiumoxid	2
Gesamt-Schwefel	8
Bor	0,02
Zink	0,01

Jod-Kaliumjodid-Lösung (Merck, Darmstadt)

6,7 g KJ und 3,3 g J_2 werden mit Wasser auf 100 g aufgefüllt und gelöst.

N,O-Bis(trimethylsilyl)-acetamid (BSA) (Sigma Aldrich GmbH, Steinheim)

Chlortrimethylsilan (Sigma Aldrich GmbH, Steinheim)

90 %ige DMSO-Lösung (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

90 ml DMSO werden mit 10 ml deionisiertem Wasser verdünnt.

Galacturonsäure-Calibrierlösungen

In einem 100 ml Messkolben werden 0,01 g Galacturonsäure (Merck, Darmstadt) mit deionisiertem Wasser gelöst und zur Marke aufgefüllt. Von dieser Stammlösung wird eine Verdünnungsreihe erstellt wie sie in Tabelle 2 aufgelistet ist.

Tabelle 2: Verdünnungsreihe der Galacturonsäure-Lösungen zur Ermittlung der Calibriergeraden

Galacturonsäurekonzentration [µg/ml]	Volumen Stammlösung [µl]	Volumen Wasser [µl]
100	1000	0
75	750	250
50	500	500
30	300	700
10	100	900
5	50	950

5 %ige Glutaraldehyd-Lösung (Merck, Darmstadt)

0,01 mol/l HCl (Merck, Darmstadt)

Hydrolyse-Lösung

0,25 g Natriumtetraborat (Merck, Darmstadt) werden in 100 ml 97 %iger Schwefelsäure gelöst.

Hydroxylamin-$FeCl_3$-Lösung

1,4 g Hydroxylaminhydrochlorid (Merck, Darmstadt) werden in 10 ml deionisiertem Wasser gelöst (Lösung a). Anschließend wird eine Lösung von 1,4 g NaOH (Merck, Darmstadt) und 10 ml deionisiertem Wasser hergestellt (Lösung b). Zusätzlich werden 10 ml konzentrierte HCl (Merck, Darmstadt) mit 20 ml deionisiertem Wasser verdünnt (Lösung c). 1 g $FeCl_3$ (Merck, Darmstadt) wird in 10 ml 0,1 mol/l HCl gelöst (Lösung d).

Interne Standardlösung für die Gaschromatografie

In einen 100 ml Erlenmeyerkolben werden 82,3 mg meso-Erythrit (Merck, Darmstadt) und 250 mg Sorbit (Fluka GmbH, Buchs, Switzerland) eingewogen. Die Zuckeralkohole werden unter Erwärmen in Methanol gelöst und der Kolben zur Marke aufgefüllt. Weiterhin werden 1:10 und 1:100 Verdünnungen hergestellt. Sie werden im Kühlschrank aufbewahrt und vor Gebrauch im Wasserbad auf 20 °C temperiert.

LR-White (London Resin Company)

Methanol, abs. (Merck, Darmstadt)

500 ml Methanol werden 2 h mit 2,5 g Magnesiumspänen (Merck, Darmstadt) und 0,25 g Jod (Merck, Darmstadt) unter Rückfluss gekocht und in ein trockenes Gefäß destilliert.

methanolische Salzsäure, c = etwa 4 mol/l

200 ml Methanol, abs. werden mittels einer Eis/Kochsalz-Mischung auf etwa –20 °C gekühlt und unter einem Stickstoffstrom von etwa 10 ml/min mit 60 ml Acetylchlorid versetzt. Die genaue Konzentrationen des gebildeten Chlorwasserstoffs wird durch Titration eines aliquoten Anteils mit Natriumhydroxid-Maßlösung (c = 0,5 mol/l) ermittelt. Die Lösung wird bei –20 °C aufbewahrt.

methanolische Salzsäure, c = 2,0 mol/l

50 ml methanolische Salzsäure (c = 4 mol/l) werden unter Berücksichtigung des durch Titration ermittelten Gehaltes mit der berechneten Menge absoluten Methanol verdünnt. Die Lösung wird bei –20 °C aufbewahrt.

methanolische Salzsäure, c = 0,5 mol/l

50 ml methanolische Salzsäure (c = 4 mol/l) werden unter Berücksichtigung des durch Titration ermittelten Gehaltes mit der berechneten Menge absoluten Methanol verdünnt. Die Lösung wird bei –20 °C aufbewahrt.

MHDP-Farbreagens-Lösung (0,15 % MHDP in 0,5 %iger NaOH-Lösung)

1 g NaOH wird in einem 200 ml-Kolben mit 10 ml deionisiertem Wasser gelöst. Dazu gibt man 0,3 g MHDP (Sigma Aldrich GmbH, Steinheim) und füllt mit deionisiertem Wasser zur Marke auf.

0,01 mol/l NaOH (Merck, Darmstadt)

PEM-Puffer

3,78 g PIPES, 0,48 g EGTA und 0,31 g $MgSO_4$ werden in 250 ml 0,1 mol/l NaOH gelöst. Die Lösung wird mit Schwefelsäure auf pH 6,9 eingestellt.

Phloroglucin-Salzsäure-Lösung

1 bis 5 g Phloroglucin (Merck, Darmstadt) werden in 100 ml 92 %igem Ethanol gelöst.

0,2 %ige Primulin-Lösung (Riedel-de Haen AG, Seelze)

Pyridin (Merck, Darmstadt)

Rutheniumrot-Lösung (Merck, Darmstadt)

20 ml wässrige Lösung von Rutheniumrot (1:5000) werden hergestellt. Dazu werden einige Tropfen Ammoniak gegeben.

Referenzsaccharid-Lösungen

Arabinose (Merck, Darmstadt), Xylose (Merck, Darmstadt), Galactose (Merck, Darmstadt), Glucose (Merck, Darmstadt) und Galacturonsäure (Merck, Darmstadt) werden als Standardsubstanzen benötigt. Je eine Stammlösung mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml für jeden Zucker und die Galacturonsäure werden vorbereitet und im Kühlschrank aufbewahrt. Vor Gebrauch werden sie im Wasserbad auf 20 °C temperiert.

Sudan III-Lösung (Merck, Darmstadt)

0,2 g Sudan III werden in 50 ml Isopropanol gelöst und filtriert. Danach werden dem Filtrat 50 ml Glycerin zugesetzt.

5-Sulfosalicylsäure-Lösung

25 g 5-Sulfosalicylsäure-dihydrat (Sigma Aldrich GmbH, Steinheim) werden in 100 ml deionisiertem Wasser gelöst.

Thionin-Lösung (Merck, Darmstadt)

5 g Thionin werden mit 95 g 50 %igem Isopropanol gemischt und filtriert.

1,1,2-Trichlortrifluoroethan (Sigma Aldrich GmbH, Steinheim)

2.2. Kultivierung der Pflanzen

Die hier untersuchten *Premna oblongata*-Pflanzen stammten aus Bogor (Indonesien) und wurden im Gewächshaus des Biozentrums Klein Flottbek kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in handelsüblichen 30 cm-Blumentöpfen, die mit einer Mischung aus Quarzsand und Torf (Firma Floragard) gefüllt und im Abstand von 3 Wochen mit Blaukorn NPK–Dünger gedüngt wurden. Die künstliche Belichtung wurde auf eine Tageslänge von 16 Stunden eingestellt.

2.3. Probenahme

2.3.1. Probenahme für die mikroskopische Untersuchung der Blätter

Für die anatomischen Untersuchungen wurden ausgewachsene Blätter geerntet und in die Komponenten Blattstiel, Hauptnerven und Lamina geteilt (Abbildung 1). Die Blattstiele wurden differenziert begutachtet und abschnittsweise mit Stielanfang (Sa), Stielmitte (Sm) und Stielende bzw. Stielbereich vor dem Übergang zur Blattspreite (Se) bezeichnet. Die Hauptnerven wurden in die Bereiche Laminabasis (Hb), Laminamitte (Hm) und Laminaendes (He) eingeteilt. Schließlich wurden die Blattspreiten selbst in Laminabasis (Lb), Laminamitte (Lm) und Laminaende (Le) unterteilt. Die Blätter wurden mit Rasierklingen geschnitten und wie in den Kapiteln 2.5.1 und 2.5.3 beschrieben weiterverarbeitet.

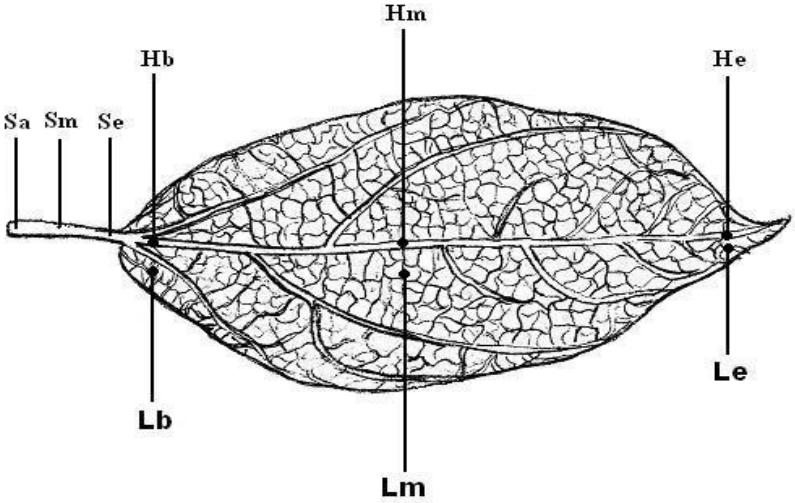


Abbildung 1: Blattbereiche für die mikroskopischen Untersuchungen (Sa = Stielanfang, Sm = Stielmitte, Se = Stielende, Hb = Hauptnerven der Laminabasis, Hm = Hauptnerven der Laminamitte, He = Hauptnerven des Laminaendes, Lb = Laminabasis, Lm = Laminamitte, Le = Laminaende)

2.3.2. Probenahme der Blätter zur Bestimmung von Hydrokolloiden und von Uronsäure

Im Oktober 2002 wurden vier Mal je 20 ausdifferenzierte Blätter von verschiedenen Pflanzen geerntet, getrocknet und ihre Frisch- und Trockenmassen ermittelt (Versuchsreihe A). Als Parameter für die innerartliche Variabilität wurden ebenfalls ausgewachsene Blätter – je 20 von 4 verschiedenen Pflanzen - im März 2003 untersucht (Versuchsreihe B). Anschließend wurden von März 2003 bis Februar 2004 monatlich je 20 Blätter von verschiedenen Pflanzen geerntet (Versuchsreihe C). Sie wurden weiter wie in Kapitel 2.6 beschrieben bearbeitet.

2.3.3. Probenahme der jungen Blätter zur Bestimmung der Hydrokolloide

26 junge Blätter mit Frischmassen zwischen 45 mg und 645 mg wurden geerntet und zur Bestimmung der Hydrokolloide (s. Kapitel 2.7.2) weiter verarbeitet.

2.4. Bestimmung der Blattflächen und des Blattumfangs

Die frischen Blätter wurden mit einem HP Scanjet 5470C (Firma Hewlett Packard) gescannt und ihre Flächen und Blattumfänge mit Hilfe der elektronischen

Datenverarbeitung mit dem Analysis-EDV-System (Firma Soft Imaging System) bestimmt.

2.5. Bestimmung der Zellflächen und des Zellumfangs

2.5.1. Herstellung der Blattdünnschnitte

Von den in Abbildung 1 beschriebenen Abschnitten der Blätter wurden mit dem Vibratom Series 1000 (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim) 100 µm dicke Scheiben geschnitten, die für die mikroskopischen Detailuntersuchungen mit Rutheniumrot-, Hydroxylamin-$FeCl_3$-, Thionin-, Sudan III- bzw. Safranin-Astrablau-Lösung gefärbt wurden.

2.5.2. Durchführung der Färbungen

Färbung mit Rutheniumrot-Lösung

Die 100 µm dicken Blattschnitte wurden in wenige Tropfen der Lösung gelegt. Nach einigen Minuten wurden sie mehrmals mit deionisiertem Wasser gewaschen und anschließend mikroskopiert. Pektinartige Substanzen färbten sich rosarot.

Färbung mit Hydroxylamin-$FeCl_3$-Lösung

Auf einem Objektträger wurde 1 Tropfen der Lösung a mit 2 Tropfen der Lösung b gemischt. Die 100 µm-Dünnschnitte wurden einige Minuten eingelegt. Nach Zugabe von 4 Tropfen der Lösung c zu den Präparaten und anschließendem Absaugen der Flüssigkeit mit Filterpapier wurden 1-2 Tropfen Lösung d zugefügt und mikroskopiert. Die Proben, die pektinartige Substanzen enthielten, sahen gelb-braun aus.

Färbung mit Thionin-Lösung

Die 100 µm dicken Blattscheiben wurden auf einen Objektträger gebracht. Dazu wurden 1-3 Tropfen der Lösung gegeben. Nach ca. 5 Minuten wurde die überschüssige Flüssigkeit mit Filterpapier abgesaugt. Anschließend wurden die Präparate mit Isopropanol mehrmals gewaschen und mikroskopiert. Die Proben, die pektinartige Substanzen enthielten, färbten sich violett.

Färbung mit Sudan III-Lösung

Die Proben wurden mit 1-2 Tropfen der Sudan III-Lösung 30 Minuten angefärbt und mikroskopiert. Liphophile Substanzen färbten sich rötlich.

Färbung mit Astrablau-Safranin

Die 100 µm dicken Schnitte wurden in 1-2 Tropfen der Astrablau-Safranin-Lösung für 2 Minuten gelegt und anschließend mikroskopiert. Die unverholzten Zellwände färbten sich bläulich. Die verholzten Zellwände wurden rötlich gefärbt.

2.5.3. Herstellung der Semidünnschnitte

Die frischen Blattproben wurden in 5 %iger Glutaraldehyd-Lösung, die mit PEM-Puffer auf pH 6,9 eingestellt wurde, fixiert. Danach wurden sie nacheinander in 50 %igem, 70 %igem, 90 %igem und 100 %igem Ethanol entwässert und in einer mit LR-White (London Resin Company) gefüllten Gelatinekapsel eingebettet. Die Polymerisation erfolgte bei 60 °C. Zum Schneiden wurden aus 6 mm dicken Glassstreifen (Plano, Wetzlar) Glassmesser mit einem Messerhersteller Type 7801 A (LKB, Stockholm, Schweden) geschnitten. Weiterhin wurden die Proben auf 1 µm mit dem Reichert Ultracut Microtom (Leica, Wien, Österreich) geschnitten.

2.5.4. Durchführung der Färbungen

Färbung mit Thionin-Lösung

Die Schnitte wurden auf einem Objektträger 15 Minuten in 5 %ige Thionin-Lösung eingelegt. Sie wurden anschließend mehrmals mit 50 %igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und mit oder ohne Ölimmersion mikroskopiert.

Färbung mit Primulin

Die 1 µm dicken Präparate wurden mit 0,2 %iger Primulin-Lösung 10 Minuten behandelt und mit Wasser gespült. Danach wurden sie an der Luft getrocknet und im Fluoreszenzlicht mikroskopiert. Bei Anregung mit UV-Licht und der Benutzung von einem UG-1-Erregerfilter und einem Y-495-Sperrfilter sind ß-glykosidische Bindungen in Polysacchariden detektierbar.

2.5.5. Bestimmung der Zellfläche und des –umfangs der Blattproben

Die Zellen wurden mit dem Olympus BH2 Mikroskop mikroskopiert und die Flächen und Zellumfänge mit Hilfe der elektronischen Datenverarbeitung mit dem Analysis-EDV-System (Soft Imaging System, Münster) gemessen.

2.5.6. Bilddokumentation

Die fotografische Dokumentation erfolgte mit einer Olympus-Kamera OM-2 und Kodak Ectachrome 64 T Film (Eastman Kodak Company, New York, USA) sowie einer Digitalkamera Colour View 12 (Olympus, Hamburg).

2.6. Bestimmung der Blatt-Trockenmasse

Die frisch geernteten Blätter wurden in kleine Stücke geschnitten und im Trockenschrank bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen.

2.7. Gewinnung der Hydrokolloide

2.7.1. Gewinnung der Hydrokolloide ausgewachsener Blätter

Die getrockneten Blätter (Kapitel 2.6) wurden in einem Mörser mit Hilfe von Seesand zerrieben, in Zentrifugengläser überführt, mit 0,5 %iger Ammoniumoxalat-Lösung versetzt und verrührt. Anschließend wurde das Homogenat mit Hilfe einer Zentrifuge (Labofuge GL, Heraeus Christ) 15 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert. Die gelb-bräunlichen Zentrifugate wurden in Bechergläser dekantiert und gesammelt. Die Gewinnung wurde einige Male wiederholt, bis in den Lösungen kein Hydrokolloid mehr vorhanden war. Danach wurde das Hydrokolloid in mehreren Schritten mit 96 %igem Ethanol gefällt und gesammelt. Durch 15 minütige Zentrifugation mit 5000 U/min wurden die Hydrokolloide vom Überstand getrennt, dreimal jeweils mit 96 %igem Ethanol gewaschen, dann 10 Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert. Danach wurden die Pellets – künftig als Trockenhydrokolloide bezeichnet - bei 100 °C im Trockenschrank getrocknet und gewogen.

2.7.2. Gewinnung der Hydrokolloide junger Blätter

Jedes der frischen jungen Blätter wurde gewogen und im Mörser mit Seesand zerrieben. Danach wurde 0,5 %ige Ammoniumoxalat-Lösung zugegeben, verrührt und anschließend das Homogenat 15 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert. Die gelblichen Zentrifugate wurden dekantiert. Die Extraktion wurde wiederholt, bis in den Proben keine Hydrokolloide mehr vorhanden waren. Die gesammelten Zentrifugate eines Blattes wurden vereinigt. Das Gel aus jeweils 500 µl eines Blattextraktes wurde mit 96 %igem Ethanol gefällt und dreimal mit 96 %igem Ethanol gewaschen. Es wurde weiter nach Kapitel 2.10.1 gearbeitet.

2.8. Prüfung auf Reinheit der Hydrokolloide

Um das Vorhandensein von Zellresten in den Trockenhydrokolloiden nachzuweisen, sowie ihre Reaktion gegen verschiedene Farbstoffe zu prüfen, wurden sie mit Phloroglucin-HCl, Kaliumjodid und Thionin gefärbt.

2.9. Bestimmung des Pektin- und Uronsäuregehaltes sowie des Esterifizierungsgrades des Pektins

Zur Absicherung, ob der Trockenschleim überwiegend aus Pektin besteht, wurde die Bestimmung des Esterifizierungsgrades (DE) nach dem Verfahren von KOOIMAN (1969) vorgenommen, indem die Säuregruppen des potentiellen Pektins titrimetrisch bestimmt wurden. Die Methoden wurden für kleine Proben modifiziert. Der Uronsäuregehalt wurde nach dem ASBOE-HANSEN–Verfahren bestimmt (LIST et al., 1985).

2.9.1. Bestimmung des Esterifizierungsgrades und des Pektingehaltes nach dem Titrationsverfahren

10 mg Trockenschleim wurden in 5 ml deionisiertem Wasser gelöst und gegen 0,01 mol/l NaOH titriert (a ml). Als Indikator diente Phenolphthalein. Danach wurde die Lösung mit 10 ml 0,01 mol/l NaOH versetzt und über Nacht stehengelassen. Danach wurde die Lösung gegen 0,01 mol/l HCl titriert (b ml). Der Esterifizierungsgrad (DE) und der Pektingehalt (P) ergeben sich nach folgenden Formeln:

$$DE\,[\%] = \frac{10 - b}{10 + a - b} \times 100\,; \quad P\,[\%] = \frac{a \times 17{,}6 + (10 - b) \times 19{,}0}{W} \times 100$$

W = Probengewicht [mg]

2.9.2. Bestimmung der Uronsäure

Die verwendete Methode erfasst den Messbereich zwischen 5 und 100 µg/ml Uronsäure. 2 bis 3 mg Trockenproben wurden mit 10 ml deionisiertem Wasser gelöst. Davon wurden 100 µl bzw. 100 µl der Calibrierlösungen in ein Eppendorf-Reagiergefäß pipettiert und 1,2 ml Natriumtetraborat-Schwefelsäure-Lösung hinzu gegeben. Danach wurde das verschlossene Gefäß 10 Minuten in kochendem Wasser erhitzt und anschließend sofort in einem Eisbad gekühlt. Weiterhin wurden 20 µl MHDP-Färbereagenz-Lösung zu pipettiert und der Ansatz mit einem Vibrationsmischer (Minishaker MS2, Ika) gemischt. Das Reagiergefäß wurde 10 Minuten auf Eis gelegt. Anschließend erfolgte die Extinktionsmessung des entstandenen violetten Farbstoffes bei 520 nm gegen Luft mit Hilfe eines Spektralfotometers (Ultrospec 3000, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, Großbritannien).

2.10. Nachweis der Monosaccharide der Hydrokolloide durch gaschromatografische Analyse

Die gaschromatografische Analyse der Hydrokolloide wurde nach dem Verfahren der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG „Untersuchung von Lebensmitteln – Nachweis von natürlichen Dickungsmitteln in Lebensmitteln, L 00.00 13“ (1986) durchgeführt. Statt α–Amylase-Lösung und Amyloglucosidase-Lösung wurde DMSO zum Abtrennen der Stärke (Franz, 1991) verwendet.

2.10.1. Reinigung der Hydrokolloide junger und ausgewachsener Blätter

50 mg Trockenhydrokolloide (s. Kapitel 2.7.1) wurden in 50 ml Wasser durch Erwärmen gelöst. Die gelösten Hydrokolloide wurden mit 96 %igem Ethanol gefällt

und mit 5000 U/min 20 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wird künftig als Pellet a bezeichnet. Zum Reinigen der Hydrokolloide der jungen Blätter wurden die von 500 µl Blattextrakt gewonnenen Pellets (s. Kapitel 2.7.2) verwendet, die als Pellet b bezeichnet werden. Anschließend wurden Stärkereste und Proteine abgetrennt.

Abtrennung von Stärke

Das Pellet a wurde in 20 ml 90 %iges DMSO gelegt und 15 Stunden gerührt, wobei es sich löste. Anschließend wurde die gesamte Fraktion mit 96 %igem Ethanol im Überschuss versetzt und zentrifugiert. Das Präzipitat wurde erneut mit Ethanol gewaschen und bei 5000 U/min 10 Minute zentrifugiert. Zu dem Pellet b wurde 1 ml DMSO zugegeben und 15 Stunden gerührt. Danach wurde die Lösung dreimal mit 96 %igem Ethanol behandelt, das Hydrokolloid gefällt und bei 5000 U/min 10 Minuten zentrifugiert. Erneut wurde das Gel mit Ethanol gewaschen und zentrifugiert.

Lösen des vorgereinigten Pektins

Das Pellet a wurde in ein Becherglas überführt und in 40 ml warmem Wasser gelöst. Nach dem Abkühlen wurden einige Tropfen Phenolphthalein-Lösung und 0,1 mol/l NaOH zugegeben. Danach wurde die Lösung mit 0,1 mol/l HCl neutralisiert und als Hydrokolloid-Lösung a bezeichnet. Das Pellet b wurde in 500 µl heißem deionisiertem Wasser gelöst und die Lösung mit 50 µl 0,1 mol/l NaOH und 1 Tropfen Phenolphtalein-Lösung versetzt. Danach wurde die Lösung mit 0,1 mol/l HCl neutralisiert und als Hydrokolloid-Lösung b bezeichnet. Sie wurde zur Abtrennung der Proteine eingesetzt.

Abtrennung der Proteine

2 ml gesättigte NaCl-Lösung und 4 ml 5-Sulfosalicylsäure-Lösung wurden zu der neutralisierten Hydrokolloid-Lösung b hinzugefügt und 15 Minuten stehen gelassen. Danach wurde sie 10 Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen kleinen Glastrichter, in dessen Auslauf ein kleiner Quarzwatte-Pfropfen steckte, in einen 50 ml Kolben filtriert. Der Kolben wurde mit deionisiertem Wasser zur Marke aufgefüllt. Die klare Lösung wurde anschließend nach den Kapiteln 2.10.2 und 2.10.3 bearbeitet.

2.10.2. Hydrolyse und Derivatisierung der Hydrokolloide

Optimierung der Derivatisierung der Referenzsaccharide

In den Reagenzgläsern mit Verschluss (Gl-14-System, Schott) wurden je 100, 200, 300, 400 und 500 µl der Referenzsaccharid-Lösung pipettiert. Die Lösungen wurden im Vacuumofen bei 50 °C und 20 mbar über Nacht getrocknet. Zu jeder getrockneten Saccharidprobe wurde 1 ml 0,5 mol/l methanolische Salzsäure hinzu gegeben und im Trockenschrank 4 bis 8 Stunden auf 100 °C erhitzt.

Nach dem Abkühlen wurden 50 µl Pyridin und 1 ml Referenzsaccharid-Lösung für die Gaschromatografie hinzu pipettiert und mittels Rotationsverdampfer (Labo Rota SE 320, Resona Technics, Switzerland) bei 40 °C getrocknet. Für die Trimethylsilylierung wurden zu jeder Probe 200 µl Pyridin, 300 µl BSA, 100 µl Chlortrimethylsilan und 400 µl 1,1,2-Trichlortrifluorethan gegeben. Dann wurden die Reagensgläser verschlossen, kurz geschüttelt und im Trockenschrank 3 Stunden bei 60 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung gaschromatografiert.

Hydrolyse der Hydrokolloide

400 µl der Hydrokolloid-Lösung ausgewachsener Blätter (siehe Kapitel 2.7.1) wurden in Reagenzgläser mit Verschluss pippetiert. Für die gelösten Hydrokolloide junger Blätter (Kapitel 2.7.2) wurde die gesamte Lösung benötigt. Die Lösungen wurden weiter so behandelt wie die Referenzsaccharid-Lösungen (s. dieses Kapitel oben). Statt 1 ml 0,5 mol/l wurde 1 ml 2,0 mol/l methanolische Salzsäure benutzt.

Derivatisierung der Hydrokolloide

Die Derivatisierung der Hydrokolloide erfolgte analog zu den Referenzsacchariden.

2.10.3. Gaschromatografie der Referenzsaccharide und der Hydrokolloide

Die Trennung erfolgte an einem Gaschromatographen HP 5890 (Hewlett Packard, USA), der mit einem Flammenionisationsdetektor, Autosampler (HP 7673A), Integrator (HP 3396A) und einem Controller (HP 7673A) ausgerüstet war. Zur Trennung wurde eine 30 m Fused silica Kapillarsäule (DB 5, 0,25 mm innerer Durchmesser, 0,25 µm Filmdicke, J&W Scientific, Folsom, Kalifornien) verwendet. Wasserstoff wurde mit dem Wasserstoff-Generator UHP-60H (Nitrox, Willich)

erzeugt, Stickstoff mit dem Stickstoff-Generator UHPA 3000 (Nitrox, Willich) und synthetische Luft mit dem Null-Luft-Generator UHP-75ZA (Domnick Hunter GmbH, Willich). Als Trägergas diente Helium 4.6 (Air Liquide, Düsseldorf). Die Injektion erfolgte splitlos nach GROB und GROB, 1972; das Splitventil wurde 45 s nach der Injektion geöffnet.

GC-Bedingungen:

Injektor-Temperatur:		220 °C
Detektor-Temperatur:		220 °C
Injektionsvolumen:		1 µl, splitlos
Temperatur-Programm:	Starttemperatur:	120 °C, 1 min
	Heizrate:	2 °C/min
	Endtemperatur:	210 °C
Trägergas:	Helium:	1 ml/min
Purgegas:	Stickstoff:	29 ml/min
Brenngase:	Wasserstoff:	30 ml/min
	synthetische Luft:	350 ml/min

3. Ergebnisse

3.1. Blattanatomie

3.1.1. Blattstiel

Im Querschnitt weist der Blattstiel eine nahezu flache Oberseite und einen sphärischen Unterteil auf. Er besteht aus einem Abschlussgewebe mit Drüsen- und Borstenhaaren, Kollenchymschichten, Rindengewebe, Sklerenchymzellen sowie Leitbündeln und Zentralparenchym.

Die äußeren tangentialen Wände der Epidermiszellen und ihre Kutikula bilden eine wellige Oberfläche. Sie bestehen aus dünnen Cutinlamellen, die entweder rötlich mit Sudan III, gelblich bis rötlich mit Safranin-Astrablau, farblos mit Rutheniumrot oder gelb-grünlich mit Primulin reagieren (Abbildung 2). Darunter liegen relativ dicke Zellwandbereiche, die bläulich mit Astrablau beziehungsweise rosa bis rot mit Thionin reagieren. Die Pektine lassen sich als Bestandteile der Zellwand nachweisen. Durch Färbung mit Rutheniumrot färben sie sich rosarot. Mit Hydroxylamin-$FeCl_3$-Lösung werden sie orange bis braun gefärbt. Die Anwesenheit von Pektinen in den radialen Wänden und in den inneren tangentialen Wänden lassen sich so ebenfalls nachweisen. Die äußeren tangentialen Epidermiswände am Stielanfangs weisen eine mittlere Dicke von 8 µm (n = 20; Min. = 6 µm; Max. = 10 µm; Std. = +/-1 µm) auf. Die mittlere Fläche der Epidermiszellen beträgt 330 µm² (n = 20; Min. = 170 µm²; Max. = 520 µm², Std. = +/-100 µm²), der mittlere Umfang beträgt 70 µm (n = 20; Min. = 50 µm; Max. = 90 µm, Std. = +/-10 µm).

Die Epidermiszellformen der Stielmitte (Sm) und des Stielendes (Se) sind sehr unterschiedlich. So sind mehr tangential lang gestreckte Zellen zu finden. Ihre Zellfläche in der Stielmitte betragen durchschnittlich 390 µm² (n = 20; Min. = 160 µm²; Max. = 705 µm²; Std. = +/-150 µm²). Ihre Zellumfänge liegen bei durchschnittlich 80 µm (n = 20; Min. = 50 µm; Max. = 110 µm; Std. = +/-15 µm). Am Stielende erreichen die Epidermiszellflächen einen mittleren Wert von 380 µm² (n = 20; Min. = 220 µm²; Max. = 550 µm²; Std. = +/-100 µm²). Der Epidermiszellumfang beträgt durchschnittlich 80 µm (n = 20; Min. = 60 µm; Max. = 90 µm; Std. = +/-10 µm). Die Epidermiszellen liegen parallel nebeneinander. In manchen Fällen befinden sich

einige Zellen jedoch in der obersten Schicht des Kollenchyms. Die Drüsenhaare sind mehrzellig. Sie bestehen aus einzelligen Basis- und Stielzellen sowie einer Kopfzelle.

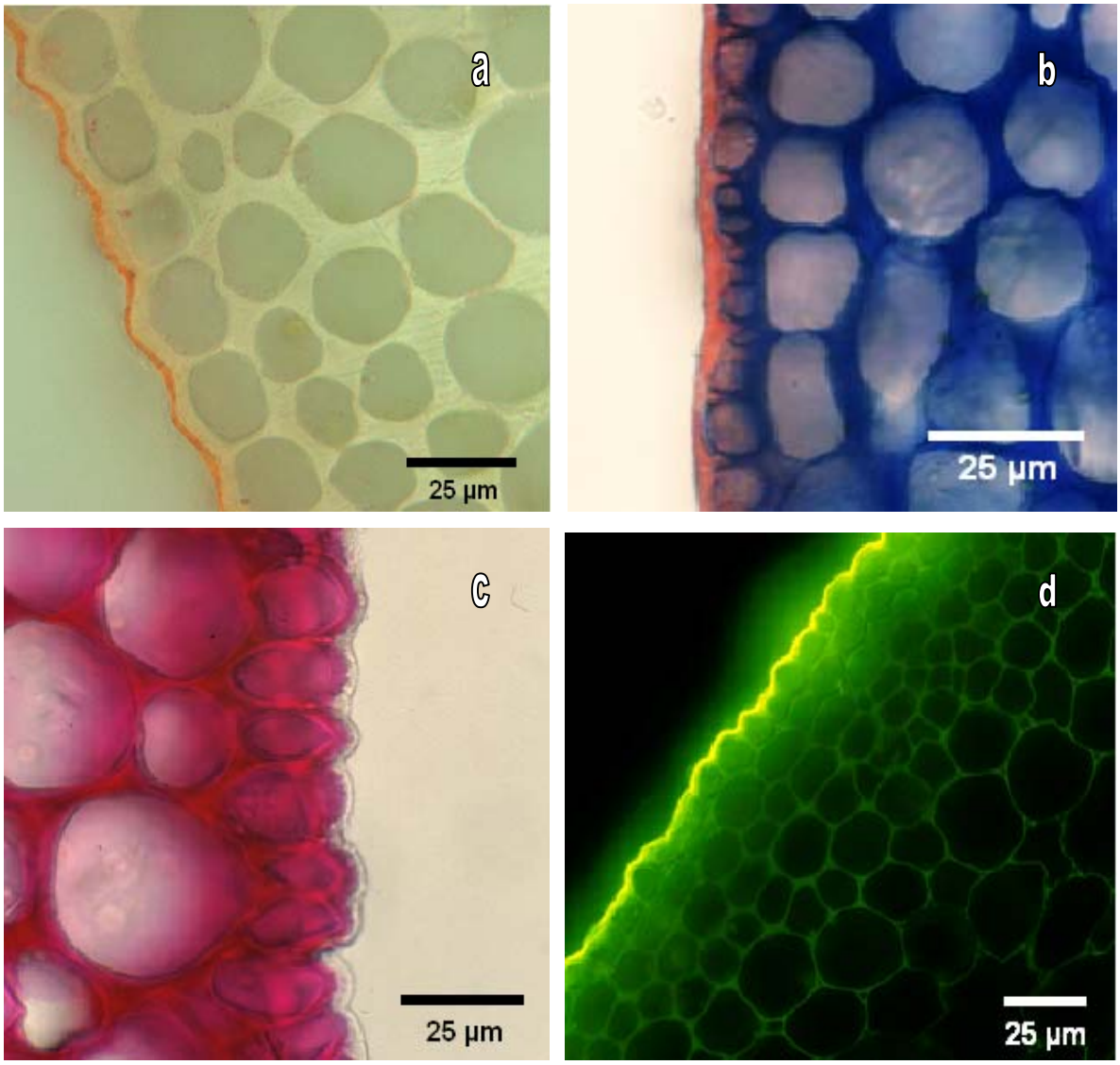


Abbildung 2: Cuticula von *Premna oblongata,* gefärbt mit a) Sudan III, b) Safranin-Astrablau, c) Rutheniumrot, d) Primulin, Fluoreszenzlichtmikroskopie

Die inneren tangentialen Wände der Basiszelle sind in der ersten Schicht des Kollenchymgewebes eingebettet. Die äußeren tangentialen Wände liegen in der Epidermisebene. Die tangentialen Außenwände der Kopfzelle sind normalerweise entweder flach oder nach außen hin gewölbt. Pektinartige Substanzen wurden in den Wänden der Basis-, Hals- und Kopfzellen nachgewiesen; sie reagieren rosarot bis hellbraun mit Rutheniumrot. Die mehrzelligen Borstenhaare bestehen aus bis zu 16 Zellen, wobei die einzelnen Zellen unterschiedlich groß sind. Sie werden von einigen

Epidermiszellen unterstützt. Normalerweise liegen die inneren tangentialen Wände der Basiszelle niedriger als die äußeren tangentialen Wände der benachbarten Epidermiszellen. Die Außenseiten der Radialwände sind flach, während die Innenwände wellig sind. Bemerkenswert sind die Borstenhaare bei jungen Blättern und Blattknospen. Auf der Basis der Knospen und beim Übergang vom Stiel zur Lamina sind bei jungen Blättern zahlreiche rötliche Borstenhaare zu finden (Abbildung 3a)), die während der Blattentwicklung ihre rötliche Farbe verlieren. Im Gegensatz dazu sehen Zellen an der Haarspitze meistens rötlich aus. Die Basiszellen wiederum sind ebenfalls farblos. Rötliche Drüsenhaare sind selten (Abbildung 3 b)). An der Basis der Knospe sind Drüsenhaare und Borstenhaare zu finden. In ihrer Entwicklung sind sie auf der Blattoberseite weniger verbreitet. Auf der Oberseite ausgewachsener Blätter findet man fast keine Borstenhaare mehr.

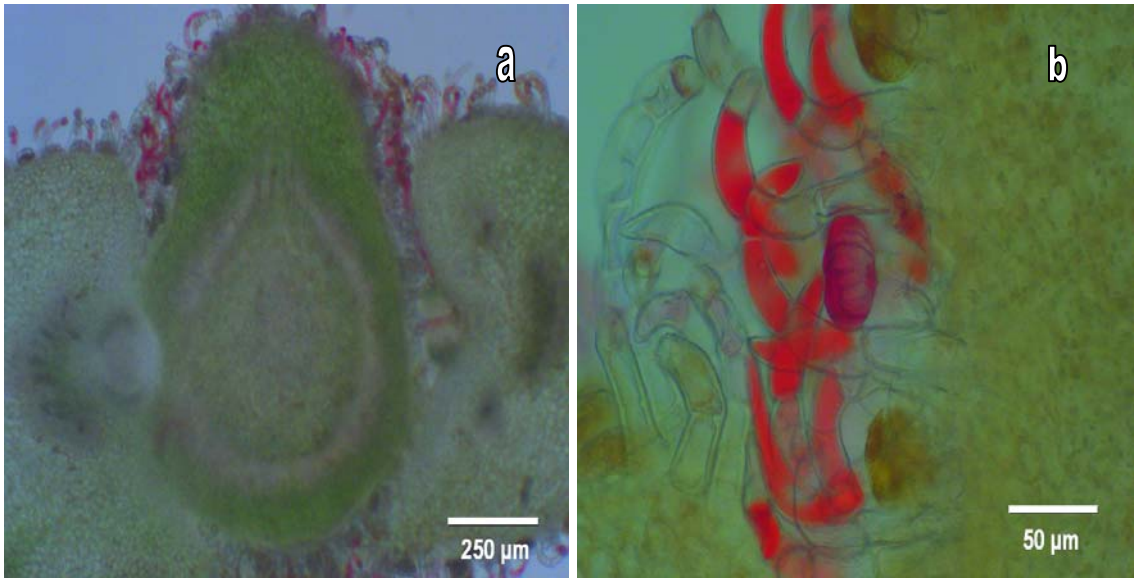


Abbildung 3: 100 µm dicker Querschnitt einer *Premna oblongata*-Blattknospe a) Drüsen- und Borstenhaare sind auf der Blattbasis verteilt; b) rötliche Drüsen- und Borstenhaare

Auf die Epidermis folgt ein bis zu 3 Schichten starkes Eckenkollenchym, dessen Zellen in Richtung Stielmitte an Größe zunehmen. In manchen Fällen sind die Wände miteinander verzahnt. Insgesamt bilden sie eine keilförmige Grenzregion. Dieses Phänomen ist sowohl zwischen den tangentialen Wänden als auch den radialen Wänden zu finden und auch zwischen der Epidermis und dem Kollenchym. Die Mittellamelle färbt sich dort mit Rutheniumrot rosa.

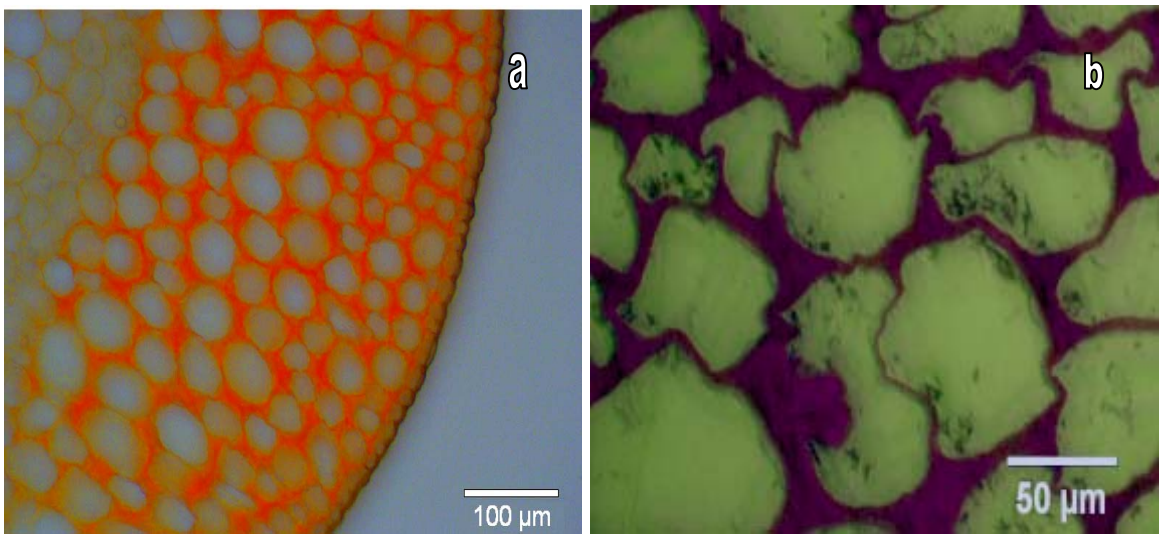


Abbildung 4: a) 100 µm dicker Querschnitt eines Blattstiels mit Hydroxylamin-$FeCl_3$-Lösung gefärbt; b) keilförmige Grenze zwischen Zellwänden (1 µm dick; mit Thionin gefärbt)

Die Wandverdickung ist reich an Pektinen und färbt sich rosarot mit Rutheniumrot. Der Interzellularraum ist kaum zu sehen. Die stärkste Färbung liegt ungefähr in der Mitte des ehemaligen Interzellularenrestes. Durch Färbung mit Hydroxylamin-$FeCl_3$-Lösung reagieren die Wände orange bis braun (Abbildung 4a)). Es wurden die Lumenflächen der Kollenchyme mit Hilfe eines Rasters von 100 µm x 100 µm vermessen, um die Anteile an Zellwand und Interzellularen in ausgesuchten bestimmten Eckenkollenchymflächen zu ermitteln. Sie bestehen zu 62 % aus Lumen und zu 38 % aus Zellwänden und den Interzellularen (n = 15).

An der Stielmitte (Sm) kann man die keilförmigen Grenzwände besser zwischen den radialen Wänden des Kollenchyms erkennen (Abbildung 4b)). Besonders gut sind sie in den äußeren Schichten zu sehen. Am Stielende (Se) ist die keilförmige Grenze vor allem zwischen den tangentialen Wänden erkennbar. Runde Zellformen herrschen hier vor. Die Wände und ihre eckigen Verdickungen sind stark rot mit Rutheniumrot gefärbt. Der Übergang zwischen dem Eckenkollenchym und dem Rindenparenchym wird durch mehrere kleine Interzellularen und Zellen mit verdickten Wänden gebildet. Pektinartige Substanzen bilden von der Zellgrenze hin in Richtung der Interzellularen Ausstülpungen. Sie reagieren rötlich bis bräunlich nach Rutheniumrotfärbung. Mit Hydroxylamin-$FeCl_3$-Lösung färben sie sich orange bis braun.

An das Kollenchym schließt sich das Rindenparenchym an. In Richtung Zentralparenchym ändert sich die Zellgröße, die Anzahl und Größe der Interzellularen, Wandformen sowie ihr Verhalten gegenüber Farbstoffen. Am Stielanfang besitzen die Zellen der äußersten Schichten des Rindenparenchyms kreisrunde Form. Die Interzellularen sind häufig. Nach innen hin werden die Zellen größer, ihre Wände welliger und dünner. Sie reagieren weniger rötlich gegen Rutheniumrot. In der Nähe der Leitbündel werden die Zellen kleiner. Außerdem zeigen die Zellwände gegen Hydroxylamin-$FeCl_3$-Lösung sehr unterschiedliche Reaktionen. Sowohl die angrenzenden Wände als auch die Wandteile neben den Interzellularen der äußeren Schichten färben sich orange. In Richtung des Zentralparenchyms sind die Zellwände nur schwach mit Hydroxylamin-$FeCl_3$-Lösung anfärbbar. Den stärksten Orangeton erhält man neben den Interzellularen. In der Stielmitte sind die Wände dünner und sie reagieren nur noch mit den Farbstoffen. Reaktionen mit Rutheniumrot zeigen einen Rosafarbton. Mit Hydroxylamin-$FeCl_3$-Lösung reagieren sie farblos bis gelblich. Rindenparenchymzellen des Stielanfangs erreichen eine mittlere Fläche von 2900 µm² (n = 20; Min. = 850 µm²; Max. = 6500 µm²; Std. = +/-1300 µm²) und einen mittleren Umfang von 200 µm (n = 20; Min. = 110 µm; Max. = 310 µm; Std. = +/-40 µm). Der Anteil der Zellwand in diesem Bereich beträgt 24 % und der Anteil des Lumens 76 % (n = 20, 100 µm x 100 µm-Raster).

Neben den Haupt- und Nebenleitbündeln lässt sich eine Gruppe von parenchymatischen Zellen finden, deren Zellenformen und Größe sowie deren Reaktionen gegen Farbstoffe deutlich von Rindenparenchymzellen zu unterscheiden sind. Sie sind kleiner als Rindenzellen und haben verdickte Wände. Zudem besitzen sie kaum Interzellularen. Die Wände und der Interzellularrest sind stark mit Rutheniumrot oder Hydroxylamin-$FeCl_3$ färbbar. Durch sekundäres Wachstum werden sie zum getüpfelten Sklerenchymgewebe umgewandelt. Am Stielanfang sind Sklerenchymzellen nur selten zu beobachten. Sie sind gelb-rötlich, ihre Mittellamellen und ihr Interzellularrest erscheinen stark rötlich nach Färbung mit Rutheniumrot aber kontrastarm. In der Stielmitte sind sie kontrastreich und gelblich anfärbbar; Mittellamelle und Interzellularrest erscheinen rötlich. Abbildung 5 zeigt Rindenparenchymzellen nach verschiedenen Anfärbungen.

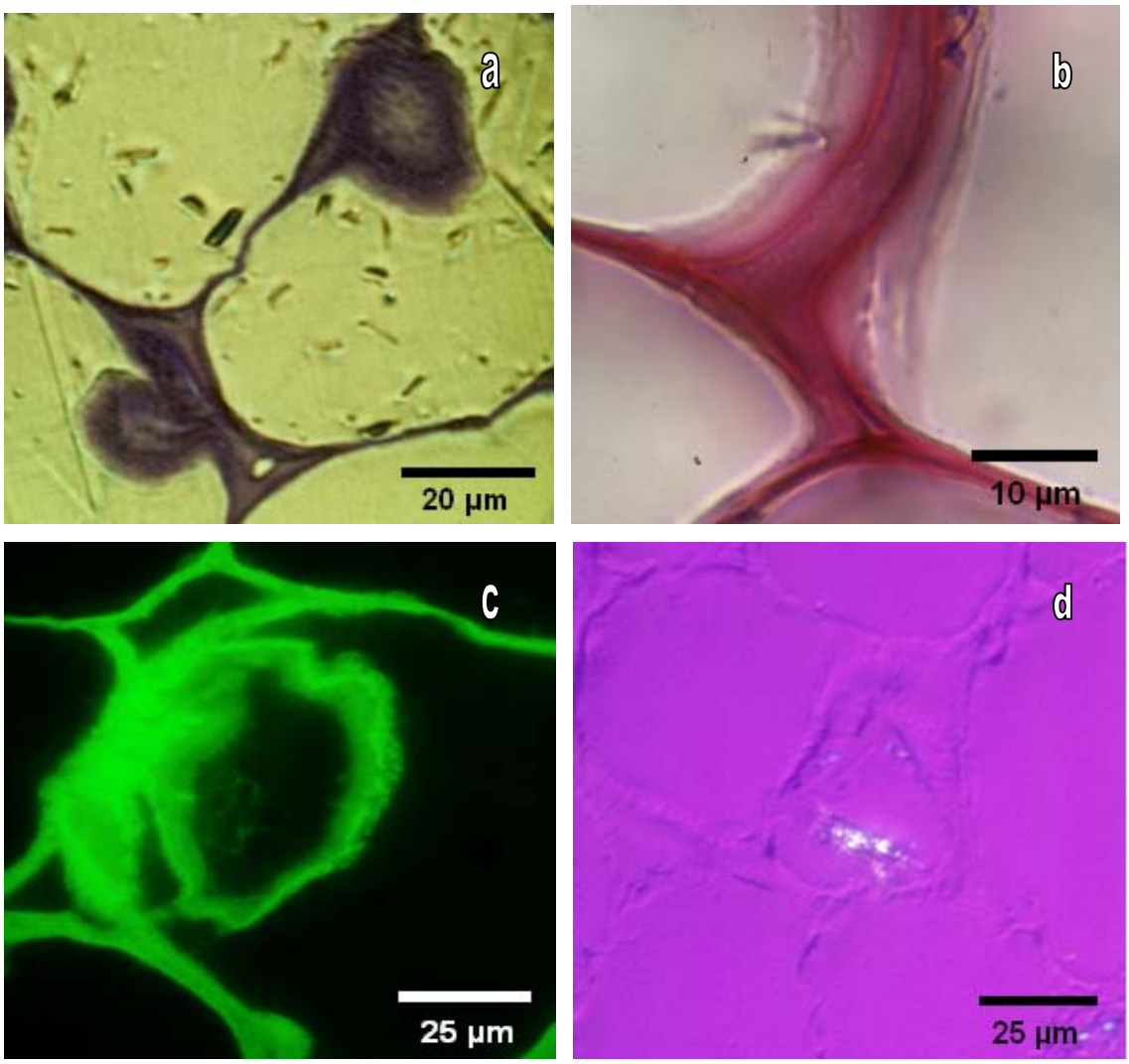


Abbildung 5: Rindenparenchym-Schichten sind mit a) Thionin, b) Rutheniumrot und c) Primulin gefärbt. d) ist ein farbloser 1 µm dicker Schnitt; das Licht ist polarisiert und invertiert.

Vor dem Leitbündel sind einige Gruppen von Parenchymzellen zu finden, die am Anfang kontrastreicher als andere Parenchymzellen hervortreten; sie färben sich stark rosarot mit Rutheniumrot. Ihre Zellwände sind dicker geworden und sie wurden schließlich zu Sklerenchymzellen umgewandelt. Am Ende schließen sie sich zu Bündelscheiden zusammen. In manchen Fällen wachsen die Sklerenchymzellen in die Phloemgewebe hinein. 68 % der vermessenen Fläche bestehen aus Zellwand und 32 % aus Zelllumen.

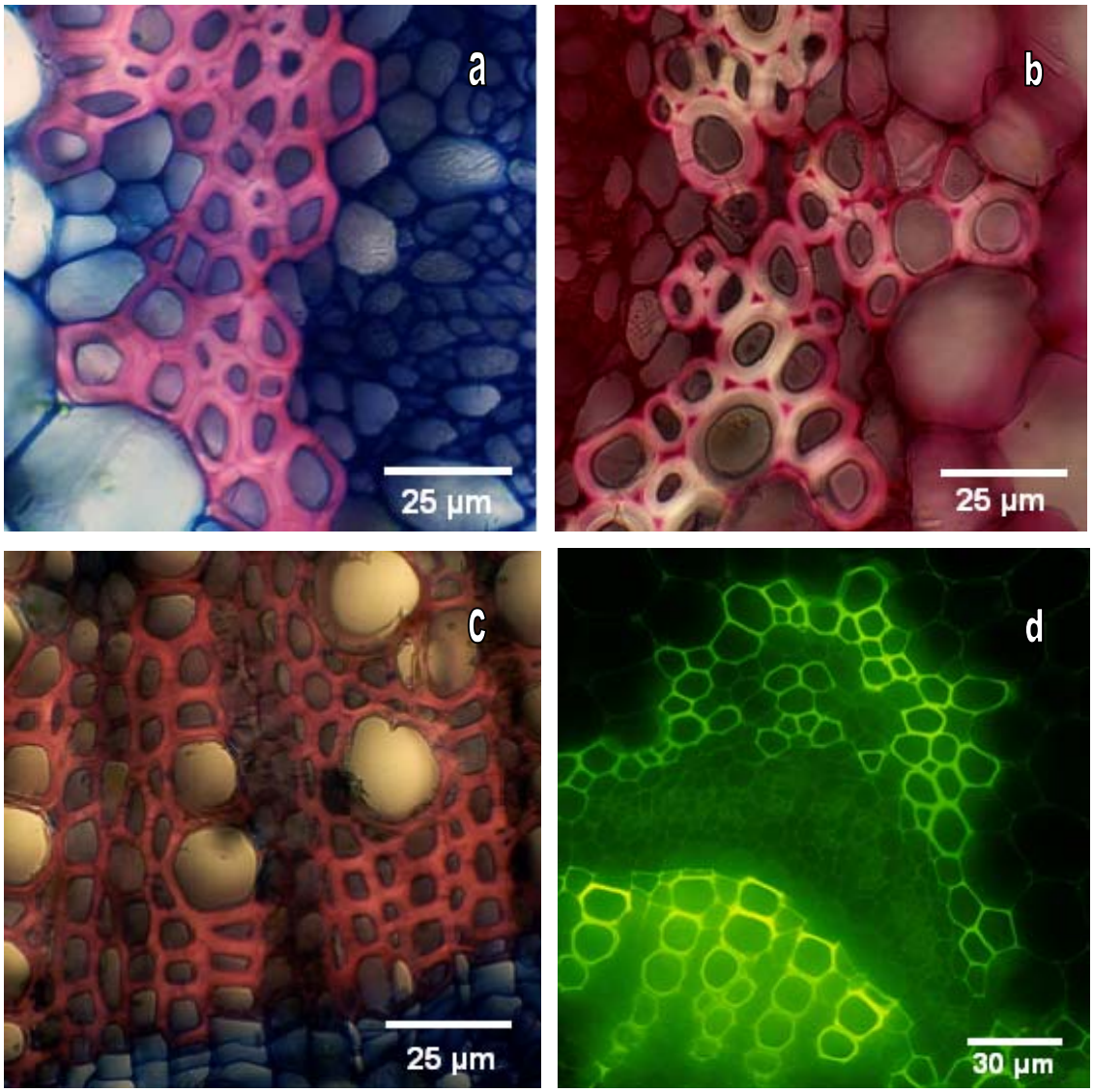


Abbildung 6: Sklerenchymzellen sind mit a) Safranin–Astrablau und b) Ruthenium rot gefärbt; c) zeigt die Xylemgefäße und die Sklerenchymzellen gegen Safranin-Astrablau; d) zeigt die Sklerenchymzellen und Xylemgefäße mit Primulin gelbgrün gefärbt.

Sklerenchym reagiert rötlich gegen Safranin-Astrablau und gelbgrün fluoreszierend gegen Primulin (Abbildung 6).

Die Leitbündel sind am Stielanfang und in der Stielmitte zu einem Hauptbündel und mehreren kleinen Bündeln angeordnet. Sie schließen sich in Richtung des mittleren Bereiches - zwischen Stielanfang und -ende - zusammen. Das Hauptbündel sieht halbmondähnlich aus. Auf ihm liegen noch zusätzlich mehrere allein stehende, nebeneinander oder hintereinander liegende kleine Bündel. Sie liegen ungefähr innerhalb der oberen Halbebene des Stiels. Die Hauptbündel des Stielanfangs sind offen, von der oberen Seite des Stiels lassen sich Rindenparenchym und

Zentralparenchym nicht trennen. Das Zentralparenchym ist ungefähr in der Stielmitte vollständig vom Leitbündel eingeschlossen. Anschließend verzweigen die Leitbündel sich am Übergang zur Lamina zu einem Hauptbündel und mehreren kleinen Bündeln. Das Zentralparenchym ist wieder offen.

Phloem liegt auf der äußeren Seite des Xylems. Die abwechselnden dicken und dünnen Schichten bilden eine wellige Bande, deren äußere Seite stärker gewellt ist als die innere. Die Zellen sind unregelmäßig geformt. Phloemzellen unterscheiden sich in Größe, Durchlässigkeit des Zellenrestes gegen Licht und Reaktion ihrer Wände gegen Farbstoffe sowie im Querschnitt von Xylem- und Rindenparenchymzellen. Im Allgemeinen sind ihre Zellen kleiner und ihre Zellenreste dunkler als die des Rindenparenchyms und Xylems. Sie erreichen einen mittleren Flächenwert von 75 µm² (n= 20, Min. = 15 µm²; Max. = 210 µm²; Std. = +/-45 µm²). Ihre Umfangswerte betragen durchschnittlich 30 µm (Min. = 15 µm; Max. = 55 µm; Std. = +/-10 µm). Interzellulare sind lichtmikroskopisch nicht erkennbar. Im Gegensatz dazu sind ein oder mehrere Schichten von Kambium erkennbar, deren tangentiale Wände länger als die radialen Wände sind; sie sind rötlich mit Rutheniumrot gefärbt. Das Hauptphloem am Stielanfang besteht aus mehreren nebeneinander liegenden Zellgruppen, deren Zellwände gegen Rutheniumrot stark rosarot gefärbt sind. Dagegen sind die zwischen diesen Zellgruppen liegenden parenchymatischen Zellen größer und ihre Wände nicht ganz so rot. Bei allein-stehenden Nebenbündeln wird das Xylem möglicherweise vollständig vom Phloem umschlossen; es gibt kein Zentralparenchym. Die hintereinander liegenden Neben-bündel sind durch einige Rindenparenchymzellen getrennt. Auf der äußeren Seite des Phloems sind mehrere Zellgruppen eingerichtet, die als Vorstufe für die Sklerenchymzellen dienen. Im Bereich der Stielmitte bildet das Hauptphloem eine kontinuierliche Zone. Das Nebenphloem liegt eng neben dem Hauptphloem. Nur an einigen Stellen sind sie von einer oder mehreren großen parenchymatische Zellen getrennt. Ihre Zellwände reagieren stark rötlich mit Rutheniumrot. Am Stielende sind Phloem in Haupt- und Nebenphloem unterteilt. Im allein stehenden Bündel ist die Zentralparenchymzone stärker rötlich gefärbt gegen Rutheniumrot als beim Hauptbündel.

Das Xylem ist in Hauptxylem und kleinere Xylemstränge unterteilt. Am Stielanfang sind sie noch nicht komplett differenzierbar. In diesen Regionen liegen die Gefäße solitär oder nebeneinander, aber nicht kontinuierlich, so dass sie dort

keinen perfekten Strang bilden. Meistens sind nur die schraubenförmigen Gefäße zu finden; Tüpfelgefäße sind nicht zu erkennen. Einige Gefäße enthalten noch Chloroplasten. Die Zellwände sehen gelblich bis rötlich aus, wenn sie mit Rutheniumrot gefärbt sind. Die Anfangsphase der Gefäßentwicklung ist durch die meist sehr stark mit Rutheniumrot gefärbten Verdickungen der Parenchymzellwände gekennzeichnet. In dieser Phase sind die Zellinhalte noch vorhanden und relativ dunkel und kontrastarm erkennbar. Danach werden die Wände gelblicher und kontrastreicher. Das Zelllumen ist weit. Die vor dem Phloem liegenden Xylemgefäße sind kleiner, werden in der Gewebemitte aber größer, um an der Grenze zum Zentralparenchym wieder kleiner zu werden. Xylemgefäße in diesem Bereich zeigen eine mittlere Fläche von 560 µm² (n = 20; Min. = 250 µm²; Max. = 1050 µm²; Std. = +/-210 µm²). Ihre Umfänge betragen durchschnittlich 90 µm (n = 20; Min. = 60 µm; Max. = 125 µm; Std. = +/-20 µm). Die Lumenfläche beträgt im Mittel 270 µm² (n = 20; Min. = 130 µm²; Max. = 490 µm²; Std. = +/-110 µm²), der Umfang durchschnittlich 65 µm (n = 20; Min. = 45 µm; Maximal = 90 µm; Std. = +/-15 µm). Somit nehmen die Gefäßwände einen Anteil von 50 % der gesamten Gefäßfläche ein. In der Stielmitte sind die Xylembereiche stärker entwickelt; ihre Parenchymzellen sind meistens zu Sklerenchymzellen umgewandelt. Die Zellwände sind verholzt und sehen gelblich und kontrastreich aus. Die Gefäße reagieren rötlich gegen Safranin-Astrablau und fluoreszieren gelb-grünlich gegen Primulin (Abbildung 6c) und 6d)). Die jungen Gefäße liegen meistens an der Grenze zum Zentralparenchym, dessen Zellwände noch reich an Pektin sind. In der Abbildung 7 sind Schrauben- und Tüpfelgefäße zu sehen. Ihre Tüpfel haben eine mittlere Fläche von 1,3 µm² und einen mittleren Umfang von 4,7 µm. Xylemgefäße haben eine mittlere Fläche von 450 µm² (n = 20; Min. = 194 µm²; Max. = 850 µm²; Std. = +/-180 µm²). Ihre mittleren Umfänge betragen 60 µm (n = 20; Min. = 40 µm; Max. = 80 µm; Std. = +/-10 µm). Ihre Lumenflächen erreichen mittlere Werte von 300 µm² (n = 20; Min. = 90 µm²; Max. = 670 µm²; Std. = +/-150 µm²); d.h., Gefäßwände nehmen einen Anteil von ca. 30 % der gesamten Gefäßfläche ein, am Stielende sind es 33 %.

In der Regel liegen neben den Gefäßzellen Parenchymzellen. Man kann sie besonders gut in der Stielmitte und am -ende betrachten. In diesen Bereich reagieren die Zellwände ebenfalls rötlich mit Rutheniumrot.

Anschließend kommt man zu dem Zentralparenchym. Tüpfel sind nicht in allen Bereichen lichtmikroskopisch zu finden. Sie sind selten im Zentralparenchym des

Stielanfangs zu finden. Sie tauchen überwiegend in der Stielmitte und am -ende auf. Während am Stielanfang die Wände sich vollständig rötlich mit Rutheniumrot färben, sind in der Stielmitte und am -ende Zellwände nur neben dem Interzellulär stärker gefärbt. Der übrige Grenzbereich zwischen den Zellen bleibt farblos oder nur leicht rötlich gefärbt. Die dickeren Bereiche der Wände sind meistens in der Nähe des Interzellulär zu sehen. Am Stielanfang haben die Zellen eine mittlere Fläche von 3100 µm² (n = 20; Min. = 390 µm²; Max. = 8400 µm²; Std. = +/-2300 µm²). Ihre Umfänge betragen durchschnittlich 200 µm (n = 20; Min. = 80 µm²; Max. = 350 µm²; Std. = +/-80 µm²).

Im Längsschnitt sind die Epidermisradialwände des Stielanfangs in der Regel kürzer und dünner als die tangentialen Wände. Die Zellen sind tangential gestreckt. Mit Rutheniumrot reagieren sie rosarot. Im Bereich der Stielmitte dominieren die tangential-länglichen Zellen nicht mehr. Trotzdem bleiben die beiden tangentialen Wände dicker und pektinreicher als die radialen. Weiterhin sind die bis zu 3 schichtigen Kollenchymgewebe im Längsschnitt zu beobachten. Die Zellen des Stielanfangs, der Stielmitte und des Stielendes sind meistens tangential länglich. Außerdem sind die tangentialen Wände stärker getüpfelt als die radialen Wände. In den weiteren Schichten in Richtung des Zentralparenchyms nehmen die Zellen an Größe zu. Die Wände neben dem Interzellulär sind verdickt. Die Wände und ihre Interzellulärreste färben sich sehr stark rötlich mit Rutheniumrot. Im Übergang zum Rindenparenchym finden sich Interzellularen.

Die Zellen des Rindenparenchyms sind polyedrisch geformt. Am Stielanfang sind die Zellen bis zur Grenze des Sklerenchyms mehr oder weniger tangential länglich. Im Bereich der Stielmitte ändert sich die Form von tangential länglich zu radial länglich. Die Wände sehen welliger aus, Wandverdickungen neben dem Interzellulär sind keine Seltenheit.

Im Sklerenchymgewebe sind die Zellen im Längsschnitt tangential gestreckt. Während ihre tangentialen Wände verdickt sind, bleiben die radialen Wände dünn. Die tangentialen Wände sind außen stärker gewellt als innen. Am Stielanfang sind die tangentialen Wände rötlich gegen Rutheniumrot und die Tüpfel lichtmikroskopisch kaum erkennbar. Durch Ablagerung von Lignin sind die tangentialen Wände der Stielmitte und am Stielende gelblicher gefärbt als die radialen Wände. Sie bleiben rötlich nach der Behandlung mit Rutheniumrot. Dieser Bereich der tangentialen Wände ist stärker getüpfelt.

Das Phloem besteht aus tangential länglichen, parenchymatischen Zellen und Siebzellen. Die Wände färben sich rötlich gegen Rutheniumrot. In dem mittleren Bereich des Stiels sind einige Zellen zu Sklerenchymzellen umgewandelt, deren Wände zum Teil rötlich und gelblich sind. Eine Tüpfelung zwischen den Zellen ist lichtmikroskopisch nicht zu erkennen.

Das Xylem besteht aus tangential länglich-parenchymatischen Zellen und getüpfelten Sklerenchymzellen, sowie einigen in verschiedenen Entwicklungsstadien befindlichen Schraubengefäßen. Am Stielanfang sind die Wände der Parenchymzellen dünn und nicht verholzt; sie färben sich rötlich gegen Rutheniumrot. In der Mitte und am Stielende sind einige Parenchymzellen zu getüpfelten und verholzten Sklerenchymzellen umgewandelt, deren Wände weniger stark mit Rutheniumrot reagieren. Die Farbe ändert sich von rötlich zu gelblich. Es gibt Schrauben- und Tüpfeltracheiden (Abbildung 7).

Zentralparenchymzellen haben im Längsschnitt polyedrische Formen. Am Stielanfang sind die Wände relativ wellig, während in der Stielmitte diese Wellenform abnimmt. Die Zellen neben dem Xylem sind tangential länglich. In der Stielmitte sehen die radialen Wände länger aus als die tangentialen. Am Stielende werden sie wieder kürzer und welliger. Am Stielanfang färben sich die Wände stark rötlich mit Rutheniumrot, in der Stielmitte schwächer. Am Stielende nimmt der rötliche Farbton dann wieder zu. Die getüpfelten Zellen sind lichtmikroskopisch an der Stielmitte besonders gut zu erkennen. Sie behalten zudem ihre Chloroplasten.

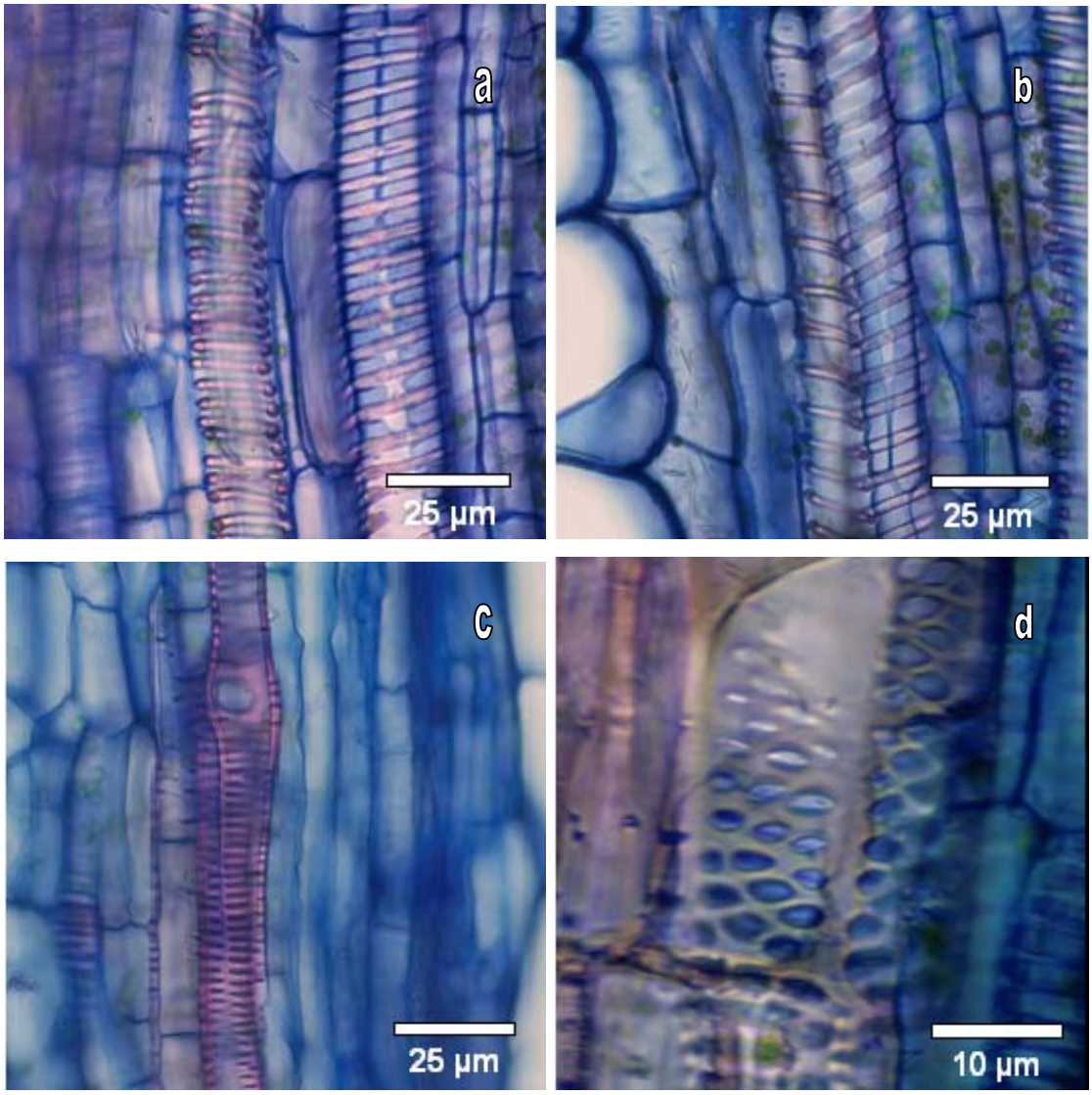


Abbildung 7: mit Thionin gefärbte Xylemgefäße: a) parallel verlaufende Gefäße zwischen Parenchymzellen liegend; b) 2 nebeneinander liegende Gefäße; das eine ist links, das andere rechts gedreht; c) Netztracheide mit Schlitztüpfel; d) Netztracheide, vergrößert.

Das *Premna oblongata*-Blatt ist reich an nadelförmigen Kristallen. Diese sind in der Epidermis, im Kollenchym und in den Rinden- und Zentralparenchymzellen zu finden. Ihre durchschnittliche Länge beträgt 27 µm (n = 20; Min. = 14 µm; Max. = 52 µm; Std. = +/-9 µm). Die nadelförmigen Kristalle erreichen eine mittlere Dicke von 5 µm (n = 20; Min. = 3 µm; Max. = 7 µm; Std. = +/-1 µm). Abbildung 8 zeigt die mit unterschiedlichen Lichtquellen mikroskopierten Kristalle. In Abb. 8a) wurde linear polarisiertes Licht verwendet einschließlich eines Blaufilters. Die Chloroplasten

bleiben grünlich und die Kristallen erscheinen reliefartig. Abb. 8b) zeigt die Kristalle wie 8a) nur weiter invertiert. Hier sehen die Chloroplasten violett aus.

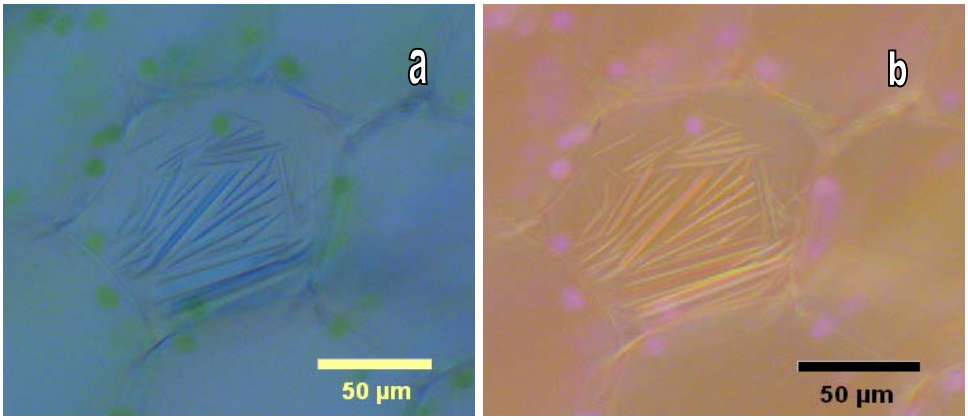


Abbildung 8: Rindenparenchymzellen mit nadelförmigen Kristallen, a) linear polarisiertes Licht mit Blaufilter, b) wie bei a) aber weiter invertiert.

3.1.2. Lamina

Die Lamina zeigt im Querschnitt die obere und untere Epidermis mit dem dazwischen liegenden mehrschichtigen Palisaden- und Schwammparenchym, sowie den zwischen Palisaden- und Schwammparenchymzellen liegenden kleinen Leitbündeln. Die Zellen der oberen und unteren Epidermis verlaufen in Richtung benachbarter Blattnerven. Sie sind nach außen hin gewölbt und bilden eine sphärische Ebene. In der Blattmitte ist die obere Ebene der Nerven abgeplattet. Auf beiden Seiten der Nerven ist die Epidermis im Querschnitt mehr oder weniger kreisrund oder oval. Ihre äußeren tangentialen Wände sind dicker als die radialen Wände. Während die Zellen auf der oberen Seite von den Nerven bis zur Lamina größer werden, werden sie in dem Übergang zur Lamina wieder kleiner. Die äußeren tangentialen Wände der oberen Epidermis sind dicker als ihre inneren tangentialen und die beiden radialen Wände. Sie erreichen eine mittlere Dicke von 5 µm (n = 20; Min. = 3 µm; Max. = 7 µm; Std. = +/-1 µm). Des Weiteren reagieren sie rötlich mit Rutheniumrot - besonders die äußeren tangentialen Wände. Die äußeren der unteren Epidermiswände sind zudem dicker als ihre beiden radialen und inneren tangentialen Wände. Sie sind ebenfalls rötlicher als die anderen. Die oberen Epidermiszellen sind meistens breiter als die unteren. Auf der Unterseite der Lamina liegen Drüsen, Borstenhaare und ihre anomocytischen Stomata. Je näher die Epidermiszellen an den Drüsenhaaren oder Borstenhaaren liegen, desto größer

werden die Zelldimensionen. Die neben den Drüsenzellen liegende Epidermis ist zum Teil von ihrem Zellenkörper in Richtung Schwammparenchym gegliedert. Die Basiszellen liegen im Schwamparenchym vor. Auf den Basiszellen liegen jeweils eine kleinere Hals- und eine Kopfzelle. Die äußersten Seiten der Kopfzelle sind parallel oder niedriger bezüglich der äußersten Teile der beiden benachbarten Epidermiszellen. Zum Blattrand hin werden die Epidermiszellen wieder kleiner. Die Drüsenhaare haben an der Laminabasis (Lb) eine mittlere Fläche von 1260 µm² (n = 20; Min. = 990 µm²; Max. = 1400 µm²; Std. = +/-110 µm²). Ihre Umfänge erreichen mittlere Werte von 135 µm (n = 20; Min. = 120 µm; Max. = 150 µm; Std. = +/-10 µm). An der Laminamitte (Lm) erreichen sie eine mittlere Fläche von 1250 µm² (n = 20; Min. = 950 µm²; Max. = 1550 µm²; Std. = +/-180 µm²) und einen mittleren Umfang von 130 µm (n = 20; Min. = 115 µm; Max. = 150 µm; Std. = +/-10 µm). Am Laminaende (Le) erreichen sie eine mittlere Fläche von 1200 µm² (n = 20; Min. = 1010 µm²; Max. = 1470 µm²; Std. = +/-130 µm²). Der Umfang beträgt durchschnittlich 130 µm (n = 20; Min. = 120 µm, Max. = 150 µm; Std. = +/-10 µm).

Die Stomata-Flächen der Laminabasis betragen durchschnittlich 1180 µm² (n = 20; Min. = 900 µm²; Max. =1400 µm²; Std. = +/-150 µm²). Ihre Umfänge liegen durchschnittlich bei 135 µm (n = 20; Min. = 115; Max. = 170; Std. = +/-15 µm). An der Laminamitte bekommt man eine mittlere Fläche von 1150 µm² (n = 20; Min. = 770 µm²; Max. = 1500 µm²; Std. = +/-160 µm²) und einen mittleren Umfang von 135 µm (n = 20; Min. = 110 µm; Max. = 155 µm; Std. = +/-10 µm). Am Laminaende beträgt die Stomata-Fläche durchschnittlich 1100 µm² (n = 20; Min. = 770 µm²; Max. = 1470 µm²; Std. = +/-180 µm²). Ihre Umfänge liegen durchschnittlich bei 130 µm (n = 20; Min. = 120; Max. = 150; Std. = +/-10 µm).

Unterhalb der Epidermis ist ein 2 bis 3 schichtiges Palisadenparenchym zu finden. Die Zellen sind meistens kegelförmig und vertikal länglich. Die Zellen in der 1. Schicht erreichen eine mittlere Fläche von 430 µm² (n = 20; Min. = 170 µm²; Max. = 710 µm²; Std. = +/-130 µm²). Ihre Umfänge betragen durchschnittlich 85 µm (n = 20; Min. = 50 µm; Max. = 110 µm; Std. = +/-15 µm). In der 2. Schicht ergeben die Zellflächen durchschnittlich Werte von 350 µm² (n = 20; Min. = 190 µm²; Max.= 515 µm²; Std. = +/-110 µm²) und bei mittleren Umfängen von 75 µm (n = 20; Min = 60 µm; Max. = 100 µm; Std. = +/-15 µm). Die Flächen der 3. Schicht betragen durchschnittlich 400 µm² (n = 20; Min. = 220 µm²; Max. = 610 µm²; Std. = +/- 115 µm²) und die Umfänge 80 µm (n = 20; Min. = 30; Max. = 60 µm; Std. = +/-20 µm).

Die Interzellulär-Fläche des Palisadenparenchymgewebes beträgt 24 %, die des Schwammparenchymgewebes 65 %.

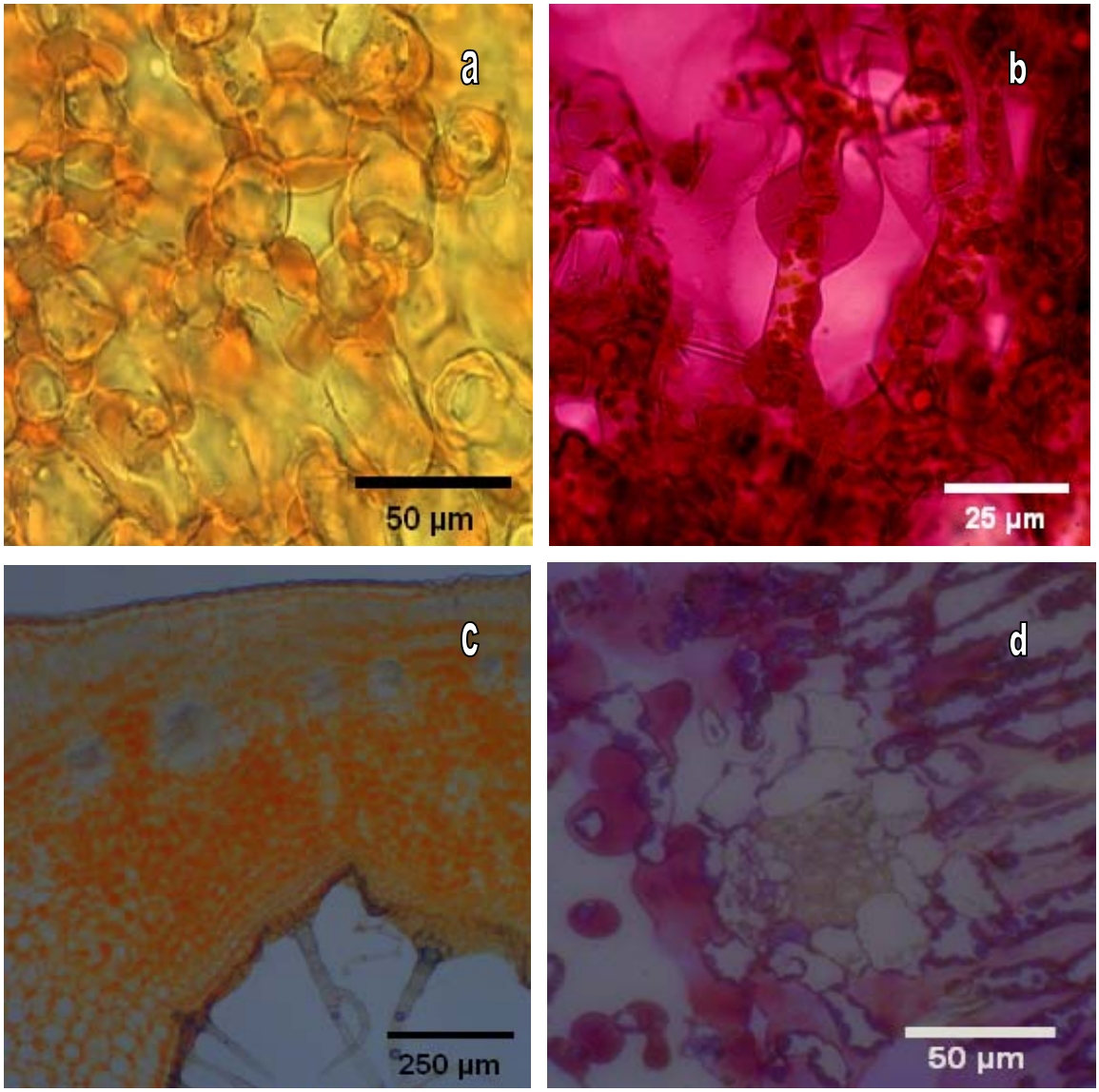


Abbildung 9: Färbung des Schwammparenchyms, gefärbt mit a) Hydroxylamin-$FeCl_3$, b) Rutheniumrot, 1 µm dicker Querschnitt der Lamina, c) Hydroxylamin-$FeCl_3$ und d) Thionin sowie mit Einsatz des Blaufilters P.020 von Cokin

Bemerkenswert sind die Reaktionen der Palisaden- und Schwammparenchymzellen gegen Färbemittel. Mit dem Rutheniumrot reagieren die Zellwände bzw. Ihre Ausstülpungen rot bis bräunlich. Mit Hydroxylamin-$FeCl_3$-Lösung färben sich beide bräunlich (Abbildung 9). Weiterhin sind zahlreiche Ölkörner im Palisaden- und Schwammparenchym zu finden, die rötlich mit Sudan III reagieren. Sie sind zahlreicher im Palisadenparenchym zu finden als im Schwammparenchym.

An der Laminabasis liegen unter der Epidermis der Nervenoberseite einige Kollenchymschichten, deren innere Seitenwände kreisrund sind oder Winkel bilden. Auch die keilförmige Zellengrenze ist sowohl tangential als auch radial angeordnet. Die Wände sind stark rötlich mit Rutheniumrot gefärbt, vor allem ihre Mittellamellen und das Interzellulär. Die Zellen sind chloroplastenreich. Kurz vor dem Blattende sind die Kollenchymwände welliger, die Zellformen sehr unterschiedlich. Die Form ändert sich von fast kreisrund über eckig bis hin zu länglich und keilförmig.

Weiterhin liegen am Anfang der Lamina in Richtung Zentralparenchym 1 bis 2 Schichten Parenchymgewebe, die als Erweiterung des Palisadenparenchyms dienen, in denen viele Chloroplasten zu finden sind. Die erste Schicht dient als Übergang der Kollenchymzellen zur zweiten Schicht. Ihre Zellwände sind dicker als bei den darunter liegenden Zellen. Die Zellwände beider Schichten färben sich rötlich mit Rutheniumrot. Einige Zellen besitzen auch gelbliche Öltropfen. Ihre Zellformen sind kreisrund bis tangential länglich. In dem Übergang zu Lamina werden sie aber radial länglicher. In der Blattmitte verbinden sie ebenfalls die Kollenchymschichten mit dem darunter liegenden Rindenparenchym. Die Zellen sind in der linken und rechten Seite der Nerven radial länglicher. In der Mitte der Nerven sind sie mehr oder weniger kreisrund. Ihre Zellwände reagieren nur schwach rötlich gegen Rutheniumrot. Diese Verbindungsschichten lassen sich auch kurz vor dem Ende der Lamina beobachten.

Des Weiteren liegen unter den Verbindungsparenchymschichten einige Schichten Rindenparenchym. Kurz vor dem Ende der Lamina treten sie kaum noch auf, so dass nach der oberen Seite der Nerven und der Verbindungsschicht sich direkt die Sklerenchymschicht anschließt. Die Zellwände sind besonders breit im Bereich der Interzellularen und sehen rötlicher aus als im Bereich der gemeinsamen Zellwand benachbarter Zellen.

Von der Unterseite der Hauptnerven folgen auf die Kollenchymschichten Übergangzellen und das Rindenparenchym. Ihre Zellwände färben sich rosarot gegen Rutheniumrot. Die Rindenparenchymzellen sind kreisrunde bis leicht eckige Zellen, deren Wände nur wenig wellig sind. In Richtung Schwammparenchym sind deren Wände welliger und unregelmäßiger geformt.

Nach innen hin liegen weitere Sklerenchymschichten, Phloem, Xylem und das Zentralparenchym. Die Sklerenchymschichten schließen hauptsächlich ihr benachbartes Phloem ein. An der Oberseite der Nerven findet man vor dem Phloem mehrschichtige Sklerenchyme. Die beiden Seiten kurz vor dem Übergang zum Palisadenparenchym ziehen nach innen Richtung Zentralparenchym. Sie sind besonders gut am Anfang der Lamina zu erkennen. Die Kollenchymschichten beider Seiten und die untere Ebene ziehen ihre Spitzen in Richtung Zentralparenchym. Die Zellwände des Sklerenchyms sind meistens verholzt. In manchen Fällen enthalten sie noch Pektine. Ihre Farbe ändert sich von gelblich zu rosa. Dies kann man besonders gut bei den Zellen beobachten, die neben dem Phloem liegen. Einige rosarote und dickwändige Sklerenchymzellen sind auch im Phloemgewebe erkennbar. Interzelluläre, die rosarot bis tief rot mit Rutheniumrot reagieren, sind häufig.

Am Anfang der Lamina bestehen die Phloeme aus einem flach gestreckten großzelligem Gewebe. Daneben liegen mehrere kleine Phloembereiche, mehrere Halbmond ähnliche Phloembereiche, sowie eine großes unteres Phloem. Während in der Laminamitte und kurz vor dem Lamina-Ende die Halbmond ähnlichen Seitenphloeme und die unteren Phloeme zusammengeschlossen sind, bleibt das obere Phloem solitär.

Das Xylem besteht am Anfang der Hauptnerven aus einem unterhalb der Hauptnerven liegenden, großen und abgebogenen Xylem und mehreren kleinen Xylemen, sowie ein oberhalb der Nerven liegendes, großes und flaches Xylem, wobei zwischen ihnen mehrere getüpfelte Sklerenchymzellen liegen. Die Gefäße liegen entweder einzeln oder als Strahl nebeneinander vor. Die Wände sind in vielen Fällen reich an Pektinen. Dies kann man besonders bei Zellen, die an das Phloem- bzw. das Zentralparenchym angrenzen, gut erkennen. Sie sind von verholzten und mit Tüpfeln durchsetzten Parenchymzellen und Sklerenchymzellen umgeben. Vereinzelt bilden die Parenchymzellen radial einen Strahl. Beim Übergang zum Zentralparenchym sind die Wände dünner und reich an Pektinen. Interzellulär ist nicht mehr vorhanden. In Richtung des Zentralparenchyms sind die Gefäße englumig und ihre Wände verholzt, jedoch noch reich an Pektinen.

Das Zentralparenchym besteht aus polygonalen bis runden Zellen, deren Wände nur wenig mit Tüpfeln durchsetzt sind und wenig Pektin enthalten. Mehr

Pektin läst sich in den Wänden neben dem Interzellulär finden. Im mittleren Bereich der Lamina existiert kein Zentralparenchym mehr.

3.2. Blattmasse

Im Oktober 2002 wurden 80 ausdifferenzierte Blätter verschiedener *Premna oblongata*-Pflanzen geerntet - und zwar je 20 Blätter an 4 verschiedenen Tagen -, getrocknet und ihre Frisch- und Trockenmassen bestimmt (Versuchsreihe A). Die klassifizierten Daten sind als Häufigkeitsverteilung in den Histogrammen der Abbildung 10a) für die Blattfrischmasse und 10b) für die Blatttrockenmasse dargestellt. Als Parameter für die innerartliche Variabilität einzelner Pflanzen wurden ausgewachsene Blätter einer Pflanze auf Frischmasse und Trockenmasse untersucht (Versuchsreihe B). Um eventuelle Variabilitäten verschiedener Individualpflanzen hinsichtlich dieser Blattparameter aufzudecken, wurden Im März 2003 je 20 Blattproben von 4 verschiedenen Pflanzen genommen und wie unter Versuchsreihe A beschrieben vermessen (Abbildung 10c) und 10d)). Anschließend wurden von März 2003 bis Februar 2004 monatlich je 20 Proben von verschiedenen Pflanzen gesammelt und wie unter Versuchsreihe A beschrieben bearbeitet (Versuchsreihe C) (Abbildung 10e) und 10f)).

Aus der Abbildung 10a) ist erkennbar, dass die meisten Blatt-Frischmassen zwischen den Klassengrenzen 3,5 und 4,0 g (14 Blätter) liegen, die meisten Blatt-Trockenmassen zwischen den Klassengrenzen 0,7 und 0,8 g (13 Blätter) (Abbildung 10b)). Sie sind normal verteilt, schwach rechtsschief und ihre Momenten-Koeffizienten (MK-Wert) liegen bei 0,1 bzw. 0,5. In der Abbildung 10c) dominiert bei den Blatt-Frischmassen die Klasse mit den Grenzen 2,0 und 2,5 g mit 24 Blättern, bei den Blatt-Trockenmassen die Klasse mit den Grenzen 0,4 und 0,5 g mit 29 Blättern (Abbildung 10d)). Die Histogramme zeigen eine rechtsschiefe Verteilung mit MK-Werten bei 1,0 und 1,4. Ebenso zeigen Blatt-Frischmasse und Blatt-Trockenmasse der Versuchsreihe C (Abbildungen 10e) und 10f)) eine rechtsschiefe Verteilung mit den MK-Werten 1,5 bzw. 1,1. Hier liegen die meisten Blatt-Frischmassen zwischen den Klassengrenzen 2,5 und 3,0 g mit 68 Blättern, die Blatt-Trockenmassen zwischen den Klassengrenzen 0,4 und 0,5 g mit 65 Blättern. Des Weiteren wurden die minimalen, maximalen und die Mittelwerte der Untersuchungsgruppen A - C sowie deren Standardabweichungen in Tabelle 3 zusammengefasst.

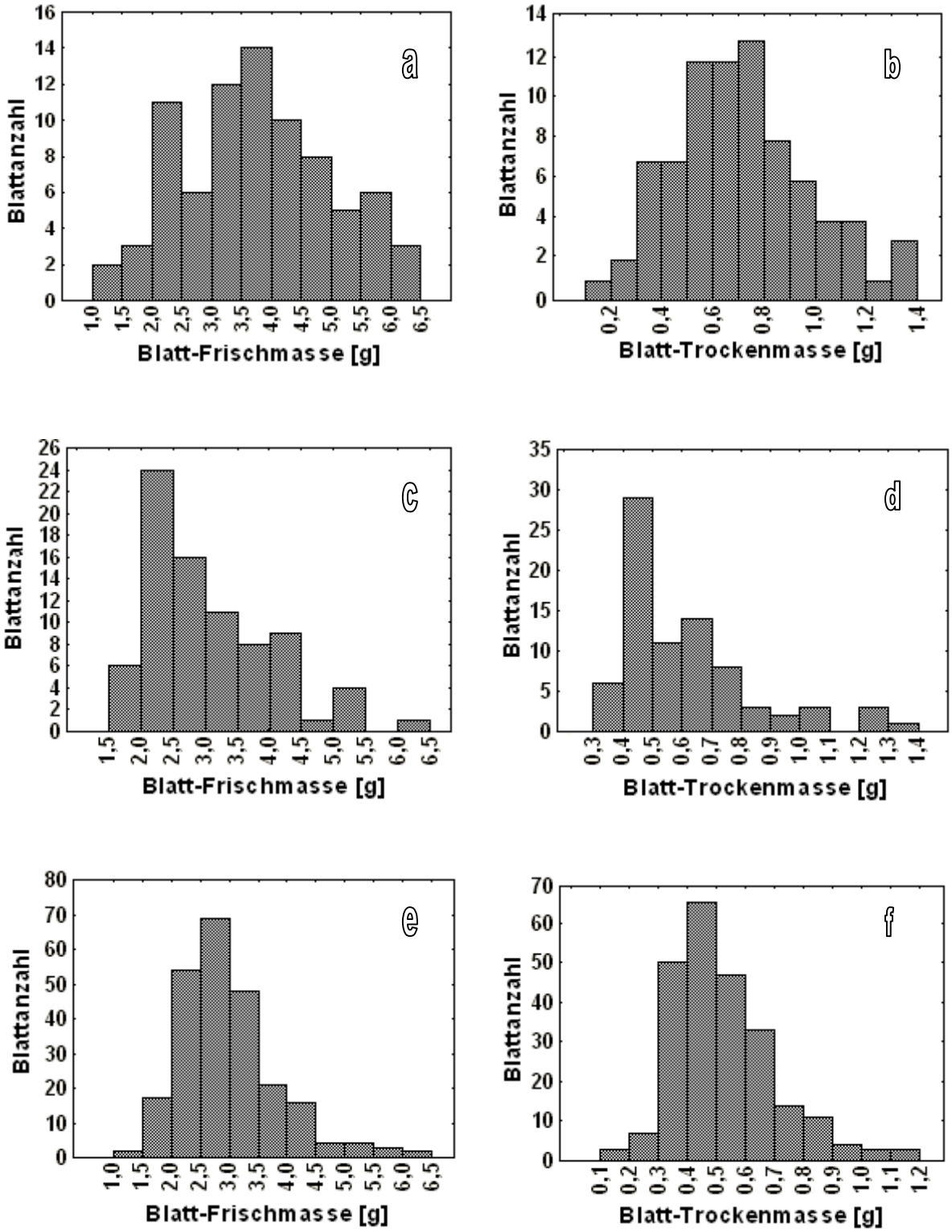


Abbildung 10: Histogramme der Frisch- und Trockenmassen der Blätter. a) und b) Frisch- und Trockenmassen der Versuchsreihe A; c) und d) Frisch- und Trockenmassen der Versuchsreihe B; e) und f) Frisch- und Trockenmassen der Versuchsreihe C.

Tabelle 3: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Blatt-Frischmassen und –Trockenmassen der Versuchsreihen A - C

Versuchsreihe	Frischmasse [g]				Trockenmasse [g]			
	Min.	Max.	Mittelw.	Std. [+/-]	Min.	Max.	Mittelw.	Std. [+/-]
A	**1,3**	**6,3**	**3,7**	**1,2**	**0,2**	**1,4**	**0,7**	**0,3**
1. Probenahme	1,5	6,0	3,5	1,2	0,2	1,2	0,7	0,2
2. Probenahme	1,3	6,3	3,4	1,4	0,2	1,3	0,6	0,3
3. Probenahme	2,0	6,0	3,8	1,2	0,3	1,4	0,7	0,3
4. Probenahme	2,3	5,8	4,3	1,0	0,4	1,1	0,8	0,2
B	**1,8**	**6,1**	**3,1**	**1**	**0,3**	**1,4**	**0,6**	**0,2**
1. Pflanze	2,1	4,3	3,0	0,7	0,4	0,7	0,5	0,1
2. Pflanze	1,8	4,2	2,9	0,7	0,4	0,9	0,6	0,1
3. Pflanze	2,0	6,1	3,7	1,3	0,4	1,4	0,8	0,3
4. Pflanze	1,9	4,2	2,7	0,7	0,4	0,9	0,5	0,1
C	**1,3**	**6,4**	**3,0**	**0,9**	**0,1**	**1,1**	**0,5**	**0,2**
März ‘03	2,0	5,7	3,3	1,0	0,4	1,1	0,7	0,2
April ‘03	2,3	6,1	3,4	1,2	0,4	1,0	0,6	0,2
Mai ‘03	2,1	6,4	3,2	1,0	0,3	0,9	0,4	0,1
Juni ‘03	2,1	5,8	3,2	0,9	0,3	0,8	0,5	0,1
Juli ‘03	1,8	4,3	2,9	0,7	0,3	0,6	0,4	0,1
August ‘03	1,9	5,1	3,1	0,6	0,1	0,7	0,5	0,1
September ‘03	1,8	4,4	2,8	0,7	0,3	0,7	0,5	0,1
Oktober ‘03	1,6	5,4	2,8	0,9	0,2	0,7	0,5	0,1
November ‘03	1,9	4,4	2,8	0,6	0,3	0,7	0,5	0,1
Dezember ‘03	1,3	4,0	2,6	0,8	0,2	1,0	0,5	0,3
Januar ‘04	1,8	4,1	2,8	0,6	0,4	1,1	0,6	0,2
Februar ‘04	1,8	4,9	2,9	0,8	0,3	1,1	0,7	0,2

3.3. Blattfläche

Die Blattflächen wurden gemessen und die Werte in Abbildung 11 gelistet. Die Blattflächen der Versuchsreihe A konzentrierten sich mit 21 Blättern zwischen den Klassengrenzen 10.000-12.000 mm² (Abbildung 11a)). In der Abbildung 11b) konzentrieren sich die Daten von 16 Blättern stärker im linken Bereich in den Flächenklassengrenzen von 8.000-9.000 mm². 79 Blätter der Versuchsreihe C liegen zwischen den Flächenklassengrenzen von 8.000-10.000 mm². Alle Versuchsreihen zeigen eine rechtsschiefe Verteilung mit MK-Werten von 0,4, 0,6 und 1,1. Ihre

entsprechenden minimalen, maximalen und Mittelwerte sowie ihre Standardabweichungen sind in der Tabelle 4 zu finden.

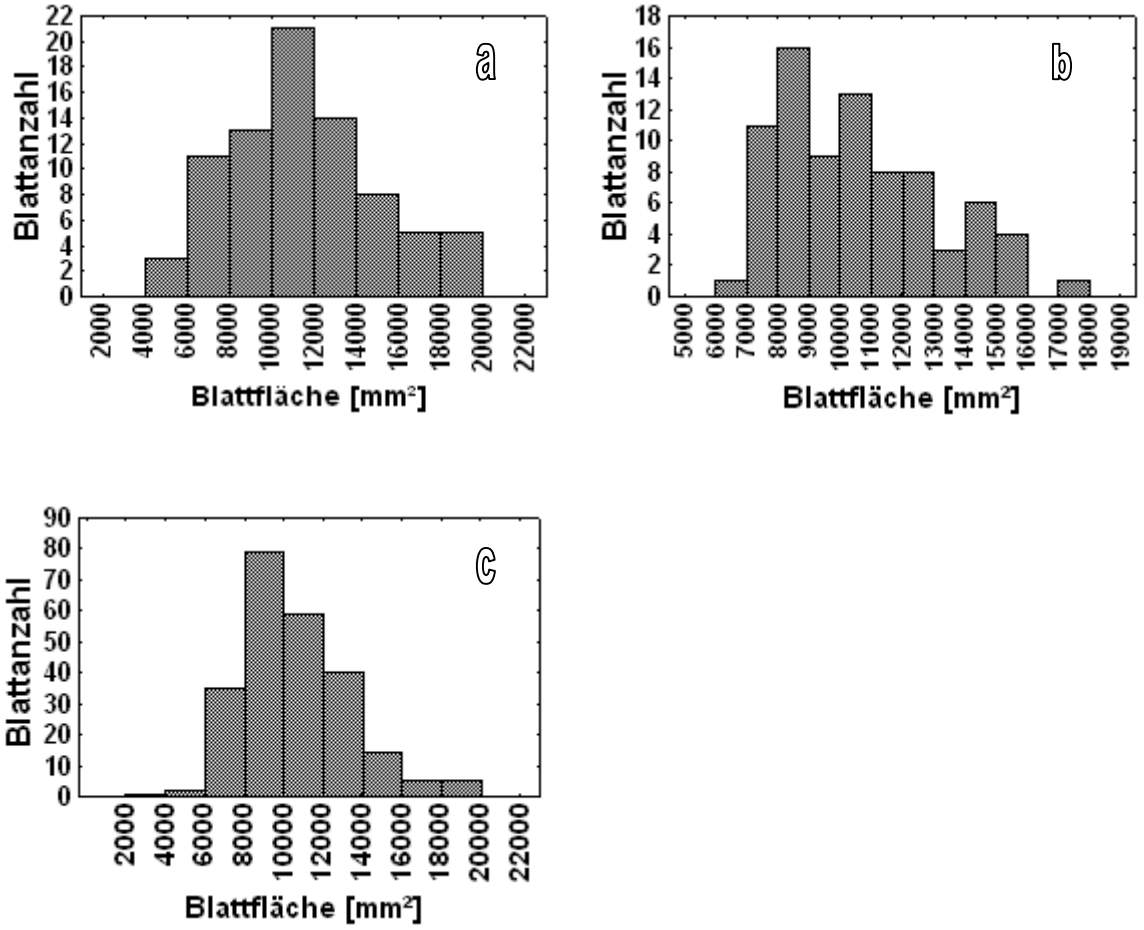


Abbildung 11: Histogramme der Blattflächen von den Versuchsreihen a) A, b) B, und c) C.

Tabelle 4: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Blattflächen der Versuchsreihen A - C

Versuchsreihe	Min. [mm²]	Max. [mm²]	Mittelw. [mm²]	Std. [+/-]
A	**5100**	**19900**	**11400**	**3600**
1. Probenahme	5900	19000	11100	3600
2. Probenahme	5100	19300	10600	4050
3. Probenahme	6300	16600	11100	3100
4. Probenahme	8300	19900	12700	3100
B	**6850**	**17500**	**10550**	**2500**
1. Pflanze	7500	15200	10900	2500
2. Pflanze	7200	14200	10100	2100
3. Pflanze	7200	17500	11500	3100
4. Pflanze	6850	14150	9700	1700
C	**3150**	**19900**	**10500**	**2800**
März ‘03	8250	14700	10400	1800
April ‘03	7400	19500	11300	3700
Mai ‘03	7400	19900	11000	3000
Juni ‘03	7950	19300	11450	3250
Juli ‘03	7350	12950	10000	2000
August ‘03	6400	15000	11200	2200
September ‘03	6900	14200	10250	2200
Oktober ‘03	5450	17000	9450	3000
November ‘03	7300	17500	10550	2650
Dezember ‘03	3150	14800	9700	3400
Januar ‘04	6600	16600	10500	2500
Februar ‘04	7250	16100	10850	2750

3.4. Flächen von Epidermiszellen der Blattstiele und der Hauptnerven

Die Flächen der Epidermiszellen von Sa-, Sm-, Se-Oberseite sowie Hb-, Hm- und He-Oberseite sind als Häufigkeitsverteilung in den Histogrammen der Abbildung 12 dargestellt.

Aus den Abbildungen 12a) und 12b) ist erkennbar, dass die meisten Epidermiszellen von Sa-Oberseite und Sm-Oberseite Flächen aufweisen, die zwischen den Klassengrenzen 300 und 350 µm² (58 bzw. 43 Zellen) liegen, bei Epidermiszellen von der Se-Oberseite liegen sie zwischen den Klassengrenzen 250 und 300 µm² (37 Zellen, Abbildung 12c)). Die Flächen der Epidermiszellen über den Hauptnerven sind deutlich größer wie die Abbildungen 12 d) bis f) (Hb-, Hm- und He-Oberseite) zeigen. Aus den Abbildungen 12d), e) und f) ist erkennbar, dass die meisten Epidermiszellen von der Hb-Oberseite Flächen aufweisen, die zwischen den Klassengrenzen 800 und 1.000 µm² (43 Zellen) liegen, von der Hm-Oberseite zwischen den Grenzen 600-800 µm² (47 Zellen) und von der He-Oberseite zwischen den Grenzen 2.000 und 2.500 µm² (65 Zellen). Die MK-Werte der Sa-, Sm- und Se-Oberseite betragen 0,8, 0,4 und 0,0, die MK-Werte der Hb-, Hm- und He-Oberseite 1,0, 0,6 und –0,1.

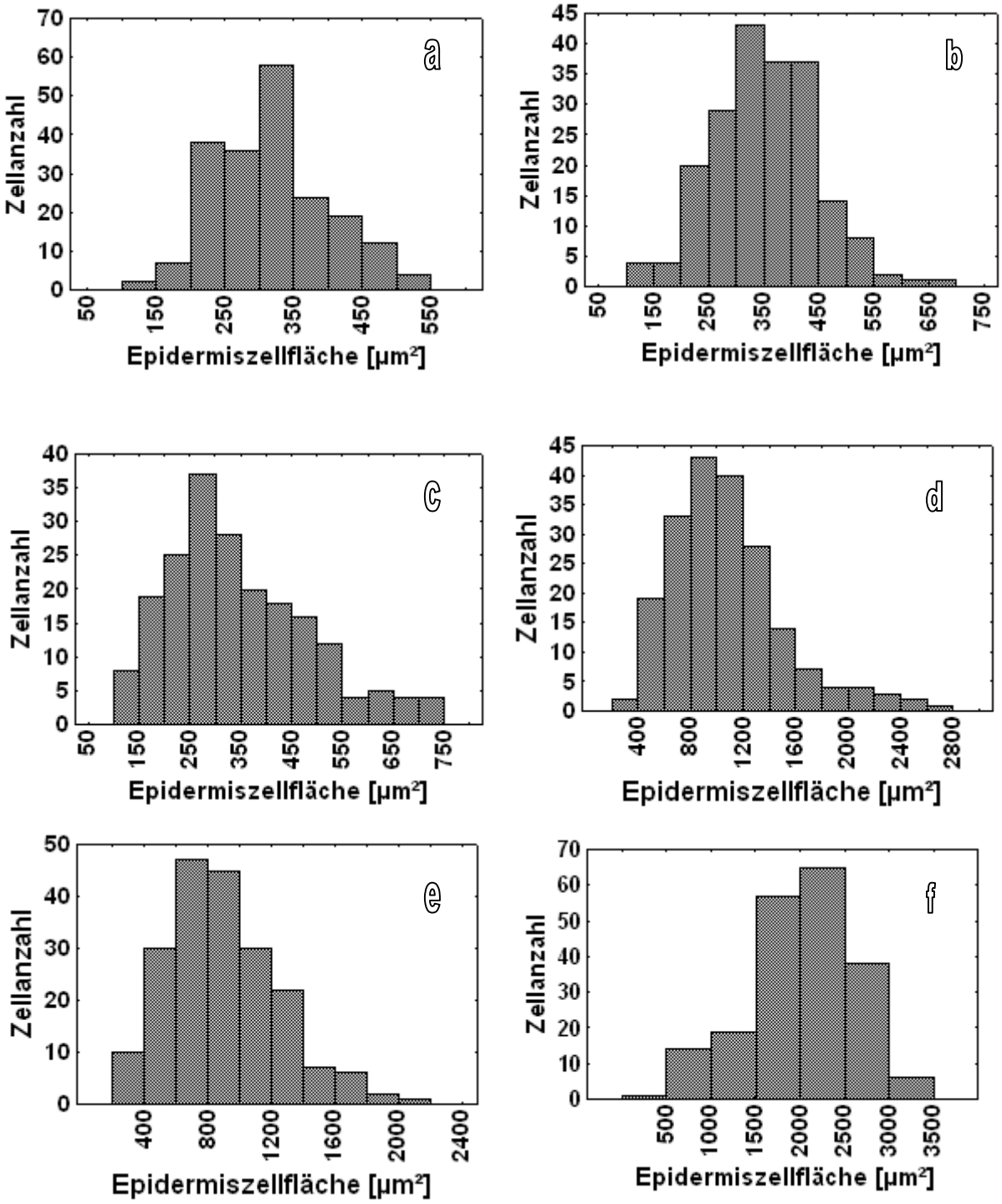


Abbildung 12: Histogramme der Epidermiszellflächen der a) Sa-, b) Sm-, c) Se-Oberseite sowie der d) Hb- , e) Hm- und f) He-Oberseite: n = 200

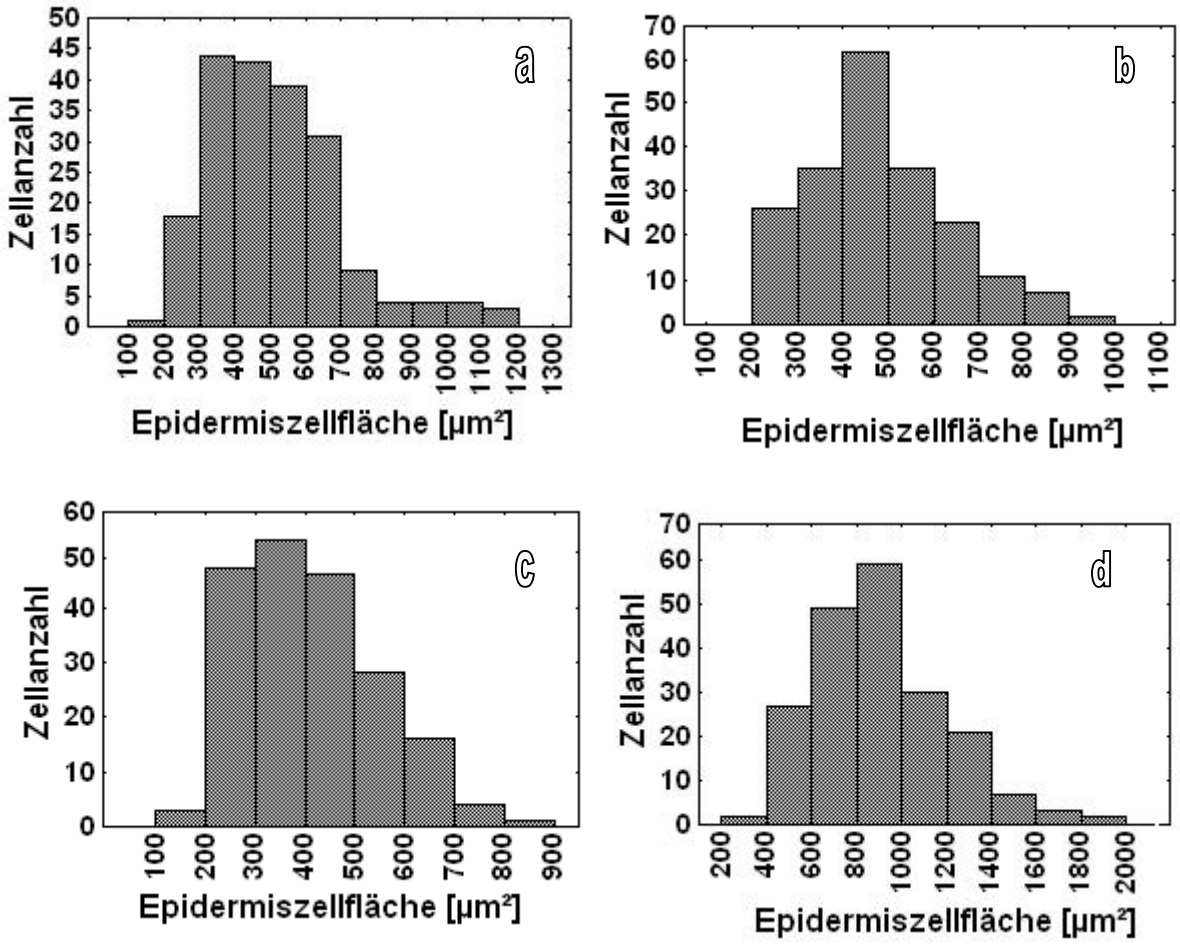


Abbildung 13: Histogramme der Epidermiszellflächen der a) Sa-, b) Sm-, c) Se-Unterseite sowie der d) Hb- , e) Hm- und f) He-Unterseite; n = 200

Die Flächen der Epidermiszellen von Sa-, Sm-, Se-Unterseite sowie Hb-, Hm- und He-Unterseite sind als Häufigkeitsverteilung in den Histogrammen der Abbildung 13 dargestellt.

Aus den Abbildungen 13a) und 13b) ist erkennbar, dass die meisten Epidermiszellen von Sa-Unterseite und Sm-Unterseite Flächen aufweisen, die zwischen den Klassengrenzen 300 und 400 µm² bzw. 400 und 500 µm² (44 bzw. 61 Zellen) liegen, bei Epidermiszellen von der Se-Unterseite liegen sie zwischen den Klassengrenzen 300 und 400 µm² (53 Zellen, Abbildung 13c)). Die Flächen der Epidermiszellen über den Hauptnerven sind deutlich größer wie die Abbildungen 13 d) bis f) (Hb-, Hm- und He-Unterseite) zeigen. Aus den Abbildungen 13d), e) und f) ist erkennbar, dass die meisten Epidermiszellen von der Hb-Unterseite Flächen aufweisen, die zwischen den Klassengrenzen 800 und 1.000 µm² (59 Zellen) liegen, von der Hm-Unterseite zwischen den Grenzen 600-800 µm² (65 Zellen) und von der He-Unterseite zwischen den Grenzen 800 und 1.000 µm² (45 Zellen). Die MK-Werte

der Sa-, Sm- und Se-Unterseite betragen 0,9, 0,7 und 0,5, die MK-Werte der Hb-, Hm- und He-Unterseite 0,6, 0,8 und 0,8.

Die minimalen, maximalen und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Epidermiszellflächen sind in der Tabelle 5 zu finden.

Tabelle 5: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Epidermiszellflächen von Sa-, Sm-, Se-, Hb-, Hm- und He- Ober- und Unterseite

Probenahme	Min. [µm²]	Max. [µm²]	Mittelw. [µm²]	Std. [+/-]
Sa-Oberseite	140	550	320	80
Sm-Oberseite	125	650	350	95
Se-Oberseite	130	730	345	140
Hb-Oberseite	330	2630	1085	440
Hm-Oberseite	280	2140	905	355
He-Oberseite	255	3205	2015	580
Sa-Unterseite	190	1170	510	190
Sm-Unterseite	205	980	485	485
Se-Unterseite	145	805	410	140
Hb-Unterseite	350	1850	910	300
Hm-Unterseite	235	1855	780	270
He-Unterseite	210	2370	890	370

3.5. Umfang von Epidermiszellen der Blattstiele und der Hauptnerven

Die Umfänge der Epidermiszellen von Sa-, Sm-, Se-Oberseite sowie Hb-, Hm- und He-Oberseite sind als Häufigkeitsverteilung in den Histogrammen der Abbildung 14 dargestellt.

Aus den Abbildungen 14a), 14b) und 14c) ist erkennbar, dass die meisten Epidermiszellen von der Sa-Oberseite Umfänge aufweisen, die zwischen den Klassengrenzen 70 und 75 µm (58 Zellen) liegen, von der Sm-Oberseite zwischen den Grenzen 75 und 80 µm (37 Zellen) und bei Epidermiszellen von der Se-Oberseite liegen sie zwischen den Klassengrenzen 80 und 85 µm (37 Zellen). Die Umfänge der Epidermiszellen über den Hauptnerven sind wie erwartet deutlich größer wie die Abbildungen 14d) bis f) (Hb-, Hm- und He-Oberseite) zeigen. Aus diesen Abbildungen ist erkennbar, dass die meisten Epidermiszellen von der Hb-Oberseite Umfänge aufweisen, die zwischen den Klassengrenzen 120 und 140 µm (56 Zellen) liegen, von der Hm-Oberseite zwischen den Grenzen 140-160 µm (42

Zellen) und von der He-Oberseite zwischen den Grenzen 200 und 220 µm (45 Zellen). Die MK-Werte der Sa-, Sm- und Se-Oberseite betragen 2,2, 1,7 und 1,9, die MK-Werte der Hb-, Hm- und He-Oberseite 0,9, 0,4 und 0,4., die Häufigkeitsverteilungen sind alle rechtsschief.

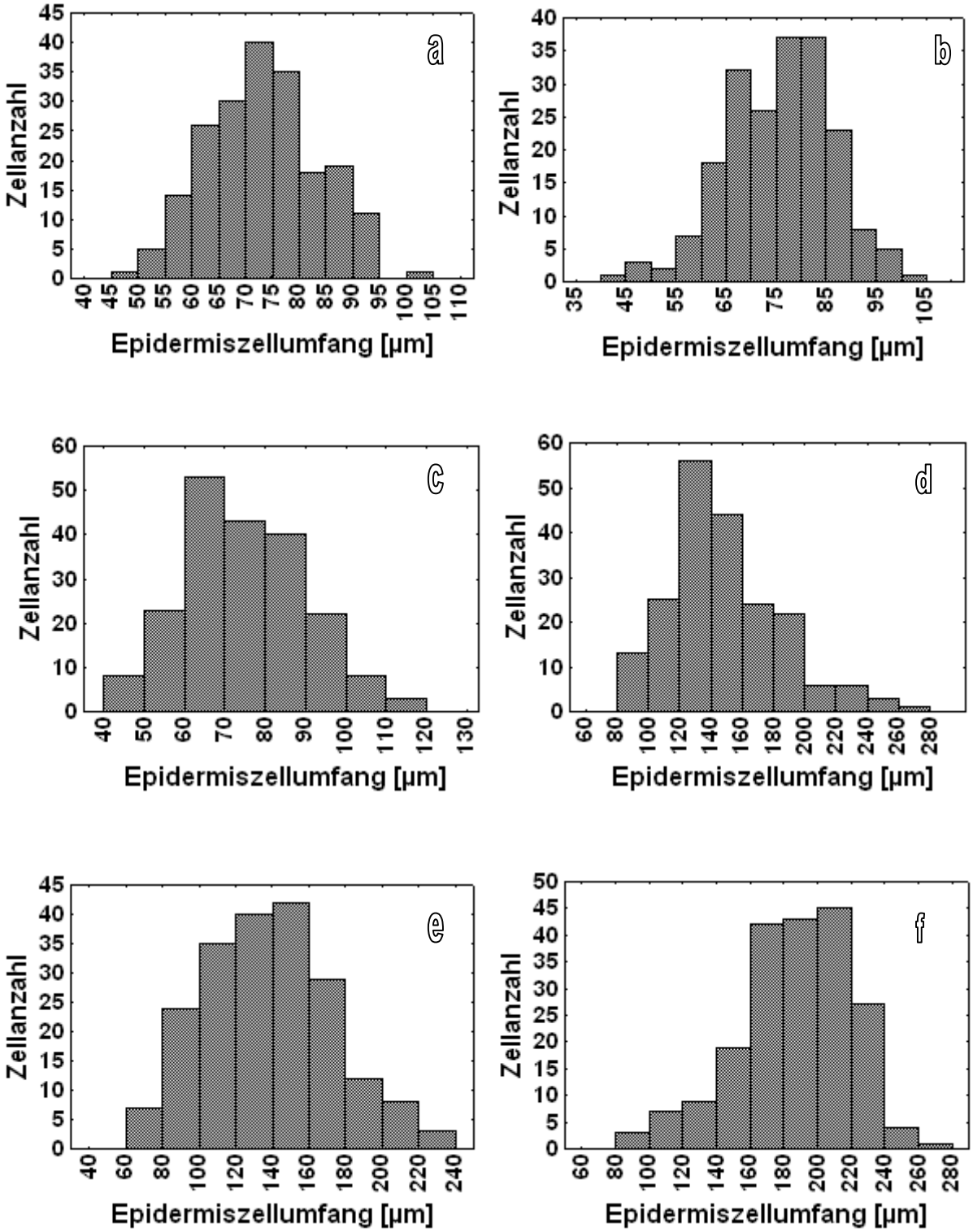


Abbildung 14: Histogramme der Epidermiszellumfänge der a) Sa-, b) Sm-, c) Se-Oberseite sowie der d) Hb- , e) Hm- und f) He-Oberseite; n = 200

Die Umfänge der Epidermiszellen von Sa-, Sm-, Se-Unterseite sowie Hb-, Hm- und He-Unterseite sind als Häufigkeitsverteilung in den Histogrammen der Abbildung 15 dargestellt.

Aus den Abbildungen 15a) und 15b) ist erkennbar, dass die meisten Epidermiszellen von Sa-Unterseite und Sm-Unterseite Umfänge aufweisen, die zwischen den Klassengrenzen 90 und 100 µm bzw. 80 und 90 µm (44 bzw. 49 Zellen) liegen, bei Epidermiszellen von der Se-Unterseite liegen sie zwischen den Klassengrenzen 80 und 90 µm² (51 Zellen, Abbildung 15c)). Die Umfänge der Epidermiszellen über den Hauptnerven sind deutlich größer wie die Abbildungen 15d) bis f) (Hb-, Hm- und He-Unterseite) zeigen. Aus den Abbildungen 15d), e) und f) ist erkennbar, dass die meisten Epidermiszellen von der Hb-Unterseite Umfänge aufweisen, die zwischen den Klassengrenzen 120 und 140 µm (46 Zellen) liegen, von der Hm-Unterseite zwischen den Grenzen 140-160 µm (43 Zellen) und von der He-Unterseite zwischen den Grenzen 140 und 160 µm (43 Zellen).

Die Abbildungen 15a) bis 15f) zeigen eine rechtsschiefe Verteilung und die MK-Werte betragen 0,8, 1,2 und 0,6 für die Sa-, Sm- und Se-Unterseite sowie 0,8, 0,5 und 0,6 für die Hb-, Hm- und He-Unterseite.

Die minimalen, maximalen und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen sind in der Tabelle 6 zu finden.

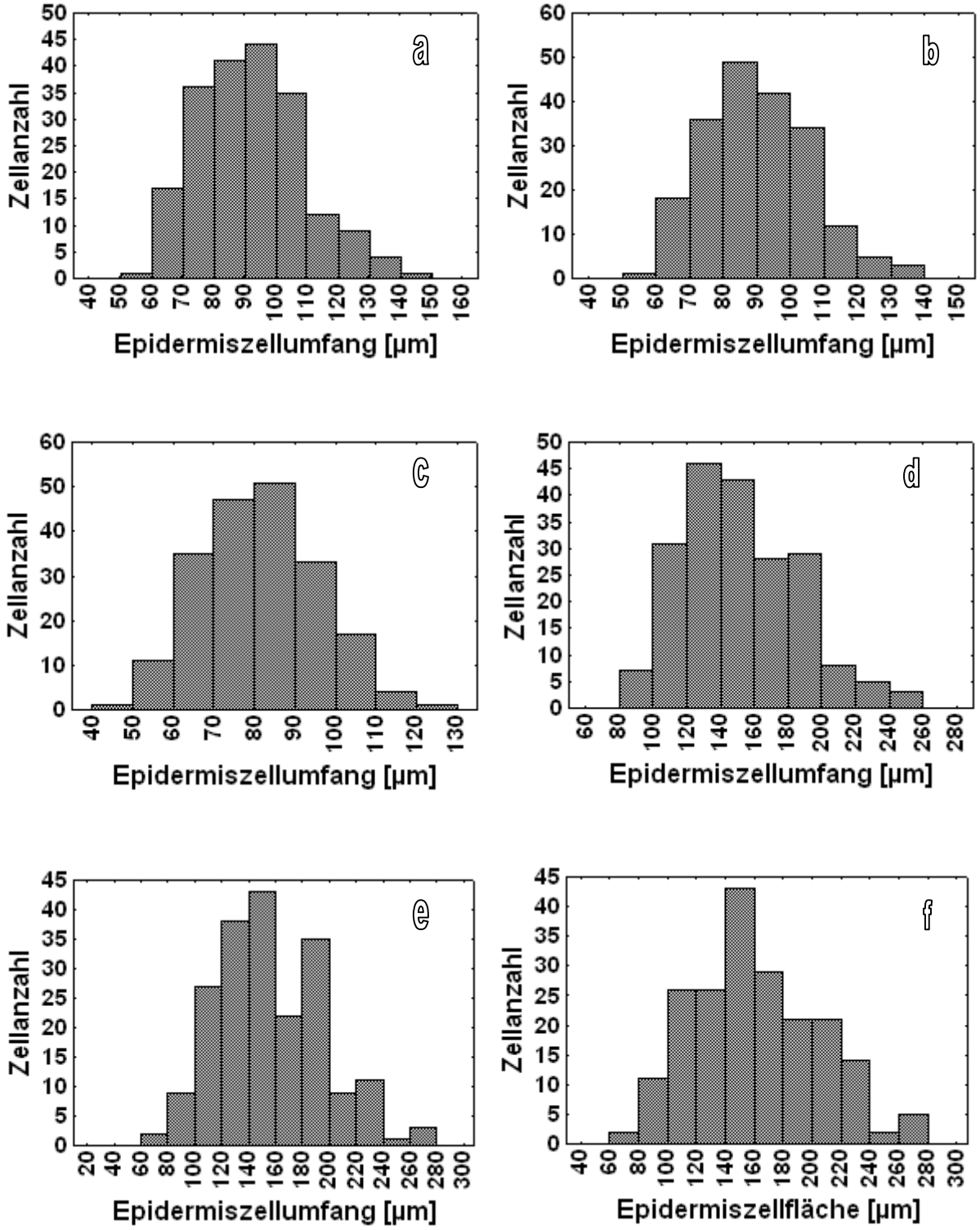


Abbildung 15: Histogramme der Epidermiszellumfänge der a) Sa-, b) Sm-, c) Se-Unterseite sowie der d) Hb- , e) Hm- und f) He-Unterseite, n = 200

Tabelle 6: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Epidermiszellumfänge von Sa-, Sm-, Se-, Hb-, Hm- und He- Ober- und Unterseite

Probenahme	Min. [µm]	Max. [µm]	Mittelw. [µm]	Std. [+/-]
Sa-Oberseite	50	100	75	10
Sm-Oberseite	45	100	75	10
Se-Oberseite	50	120	75	15
Hb-Oberseite	85	270	150	35
Hm-Oberseite	70	225	140	35
He-Oberseite	85	260	190	35
Sa-Unterseite	60	150	90	20
Sm-Unterseite	60	135	90	15
Se-Unterseite	50	120	80	15
Hb-Unterseite	80	250	150	35
Hm-Unterseite	60	275	155	40
He-Unterseite	80	270	160	45

3.6. Fläche von Epidermiszellen der Lamina

Die Flächen der Epidermiszellen von der Lb-, Lm- und Le-Oberseite und -Unterseite sind als Häufigkeitsverteilung in den Histogrammen der Abbildung 16 dargestellt.

Aus den Abbildungen 16a) bis 16c) ist erkennbar, dass die meisten Epidermiszellen von der Lb-Oberseite, Lm-Oberseite und der Le-Oberseite Flächen aufweisen, die zwischen den Klassengrenzen 1.500 und 2.000 µm² (69, 68 und 68 Zellen) liegen, bei Epidermiszellen von der Le-Oberseite liegen sie zwischen den Klassengrenzen 250 und 300 µm² (37 Zellen, Abbildung 16c)). Die Flächen der Epidermiszellen unter den Hauptnerven sind deutlich kleiner wie die Abbildungen 16d) bis f) (Lb-, Lm- und Le-Unterseite) zeigen. Aus den Abbildungen 16d), e) und f) ist erkennbar, dass die meisten Epidermiszellen von der Lb-Unterseite Flächen aufweisen, die zwischen den Klassengrenzen 800 und 1.000 µm² (48 Zellen) liegen, von der Lm-Unterseite und der Le-Unterseite zwischen den Grenzen 600-800 µm² (56 bzw. 65 Zellen). Die MK-Werte der Lb-, Lm- und Le-Oberseite betragen 0,3, 0,3 und 0,6, die MK-Werte der Lb-, Lm- und Le-Unterseite 0,4, 0,5 und 0,6.

Die minimalen, maximalen und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Epidermiszellflächen der Lb-, Lm- und Le-Oberseite und –Unterseite sind in der Tabelle 7 zu finden.

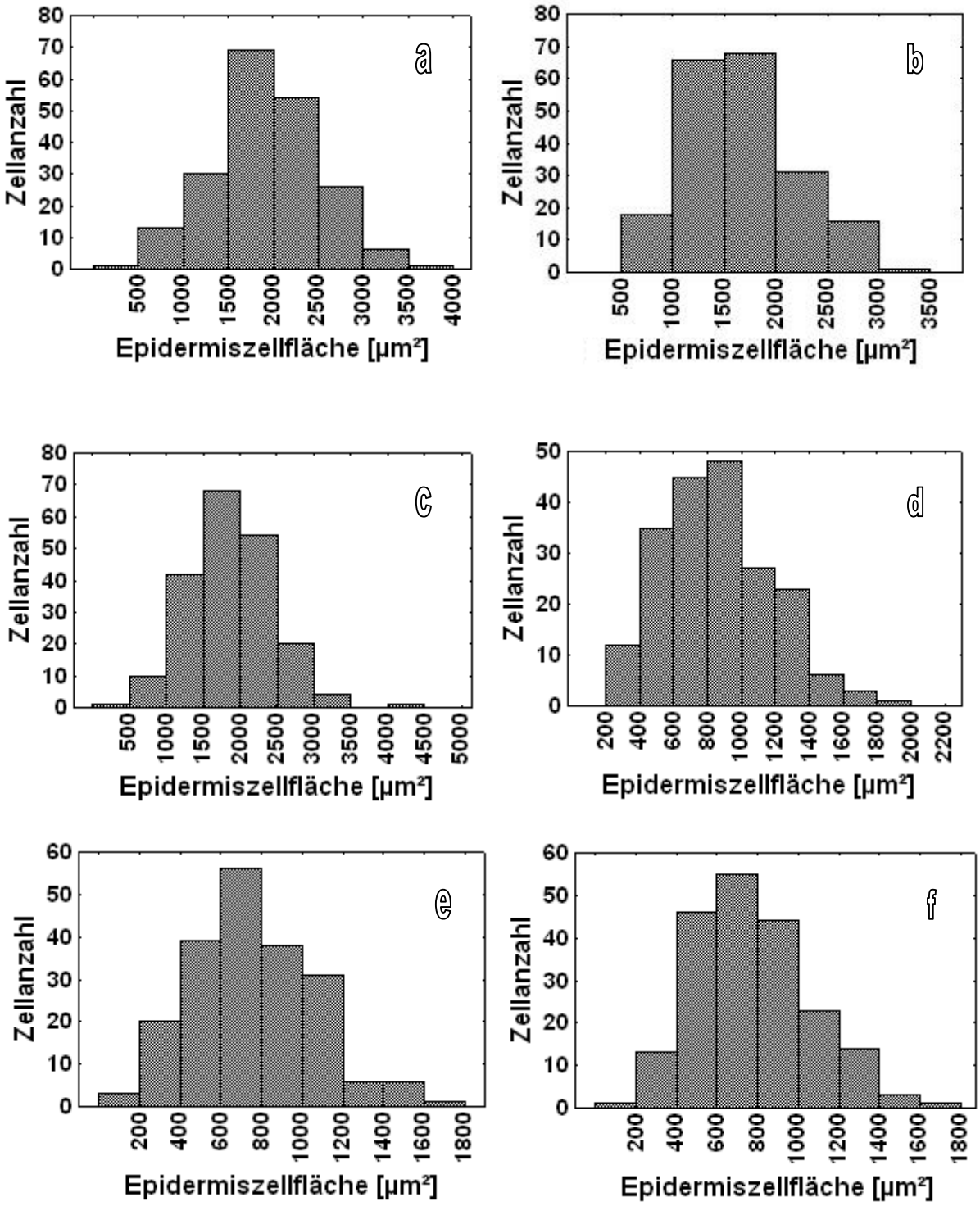


Abbildung 16: Histogramme der Epidermiszellflächen der a) Lb-, b) Lm-, c) Le-Oberseite sowie der d) Lb-, e) Lm- und f) Le-Unterseite; n = 200

Tabelle 7: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Epidermiszellflächen von Lb-, Lm-, Le-Oberseite und Lb-, Lm- und Le-Unterseite

Probenahme	Min. [µm²]	Max. [µm²]	Mittelw. [µm²]	Std. [+/-]
Lb-Oberseite	440	3670	1930	600
Lm-Oberseite	565	3080	1655	540
Le-Oberseite	500	4430	1870	550
Lb-Unterseite	250	1870	865	320
Lm-Unterseite	180	1640	765	295
Le-Unterseite	155	1610	775	290

3.7. Umfang der Epidermiszellen der Lamina

Die Umfänge der Epidermiszellen von der Lb-, Lm-, Le-Oberseite und der Unterseite sind als Häufigkeitsverteilung in den Histogrammen der Abbildung 17 dargestellt.

Aus den Abbildungen 17a), 17b) und 17c) ist erkennbar, dass die meisten Epidermiszellen von der Lb-Oberseite Umfänge aufweisen, die zwischen den Klassengrenzen 160 und 180 µm (46 Zellen) liegen, von der Lm-Oberseite zwischen den Grenzen 140 und 160 µm (42 Zellen) und bei Epidermiszellen von der Le-Oberseite liegen sie zwischen den Klassengrenzen 160 und 180 µm (53 Zellen). Aus den Abbildungen 17d) bis f) ist erkennbar, dass die meisten Epidermiszellen von der Lb-Unterseite Umfänge aufweisen, die zwischen den Klassengrenzen 140 und 160 µm (41 Zellen) liegen, von der Lm-Unterseite und von der Le-Unterseite zwischen den Grenzen 120-140 µm (48 bzw. 45 Zellen). Die MK-Werte der Lb-, Lm- und Le-Oberseite betragen 0,6, 0,5 und 1,0, die MK-Werte der Lb-, Lm- und Le-Unterseite 0,2, 0,5 und 1,4, die Häufigkeitsverteilungen sind alle rechtsschief.

Die minimalen, maximalen und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Epidermiszellumfänge der Lb-, Lm- und Le-Oberseite und –Unterseite sind in der Tabelle 8 zu finden.

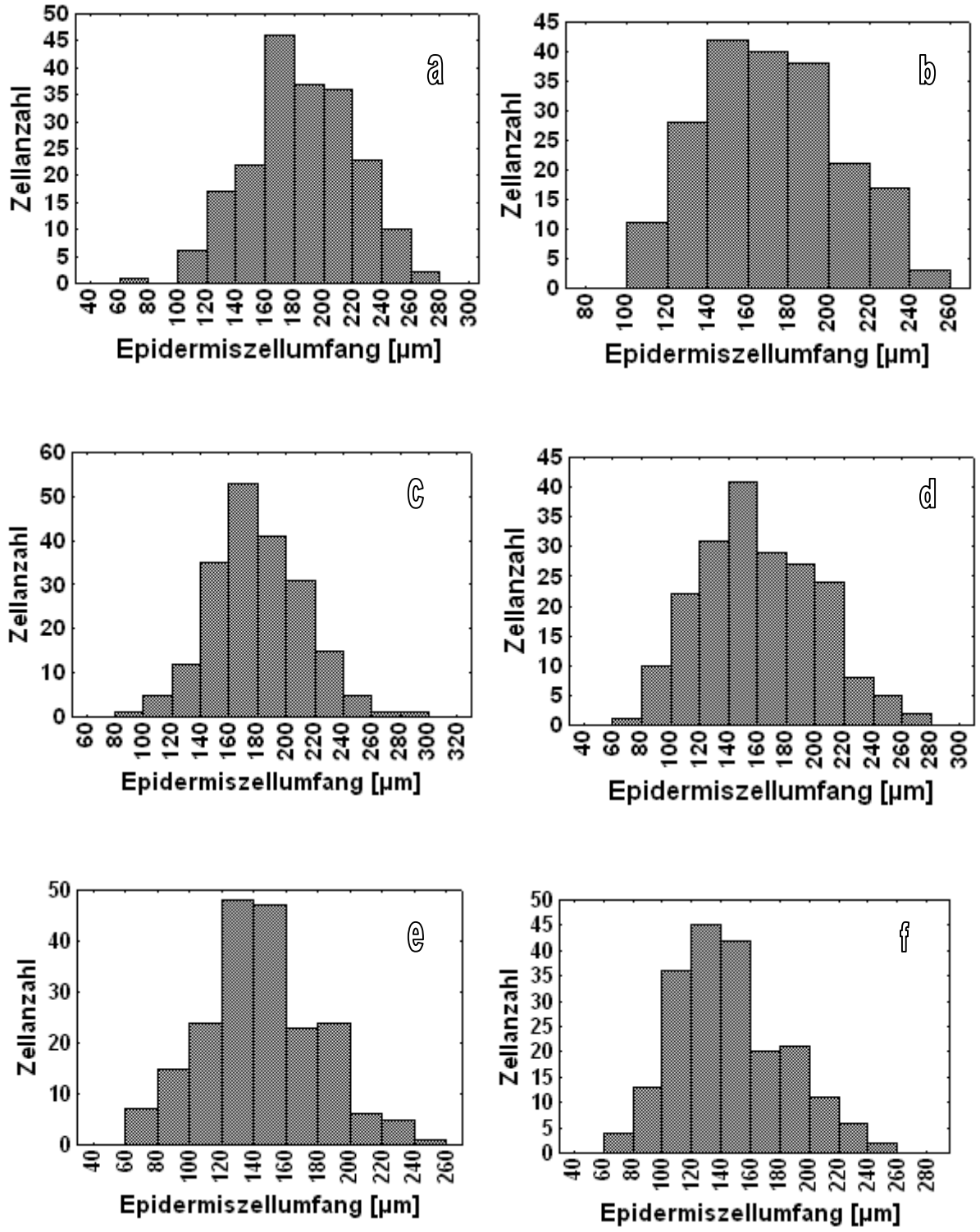


Abbildung 17: Histogramme der Epidermiszellumfänge der a) Lb-, b) Lm-, c) Le-Oberseite sowie der d) Lb-, e) Lm- und f) Le-Unterseite; n = 200

Tabelle 8: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Epidermiszellumfänge von Lb-, Lm-, Le-Oberseite und Lb-, Lm- und Le-Unterseite

Probenahme	Min. [µm]	Max. [µm]	Mittelw. [µm]	Std. [+/-]
Lb-Oberseite	80	280	185	40
Lm-Oberseite	100	245	170	35
Le-Oberseite	90	290	180	30
Lb-Unterseite	75	270	160	40
Lm-Unterseite	70	240	145	35
Le-Unterseite	60	240	150	40

3.8. Gehalte an Hydrokolloiden in ausgewachsenen Blättern

3.8.1. Hydrokolloidgehalte ausgewachsener Blätter bezogen auf die Blatt-Frischmasse und die Blatt-Trockenmasse

Die Hydrokolloidgehalte von 80 Blättern der Versuchsreihe A, 80 Blättern der Versuchsreihe B und von 240 Blättern der Versuchsreihe C (s. Kapitel 2.3.2), bezogen auf die Blatt-Frischmasse und –Trockenmasse, sind als Häufigkeitsverteilung in den Histogrammen der Abbildung 18 dargestellt.

Aus den Abbildungen 18a) und 18b) ist erkennbar, dass die meisten Blätter Hydrokolloidgehalte aufweisen, die zwischen den Klassengrenzen 3,5 % und 4,0 % bezogen auf die Frischmasse (22 Blätter) liegen bzw. 18 % - 20 % Hydrokolloidgehalt bezogen auf die Trockenmasse (20 Blätter). Die entsprechenden Klassengrenzen für die Versuchsreihe B lauten 3,0 % und 3,5 % für die Hydrokolloidgehalte in 36 frischen Blättern bzw. je 30 Blätter sind in den Klassen mit den Grenzen 14 bis 16 % und 16 bis 18 % zu finden (Abbildungen 18 c) und d)). In der Versuchsreihe C finden sich die meisten Blätter (74) mit den Hydrokolloidgehalten zwischen 2,0 % und 2,5 % bezogen auf die Frischmasse bzw. mit Gehalten zwischen 10 und 15 % bezogen auf die Trockenmasse (120 Blätter). Nur die Abbildung 18a) zeigt eine schwache linksschiefe Verteilung mit einem MK-Wert von –0,1. Die MK-Werte für die Verteilungen in den Abbildungen 18b) – 18f) lauten 0,2, 0,9, 1,3, 0,9 und 0,9.

Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Hydrokolloidgehalte der Blätter aus den Versuchsreihen A - C sind in den Tabellen 9 (bezogen auf die Frischmasse) und 10 (bezogen auf die Trockenmasse) aufgeführt.

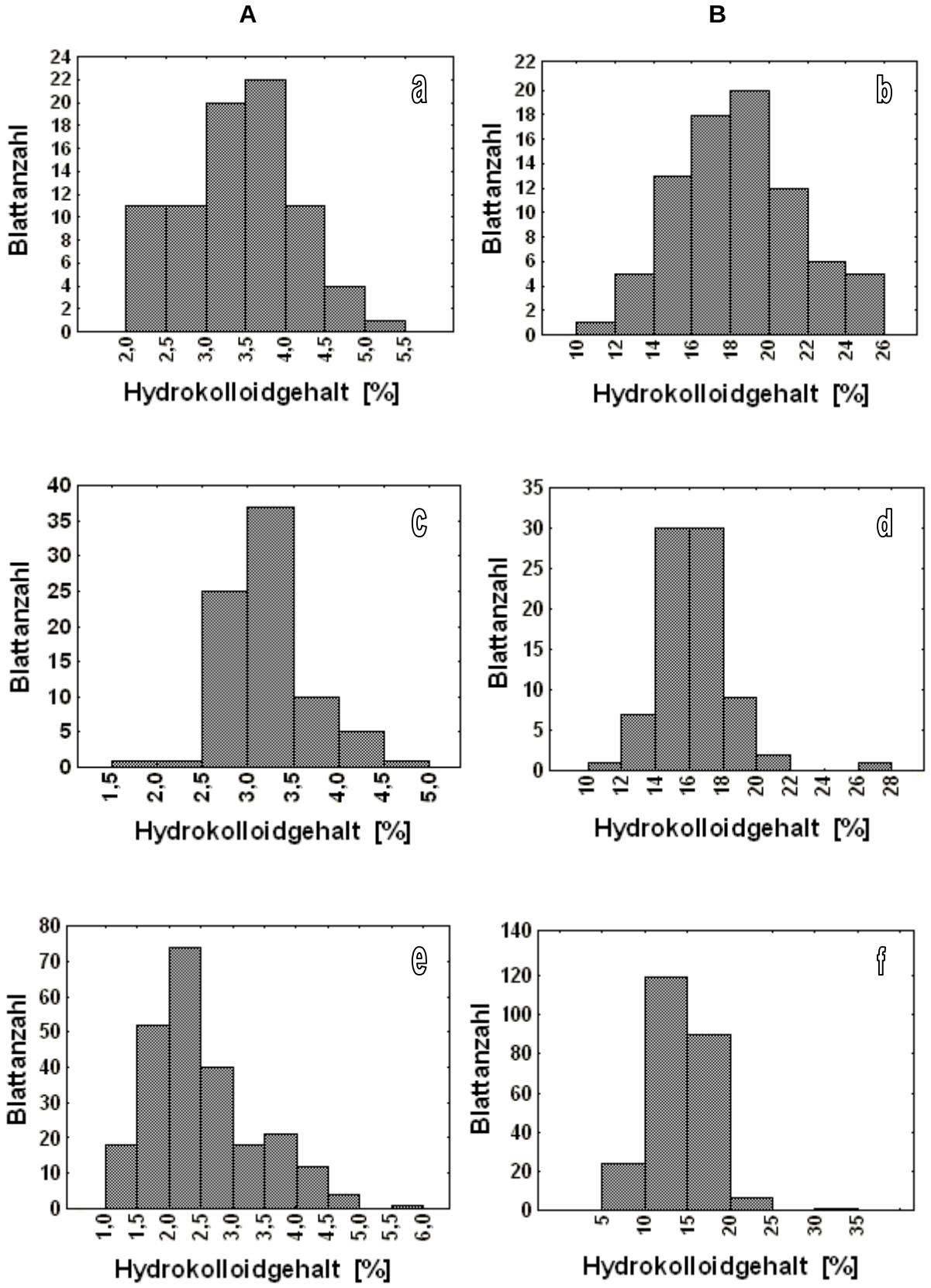


Abbildung 18: Histogramme der Hydrokolloidgehalte von 80 einzeln untersuchten Blättern der Versuchsreihen A und B bzw. 240 Blättern der Versuchsreihe C; a), c) und e) bezogen auf die Frischmasse, b), d) und f) bezogen auf die Trockenmasse.

Anschließend wurden statistische Prüfungen innerhalb der Gruppen mit dem Welch-Test (Lozán, 1992) durchgeführt. Nur bei der 1. Probenahme innerhalb der Versuchsreihe A (s. Tabelle 9), wurden deutlich geringere Hydrokolloid-konzentrationen, bezogen auf die Blattfrischmasse extrahiert als bei den übrigen, bei denen statistisch keine Unterschiede feststellbar ($\alpha = 0{,}05$) waren. Innerhalb der Versuchsreihe B enthielt die 3. Pflanze höhere Hydrokolloidgehalte als die anderen. Innerhalb der Versuchsreihe C erreichten die Blätter ihren höchsten Hydrokolloid-gehalt im März und April 2003. Bei einer Irrtumwahrscheinlichkeit von 5 % ergibt sich ein t-Wert von 1,28. Bei 38 Freiheitsgraden (FG) und einem kritischen Wert von 2,024 lässt sich feststellen, dass beide Monatswerte keine signifikanten Unterschiede gegenüber dem Restkollektiv zeigen. Ebenfalls statistisch nicht signifikant erreichten die Hydrokolloidgehalte der Blätter ihre tiefsten Werte im Mai, Juni und Juli 2003.

Tabelle 9: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Hydrokolloidgehalte der Blätter der Versuchsreihen A – C, bezogen auf die Frischmasse

Versuchsreihe	Min. [%]	Max. [%]	Mittelw. [%]	Std. [+/-]
A	**2,0**	**5,4**	**3,4**	**0,7**
1. Probenahme	2,0	4,0	3,1	0,7
2. Probenahme	2,0	5,4	3,6	0,9
3. Probenahme	2,1	4,3	3,4	0,6
4. Probenahme	2,1	4,5	3,5	0,7
B	**2,0**	**4,9**	**3,2**	**0,5**
1. Pflanze	2,4	4,9	3,2	0,5
2. Pflanze	2,6	3,9	3,3	0,3
3. Pflanze	2,8	4,4	3,4	0,5
4. Pflanze	2,0	4,5	3,0	0,5
C	**1,0**	**5,7**	**2,5**	**0,9**
März ‘03	2,4	4,4	3,4	0,5
April ‘03	2,0	4,3	3,1	0,6
Mai ‘03	1,7	2,5	2,2	0,2
Juni ‘03	1,7	2,6	2,1	0,3
Juli ‘03	1,5	2,6	2,0	0,3
August ‘03	1,2	3,5	2,2	0,6
September ‘03	1,3	3,0	2,2	0,4
Oktober ‘03	1,3	5,7	2,4	1,2
November ‘03	1,2	3,2	2,1	0,6
Dezember ‘03	1,0	4,6	2,5	1,2
Januar ‘04	1,5	4,5	3,1	1,0
Februar ‘04	1,6	4,7	3,1	1,0

Die Blätter der 1. Probenahme der Versuchsreihe A ergaben mit 16,3 % den geringsten Trockenhydrokolloidgehalt bezogen auf die Blatt-Trockenmasse (s. Tabelle 10). Die 4. Pflanze der Reihe B enthielt mit 15,4 % den geringsten Trockenhydrokolloidgehalt bezogen auf die Trockenmasse. Die Monats-Werte von März und April 2003 erreichten die höchsten Beträge. Sie zeigen keine signifikanten Unterschiede bei $\alpha = 0{,}05$. Weiterhin wurden die Monatswerte von Juni und Juli 2003 geprüft und bei einer Irrtumwahrscheinlichkeit von 5 % erweisen sie sich als deutlich unterschiedlich; die Blätter von Juli 2003 ergaben die niedrigsten Hydrokolloidgehalte bezogen auf die Trockenmasse.

Tabelle 10: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Hydrokolloidgehalte der Blätter der Versuchsreihen A – C, bezogen auf die Trockenmasse

Versuchsreihe	Min. [%]	Max. [%]	Mittelw. [%]	Std. [+/-]
A	**11,6**	**25,9**	**18,4**	**3,3**
1. Probenahme	11,6	22,0	16,3	2,9
2. Probenahme	12,2	25,9	19,8	4,2
3. Probenahme	12,4	21,6	18,3	2,1
4. Probenahme	14,4	24,0	19,2	2,7
B	**10,1**	**27,1**	**16,4**	**2,2**
1. Pflanze	14,1	27,1	17,3	2,7
2. Pflanze	14,0	20,7	16,7	1,5
3. Pflanze	13,1	19,9	16,2	2,0
4. Pflanze	10,1	19,8	15,4	2,2
C	**7,2**	**32,5**	**14,2**	**3,2**
März ‘03	12,3	20,2	16,5	1,9
April ‘03	11,3	23,1	16,6	2,5
Mai ‘03	12,6	17,9	15,4	1,4
Juni ‘03	12,3	17,9	14,4	1,7
Juli ‘03	10,1	15,8	13,0	1,7
August ‘03	7,6	22,1	14,4	3,5
September ‘03	9,7	18,7	13,7	2,3
Oktober ‘03	9,1	32,5	14,0	5,3
November ‘03	7,3	18,2	12,1	2,9
Dezember ‘03	7,2	18,7	13,3	3,6
Januar ‘04	8,7	18,1	13,8	2,7
Februar ‘04	8,1	23,3	13,7	3,7

3.8.2. Hydrokolloidgehalte bezogen auf die Blattfläche

Die Hydrokolloidgehalte von 80 Blättern der Versuchsreihe A, 80 Blättern der Versuchsreihe B und von 240 Blättern der Versuchsreihe C (s. Kapitel 2.3.2), bezogen auf die Blattfläche, sind als Häufigkeitsverteilung in den Histogrammen der Abbildung 19 dargestellt.

Aus der Abbildung 19a) ist erkennbar, dass die meisten Blätter der Versuchsreihe A Hydrokolloidgehalte aufweisen, die zwischen den Klassengrenzen 10 und 11 µg/mm² Blattfläche (12 Blätter) liegen. Die entsprechenden Klassengrenzen für die Versuchsreihe B lauten 8 und 9 µg/mm² für die Hydrokolloidgehalte von 48 frischen Blättern (Abbildung 19b)). In der Versuchsreihe C finden sich die meisten Blätter (82) mit den Hydrokolloidgehalten zwischen 4 und 6 µg/mm² Blattfläche (Abbildung 19c)).

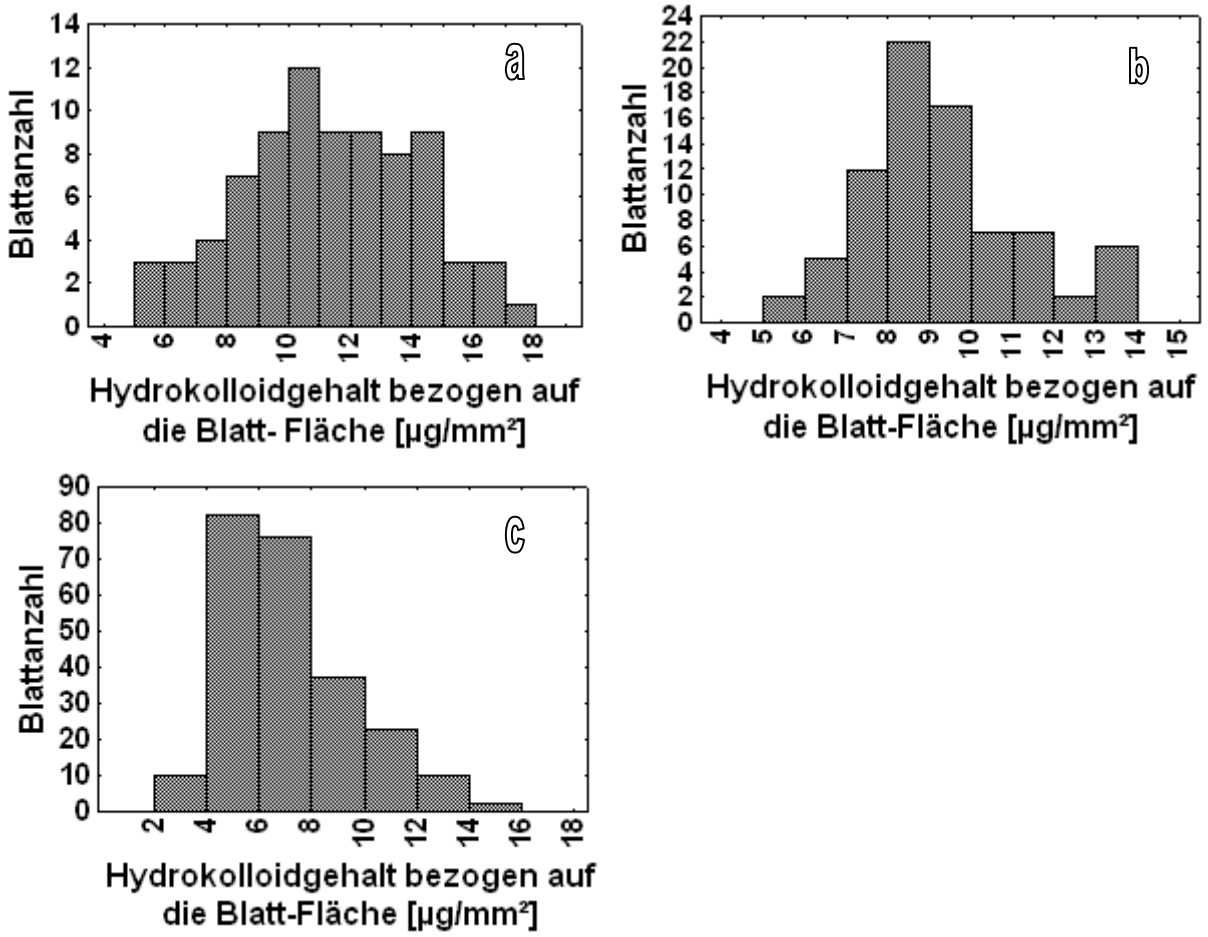


Abbildung 19: Histogramme der Hydrokolloidgehalte bezogen auf die Blattfläche [µg/mm²] von a) 80 einzeln untersuchten Blättern der Versuchsreihen A und b) der Versuchsreihe B bzw. c) von 240 Blättern der Versuchsreihe C

Nur die Abbildung 19a) zeigt eine schwache linksschiefe Verteilung mit einem MK-Wert von –0,1. Die Häufigkeitsverteilung der Hydrokolloidgehalte der

Versuchsreihe A ist schwach linksschief und ihr MK-Wert beträgt –0,1. Abbildung 19b) und 19c) zeigen eine rechtschiefe Verteilung und ihre MK-Werte betragen 0,5 bzw. 0,3.

Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Hydrokolloidgehalte bezogen auf die Blattfläche aus den Versuchsreihen A - C sind in der Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Hydrokolloidgehalte der Blätter der Versuchsreihen A – C, bezogen auf die Blattfläche

Versuchsreihe	Min. [µg/mm²]	Max. [µg/mm²]	Mittelw. [µg/mm²]	Std. [+/-]
A	**5,4**	**17,1**	**11,3**	**2,8**
1. Probenahme	5,4	13,6	9,9	2,3
2. Probenahme	6,3	16,8	11,7	3,2
3. Probenahme	3,2	17,1	11,6	2,9
4. Probenahme	7,5	16,6	12,0	2,7
B	**5,5**	**13,8**	**9,3**	**1,9**
1. Pflanze	6,8	12,3	8,7	1,3
2. Pflanze	6,3	13,3	9,3	1,6
3. Pflanze	8,1	13,2	10,8	1,6
4. Pflanze	5,5	13,8	8,5	2,3
C	**2,9**	**15,5**	**7,1**	**2,5**
März ‘03	5,9	15,5	10,7	2,5
April ‘03	6,7	14,6	9,5	2,0
Mai ‘03	4,8	8,1	6,2	0,7
Juni ‘03	4,6	7,8	5,9	0,7
Juli ‘03	4,6	7,8	5,7	0,8
August ‘03	3,5	8,0	6,1	1,2
September ‘03	3,5	8,8	6,0	1,3
Oktober ‘03	4,2	13,8	6,6	2,5
November ‘03	3,3	8,8	5,6	1,8
Dezember ‘03	2,9	13,4	6,9	3,1
Januar ‘04	4,4	12,0	8,2	2,7
Februar ‘04	4,5	12,0	8,3	2,6

Die Blätter der 1. Probenahme der Versuchsreihe A ergaben mit 9,9 µg/mm² Blattfläche den geringsten Trockenhydrokolloidgehalt (s. Tabelle 11), bei der 2. - 4. Probenahme lagen die Gehalte eng zusammen zwischen 11,3 und 11,7 µg/mm². Die

Blätter der verschiedenen Pflanzen der Versuchsreihe B zeigen keine signifikanten Unterschiede ihrer Hydrokolloidgehalte.

Die Monatswerte von März und April 2003 erreichten die höchsten Beträge. Sie zeigen keine signifikanten Unterschiede bei $\alpha = 0{,}05$ Irrtumswahrscheinlichkeit. Weiterhin wurden die in den Monaten Juni, Juli und November 2003 geernteten Blätter wegen ihres niedrigen Hydrokolloidgehaltes statistisch geprüft. Bei einer Irrtumwahrscheinlichkeit von 5 % erweisen sie sich als nicht unterscheidbar vom übrigen Kollektiv. Im März 2003 erreichten die Blätter ihre höchsten Hydrokolloidgehalte mit 10,7 µg/mm² im Durchschnitt.

3.9. Reinheit der Hydrokolloide

Die Hydrokolloide unterschieden sich in ihrer Farbe sowohl in Lösung als auch nach der Fällung mit 96 %igem Ethanol und nach der Trocknung. Die Färbung ist abhängig vom Alter des jeweiligen Blattes, das als Hydrokolloidquelle diente. Die aus jungen Blättern extrahierten Hydrokolloide scheinen in Lösung klarer, leicht gelblich bis leicht orange gefärbt. Das gefällte Pellet ist weich und der Farbton variiert von weiß bis leicht grau. Im Gegensatz dazu weisen Extrakte aus ausgewachsenen Blättern orange bis braunfarbene Lösungen auf und die Pellets sind hellgrau bis bräunlich gefärbt. Nach der Trocknung ist das Pektinpulver der jungen Blätter weiß bis leicht gelblich, während die Pektine aus ausdifferenzierten Blättern braun bis dunkelbraun sind (Abbildung 20)). Während das Pellet von jungen Blättern brüchig ist, sieht das Pellet der ausgewachsenen Blätter faseriger aus, wenn man es zerreißt.

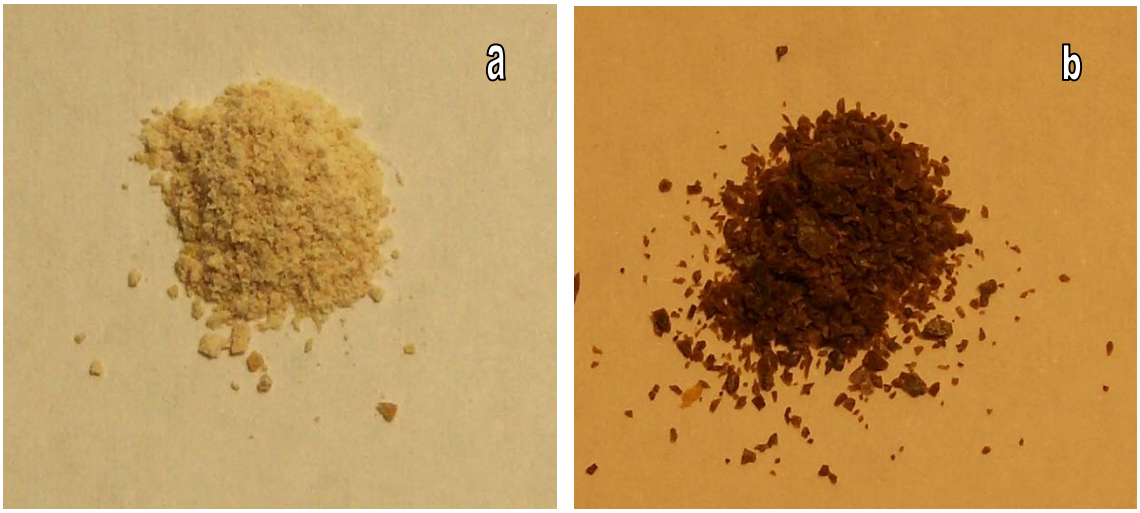


Abbildung 20: Trockenpektinpulver von a) jungen und b) ausgewachsenen Blättern

Des Weiteren wurde die Reinheit der gelösten und trockenen Hydrokolloide geprüft. Mit Phloroglucin-HCl kann man sofort die Lignin enthaltenen Zellreste in den Trockenproben als rote Objekte finden (Abbildung 21a)). Abbildung 21b) zeigt die Sklerenchymreste in den flüssigen Proben. Nach der Zugabe von Thionin auf Pektinpulver verändert sich die Farbe am äußersten Rand von gelblich bis orange zu violett bis blau (Abbildung 21c)). Bei sauberen Proben bildet sich zu Beginn ein violetter Schleier. Eine Verunreinigung verursacht nicht nur die Veränderung der Farbe von violett zu blau, sondern auch eine Bildung von blauen Bruchstücken.

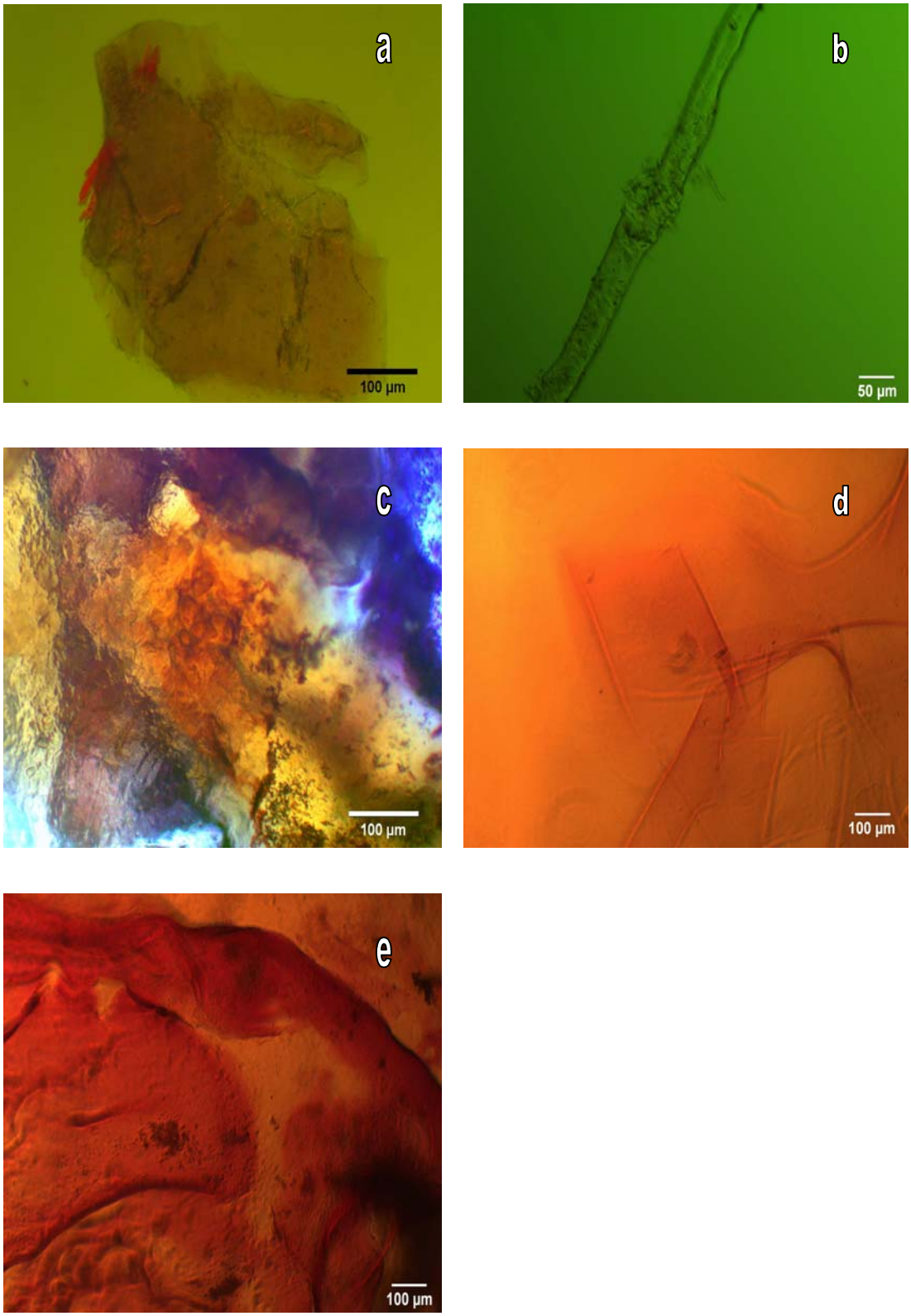


Abbildung 21: Mikroskopische Untersuchung von Hydrokolloiden, zum Teil angefärbt: a) Trockenhydrokolloid mit Phloroglucin-HCl gefärbt, b) Zellreste in gelöstem Hydrokolloid (ohne Färbung), c) Hydrokolloidpulver reagiert mit Thionin violett bis blau, d) gereinigtes Pektin mit Thionin gefärbt und mit Halogenlicht beleuchtet, e) nicht gereinigte Pektinprobe, behandelt wie (d)

Die gelösten Hydrokolloide bilden mit ethanolischer Thioninlösung einen dünnen Film auf den Objektträger. Bei gereinigten Pektinen aus jungen Blättern ist die Schicht glatt und die Farbverteilung homogen (Abbildung 21d)). Im Gegensatz dazu ist die Schicht der nicht gereinigten Proben deutlich dunkler und intensiver orange bis dunkel braun gefärbt, wenn man die Probe mit Halogenlampe beleuchtet mikroskopiert (Abbildung 21e)).

3.10. Charakterisierung der Hydrokolloide

3.10.1. Pektingehalt und Esterifizierungsgrad

Die Trockenhydrokolloide wurden nach dem Verseifungsverfahren (KOOIMAN, 1969) analysiert, um ihre Pektingehalte zu ermitteln. Die Ergebnisse sind in den Histogrammen a) – c) der Abbildung 22 dargestellt.

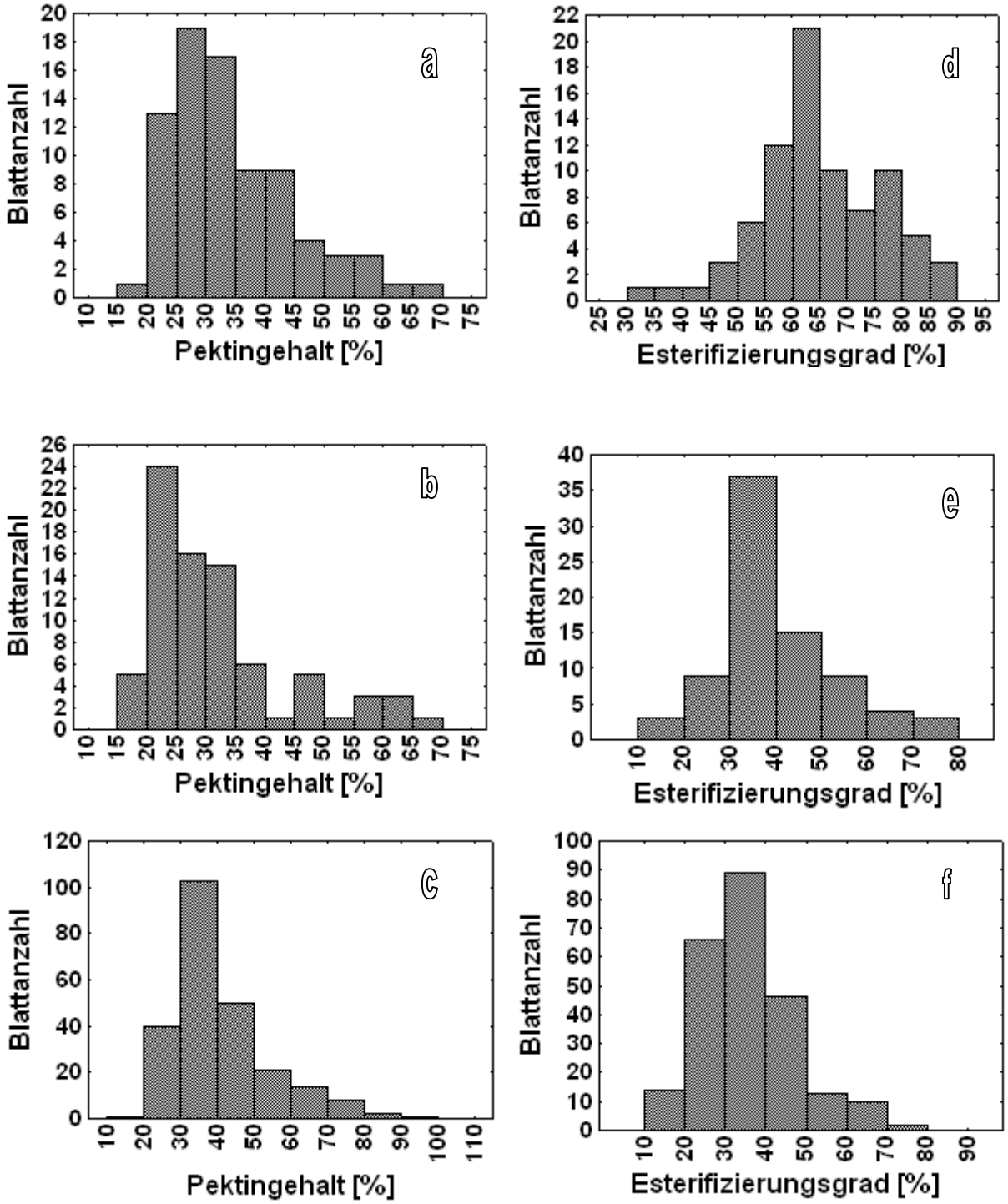


Abbildung 22: Histogramme der Pektingehalte a), b) und c) der Blätter und deren Esterifizierungsgrad d), e) und f) der Versuchsreihen A - C

Aus der Abbildung 22a) ist erkennbar, dass die meisten Trockenkolloide aus Blättern der Versuchsreihe A Pektingehalte aufweisen, die zwischen den Klassengrenzen 25 und 30 % (aus 19 Blättern) liegen, bei der Versuchsreihe B bildet die Klasse mit den Grenzen 20 und 25 % mit Trockenkolloiden aus 24 Blättern das

Maximum (Abbildung 22b)) und bei C liegen die Klassengrenzen bei 30 und 40 % mit 103 Trockenkolloiden (Abbildung 22c)). Die Pektingehalte sind normal verteilt, rechtsschief und ihre MK-Werte liegen bei a) 1,0, b) 1,3 und c) 1,5.

Aus der Abbildung 22d) ist erkennbar, dass die meisten Trockenkolloide aus Blättern der Versuchsreihe A Esterifizierungsgrade aufweisen, die zwischen den Klassengrenzen 60 und 65 % (aus 21 Blättern) liegen, bei der Versuchsreihe B und C bilden die Klassen mit den Grenzen 30 und 40 % mit Trockenkolloiden aus 37 bzw. 89 Blättern das Maximum (Abbildung 22e) und f)). Die Esterifizierungsgrade sind normal verteilt, linksschief bei A mit einem MK-Wert von -0,2, rechtsschief bei B und C mit MK-Werten von e) 0,7 und f) 0,9.

Des Weiteren wurden die minimalen, maximalen und die Mittelwerte der Pektingehalte und der Esterifizierungsgrade der Versuchsreihen A - C sowie deren Standardabweichungen in den Tabelle 12 und 13 zusammengefasst.

Innerhalb der Versuchsreihe A weisen die Hydrokolloide der Blätter der 1. Probenahme im Mittel mit 29,4 % die geringsten Pektingehalte in den Trockenhydrokolloiden auf. Bei den anderen Proben zeigen sich bei Mittelwerten zwischen 35,8 % und 38,5 % keine signifikanten Unterschiede. In der Reihe B enthalten die Blätter der 4. Pflanze mit im Mittel 37,2 % die höchsten Pektingehalte in den Trockenhydrokolloiden. Bei einer Irrtumwahrscheinlichkeit von 5 % zeigen die Blätter der übrigen Pflanzen keine deutlichen Unterschiede in ihren Pektingehalten. Auch die im Januar 2004 geernteten Blätter der Versuchsreihe C weichen mit 31,9 % mittlerem Pektingehalt signifikant von den anderen Monatsmittelwerten ab.

Tabelle 12: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Pektingehalte der Trockenkolloide der Versuchsreihen A – C

Versuchsreihe	Min. [%]	Max. [%]	Mittelw. [%]	Std. [+/-]
A	**17**	**66**	**35**	**10**
1. Probenahme	21	44	29	6
2. Probenahme	17	57	36	11
3. Probenahme	24	55	35	10
4. Probenahme	25	66	39	12
B	**16**	**69**	**32**	**12**
1. Pflanze	21	55	32	9
2. Pflanze	18	63	30	12
3. Pflanze	18	60	28	9
4. Pflanze	16	69	37	16
C	**20**	**97**	**41**	**13**
März ‘03	33	71	44	12
April ‘03	29	77	38	10
Mai ‘03	26	67	41	10
Juni ‘03	28	75	42	13
Juli ‘03	25	97	43	19
August ‘03	28	66	44	13
September ‘03	29	56	38	8
Oktober ‘03	21	90	47	19
November ‘03	24	74	42	14
Dezember ‘03	30	73	40	12
Januar ‘04	20	65	32	10
Februar ‘04	24	24	37	12

Bei den Esterifizierungsgraden der Versuchsreihe A (s. Tabelle 13) weisen die Pektine der 1. Probenahme mit mittleren 77 % deutlich die höchsten Werte auf gegenüber den 59 bis 63 % der übrigen Gruppen ($\alpha = 0{,}05$). In der Versuchsreihe B zeigen die mittleren Esterifizierungsgrade der 2. Pflanze statistisch abgesichert die niedrigsten Werte mit mittleren 37 %. Die Monatswerte von November und Dezember 2003 liefern durchschnittliche Esterifizierungsgrade von 29 % und 25 % und weichen so deutlich von den übrigen Mittelwerten nach unten ab.

Tabelle 13: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Esterifizierungsgrade der Trockenkolloide der Versuchsreihen A – C

Versuchsreihe	Min. [%]	Max. [%]	Mittelw. [%]	Std. [+/-]
A	**34**	**88**	**65**	**11**
1. Probenahme	64	88	77	6
2. Probenahme	43	77	61	9
3. Probenahme	49	81	63	8
4. Probenahme	34	74	59	10
B	**11**	**74**	**40**	**13**
1. Pflanze	24	62	42	10
2. Pflanze	20	68	37	11
3. Pflanze	11	74	39	12
4. Pflanze	11	72	40	18
C	**10**	**78**	**36**	**12**
März ‘03	23	65	36	11
April ‘03	23	64	40	9
Mai ‘03	20	68	39	11
Juni ‘03	20	66	34	14
Juli ‘03	25	78	44	13
August ‘03	21	68	41	12
September ‘03	31	47	39	5
Oktober ‘03	12	68	32	14
November ‘03	10	47	29	10
Dezember ‘03	16	52	25	8
Januar ‘04	21	59	34	11
Februar ‘04	16	70	33	12

3.10.2. Pektingehalt bezogen auf die Blatt-Frischmasse und -Trockenmasse

Die Pektingehalte von 80 Blättern der Versuchsreihe A, 80 Blättern der Versuchsreihe B und von 240 Blättern der Versuchsreihe C (s. Kapitel 2.3.2), bezogen auf die Blatt-Frischmasse und –Trockenmasse, sind als Häufigkeitsverteilung in den Histogrammen der Abbildung 23 dargestellt.

Aus den Abbildungen 23a) und 23b) ist erkennbar, dass die meisten Blätter Pektingehalte aufweisen, die zwischen den Klassengrenzen 10 und 12 mg/g bezogen auf die Frischmasse (22 Blätter) liegen bzw. 50 und 60 mg/g Pektingehalt bezogen auf die Trockenmasse (22 Blätter). Die entsprechenden Klassengrenzen für die Versuchsreihe B lauten 6 – 8 mg/g für die Pektingehalte in 29 frischen Blättern bzw. 22 Blätter sind in der Klasse mit den Grenzen 30 bis 40 mg/g bezogen auf die Trockenmasse zu finden (Abbildungen 23c) und d)). In der Versuchsreihe C finden sich die meisten Blätter (125) mit den Pektingehalten zwischen 5 und 10 mg/g bezogen auf die Frischmasse bzw. mit Gehalten zwischen 40 und 60 mg/g bezogen auf die Trockenmasse (104 Blätter). Die MK-Werte für die rechtsschiefen Verteilungen in den Abbildungen 23a) – f) lauten 1,1, 0,9, 1,5, 1,2, 1,7 und 1,5.

Des Weiteren wurden die minimalen, maximalen und die Mittelwerte der Pektingehalte der Versuchsreihen A - C bezogen auf die Frischmasse sowie deren Standardabweichungen in den Tabelle 14 und 15 zusammengefasst.

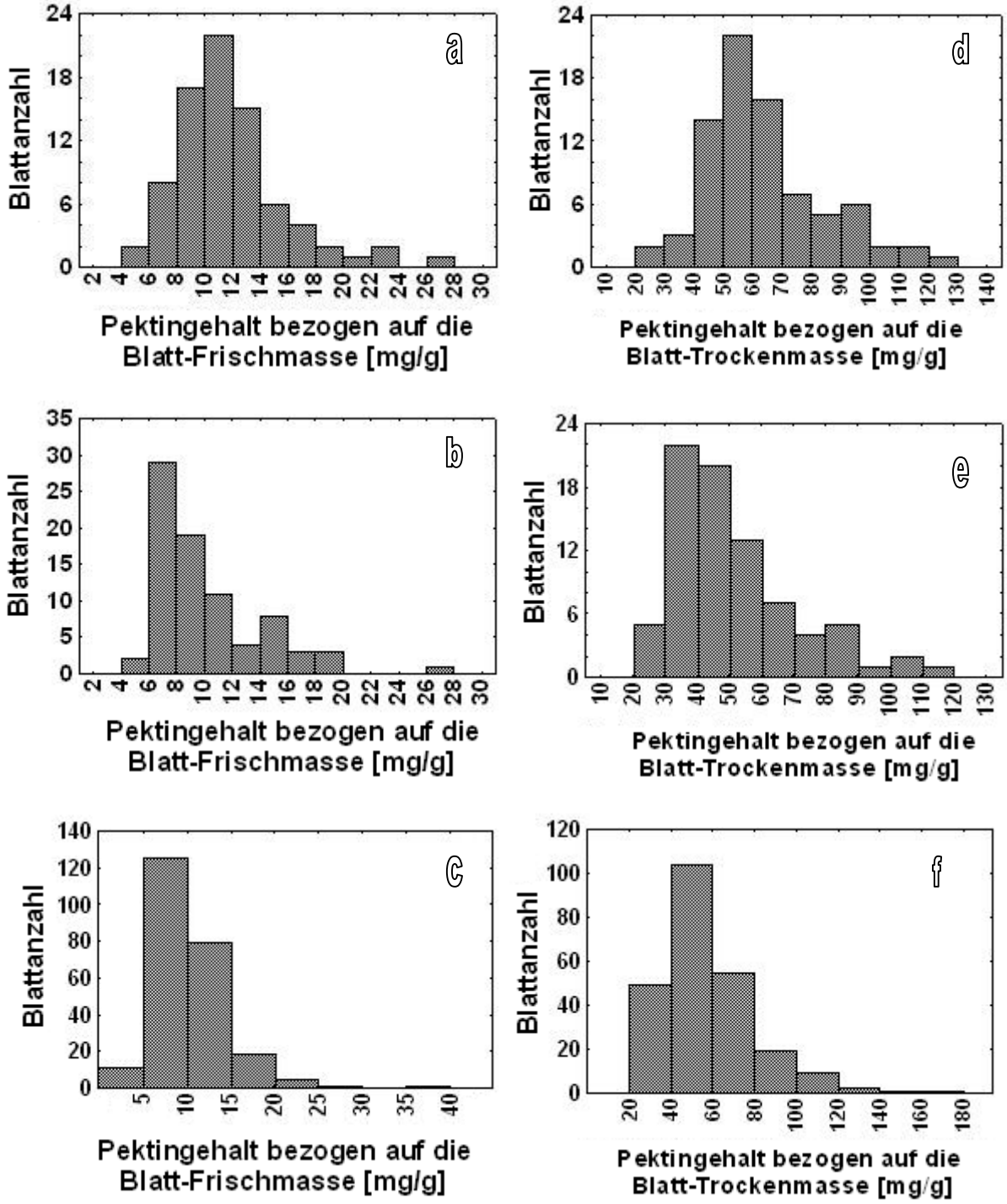


Abbildung 23: Histogramme der Pektingehalte der Blätter a), b) und c) bezogen auf die Frischmasse und d), e) und f) bezogen auf die Trockenmasse der Versuchsreihen A - C

Tabelle 14: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Pektingehalte bezogen auf die Blatt-Frischmasse der Versuchsreihen A - C

Versuchsreihe	Min. [mg/g]	Max. [mg/g]	Mittelw. [mg/g]	Std. [+/-]
A	**4**	**26**	**12**	**4**
1. Probenahme	4	15	9	3
2. Probenahme	7	26	13	5
3. Probenahme	8	22	12	4
4. Probenahme	9	19	13	2
B	**6**	**26**	**10**	**4**
1. Pflanze	7	16	10	3
2. Pflanze	6	19	10	3
3. Pflanze	6	26	10	5
4. Pflanze	6	20	11	4
C	**3**	**35**	**10**	**4**
März ‘03	10	23	15	4
April ‘03	8	22	12	3
Mai ‘03	6	15	9	2
Juni ‘03	5	14	9	3
Juli ‘03	5	18	8	3
August ‘03	5	22	10	4
September ‘03	4	12	8	2
Oktober ‘03	3	35	11	8
November ‘03	4	16	9	3
Dezember ‘03	5	16	10	4
Januar ‘04	5	17	10	4
Februar ‘04	5	26	11	5

Der Mittelwert der Pektingehalte der Versuchsreihe A (s. Tabelle 14) beträgt 12 mg/g Blatt-Frischmasse und ist deutlich größer als die entsprechenden Werte der Versuchsreihen B und C mit 10 mg/g Frischmasse. Innerhalb der Versuchsreihe A weisen die Blätter der 1. Probenahme mit 9 mg/g Frischmasse deutlich den kleinsten Mittelwert auf. Innerhalb der Versuchsreihe B unterscheiden sich die Blätter von 4 verschiedenen Pflanzen in ihrem Pektingehalt bezogen auf die Blatt-Frischmasse bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0{,}05$ nicht. Die frischen Blätter der Versuchsreihe C erreichen im März 2003 einen maximalen Pektingehalt von 15 mg/g. Im Mai, Juni, Juli, September und November 2003 wurden die niedrigsten

Mittelwerte mit 8 – 9 mg/g Frischmasse gefunden, die sich aber von den übrigen Monatswerten statistisch nicht abhoben.

Tabelle 15: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Pektingehalte bezogen auf die Blatt-Trockenmasse der Versuchsreihen A - C

Versuchsreihe	Min. [mg/g]	Max. [mg/g]	Mittelw. [mg/g]	Std. [+/-]
A	**26**	**127**	**64**	**21**
1. Probenahme	26	76	48	13
2. Probenahme	41	117	70	25
3. Probenahme	42	94	64	17
4. Probenahme	49	127	72	18
B	**27**	**112**	**52**	**19**
1. Pflanze	37	86	55	16
2. Pflanze	28	103	50	19
3. Pflanze	27	112	46	20
4. Pflanze	28	102	56	21
C	**23**	**162**	**58**	**22**
März ‘03	51	112	72	17
April ‘03	45	105	62	14
Mai ‘03	46	104	62	16
Juni ‘03	39	102	60	18
Juli ‘03	29	137	56	25
August ‘03	29	145	65	31
September ‘03	32	71	52	12
Oktober ‘03	23	162	64	33
November ‘03	29	82	49	16
Dezember ‘03	32	118	52	18
Januar ‘04	23	84	44	15
Februar ‘04	24	128	52	24

Im Vergleich mit den Ergebnisse der Versuchsreihe B und C enthalten die Blätter der Versuchsreihe A deutlich höhere Pektingehalte bezogen auf die Blatt-Trockenmassen. Der Mittelwert liegt bei 64 mg/g. Innerhalb der Versuchsreihe A fällt der Mittelwert der Pektingehalte der Blätter der 1. Probenahme mit 48 mg/g Trockenmasse deutliche niedriger aus als die übrigen mit Mittelwerten zwischen 64 und 72 mg/g Trockenmasse. Innerhalb der Versuchsreihe B gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Pektingehalten der Pflanzen bezogen auf ihre Blatt-Trockenmassen. Im März 2003 zeigen die Blätter mit 72 mg/g

Trockenmasse deutlich ihren Maximalwert, im November 2003 und Januar 2004 erreichen die Pektingehalte mit 49 bzw. 44 mg/g ihr Minimum, unterscheiden sich aber nicht vom Rest.

3.10.3. Pektingehalt bezogen auf die Blattfläche

Aus der Abbildung 24a) ist erkennbar, dass die meisten Blätter der Versuchsreihe A Pektingehalte aufweisen, die zwischen den Klassengrenzen 3 und 4 µg/mm² Blattfläche (32 Blätter) liegen. Die entsprechenden Klassengrenzen für die Versuchsreihe B lauten 2 und 2,5 µg/mm² für die Pektingehalte von 22 frischen Blättern (Abbildung 24b)). In der Versuchsreihe C finden sich die meisten Blätter (95) mit den Pektingehalten zwischen 2 und 3 µg/mm² Blattfläche (Abbildung 24c)). Nur die Abbildung 19a) zeigt eine schwache linksschiefe Verteilung mit einem MK-Wert von –0,1. Die Häufigkeitsverteilung der Hydrokolloidgehalte der Versuchsreihe A ist schwach linksschief und ihr MK-Wert beträgt –0,1. Abbildung 19b) und 19c) zeigen eine rechtschiefe Verteilung und ihre MK-Werte betragen 0,5 bzw. 0,3.

Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Pektingehalte, bezogen auf die Blattfläche aus den Versuchsreihen A – C, sind in der Tabelle 16 aufgeführt.

Die Häufigkeitsverteilungen der Pektingehalte, bezogen auf die Blattfläche der Versuchsreihe A – C, sind rechtschief und ihre MK-Werte betragen 1,1, 1,6 und 1,7.

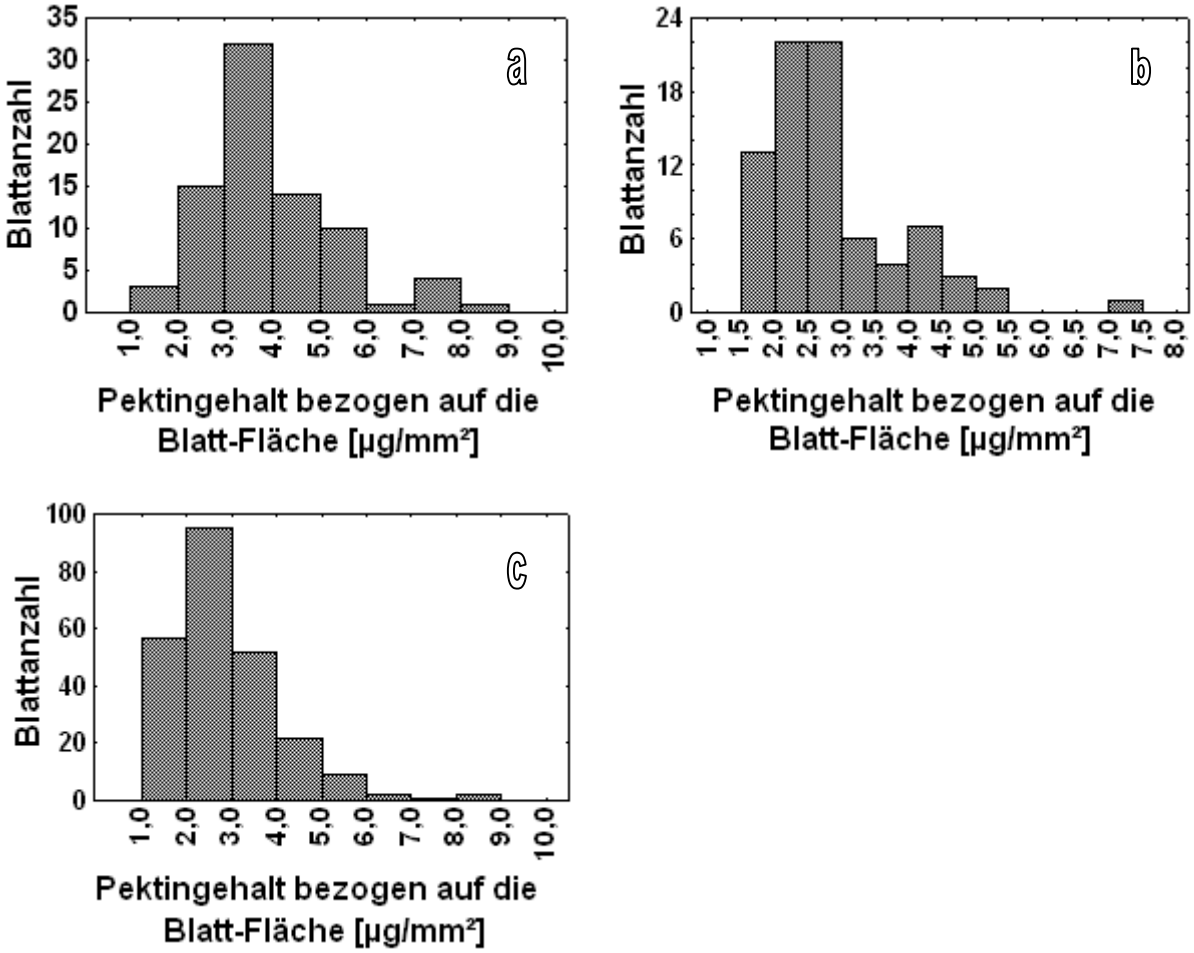


Abbildung 24: Histogramme der Pektingehalte der Blätter bezogen auf die Blattfläche [µg/mm²] der Versuchsreihen a) A, b) B und c) C

Tabelle 16: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Pektingehalte bezogen auf die Blatt-Fläche der Versuchsreihen A – C.

Versuchsreihe	Min. [µg/mm²]	Max. [µg/mm²]	Mittelw. [µg/mm²]	Std. [+/-]
A	**1**	**8**	**4**	**1**
1. Probenahme	1	5	3	1
2. Probenahme	2	8	4	2
3. Probenahme	3	8	4	1
4. Probenahme	3	6	4	1
B	**2**	**7**	**3**	**1**
1. Pflanze	2	4	3	1
2. Pflanze	2	5	3	1
3. Pflanze	2	7	3	1
4. Pflanze	2	5	3	1
C	**1**	**9**	**3**	**1**
März ‘03	3	9	5	1
April ‘03	2	7	4	1
Mai ‘03	2	4	3	1
Juni ‘03	2	4	2	1
Juli ‘03	1	6	2	1
August ‘03	1	5	3	1
September ‘03	1	4	2	1
Oktober ‘03	1	9	3	2
November ‘03	1	4	2	1
Dezember ‘03	1	4	3	1
Januar ‘04	1	4	3	1
Februar ‘04	1	7	3	1

3.10.4. Uronsäuregehalt nach MHDP-Test

Die Uronsäuregehalte der Trockenhydrokolloide für die Versuchsreihen A - C wurden ermittelt und die Ergebnisse in den Histogrammen der Abbildungen 25 dargestellt.

Aus der Abbildung 25a) ist erkennbar, dass die meisten Trockenkolloide aus Blättern der Versuchsreihe A Uronsäuregehalte aufweisen, die zwischen den Klassengrenzen 25 und 30 % (21 Blätter) liegen, bei den Versuchsreihen B und C bildet die Klasse mit den Grenzen 30 und 35 % bzw. 30 und 40 % mit Trockenkolloiden aus 19 bzw. 52 Blättern das Maximum (Abbildung 25b) und c)). Die

Uronsäuregehalte sind normal verteilt, schwach rechtsschief und ihre MK-Werte liegen bei a) 0,9, b) 0,1 und c) 0,9.

Des Weiteren wurden die minimalen, maximalen und die Mittelwerte der Uronsäuregehalte der Trockenkolloide der Blätter der Versuchsreihen A - C sowie deren Standardabweichungen in der Tabelle 17 zusammengefasst.

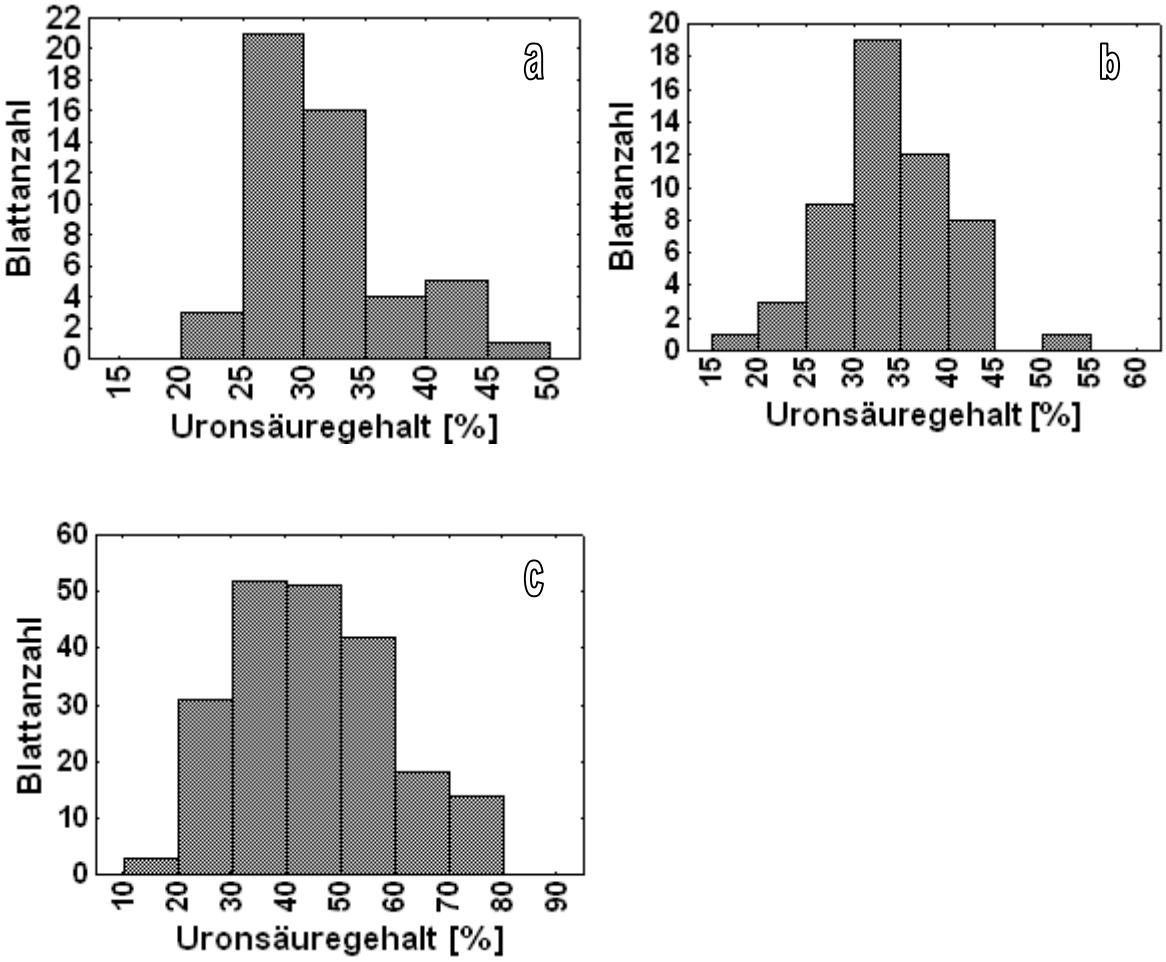


Abbildung 25: Histogramme der Uronsäuregehalte der Trockenhydrokolloide der Blätter der Versuchsreihen a) A, b) B und c) C

Tabelle 17: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Uronsäuregehalte der Blätter der Versuchsreihen A – C

Versuchsreihe	Min. [%]	Max. [%]	Mittelw. [%]	Std. [+/-]
A	**21**	**46**	**31**	**6**
1. Probenahme	21	37	29	5
2. Probenahme	26	33	29	2
3. Probenahme	23	46	37	7
4. Probenahme	26	39	30	3
B	**20**	**52**	**34**	**6**
1. Pflanzen	20	38	31	6
2. Pflanzen	30	41	36	4
3. Pflanzen	22	43	31	8
4. Pflanzen	31	44	35	4
C	**17**	**80**	**45**	**14**
März ‘03	23	53	41	11
April ‘03	17	39	26	5
Mai ‘03	24	39	31	4
Juni ‘03	36	53	45	5
Juli ‘03	39	59	48	7
August ‘03	52	65	57	4
September ‘03	34	52	41	5
Oktober ‘03	24	46	32	5
November ‘03	53	76	65	6
Dezember ‘03	38	74	59	10
Januar ‘04	50	80	68	7
Februar ‘04	35	56	48	5

3.11. Analyse der Hydrokolloide mit Hilfe der Gaschromatografie

3.11.1. Gaschromatografische Untersuchung der Referenzsaccharide

Als Referenzsaccharide wurden Arabinose, Galactose, Galacturonsäure als Methylester, Glucose, Rhamnose und Xylose jeweils als Trimethylsilylether gaschromatografisch analysiert. Abbildung 26 zeigt typische Gaschromatogramme der Einzelsubstanzen nach 4 stündiger Hydrolyse - d. h., die Monosaccharide wurden wie die Hydrokolloide (s. Kap. 3.11.2) parallel behandelt - und anschließender Derivatisierung. Es wurden jeweils 20 ng bezogen auf das Monosaccharid injiziert.

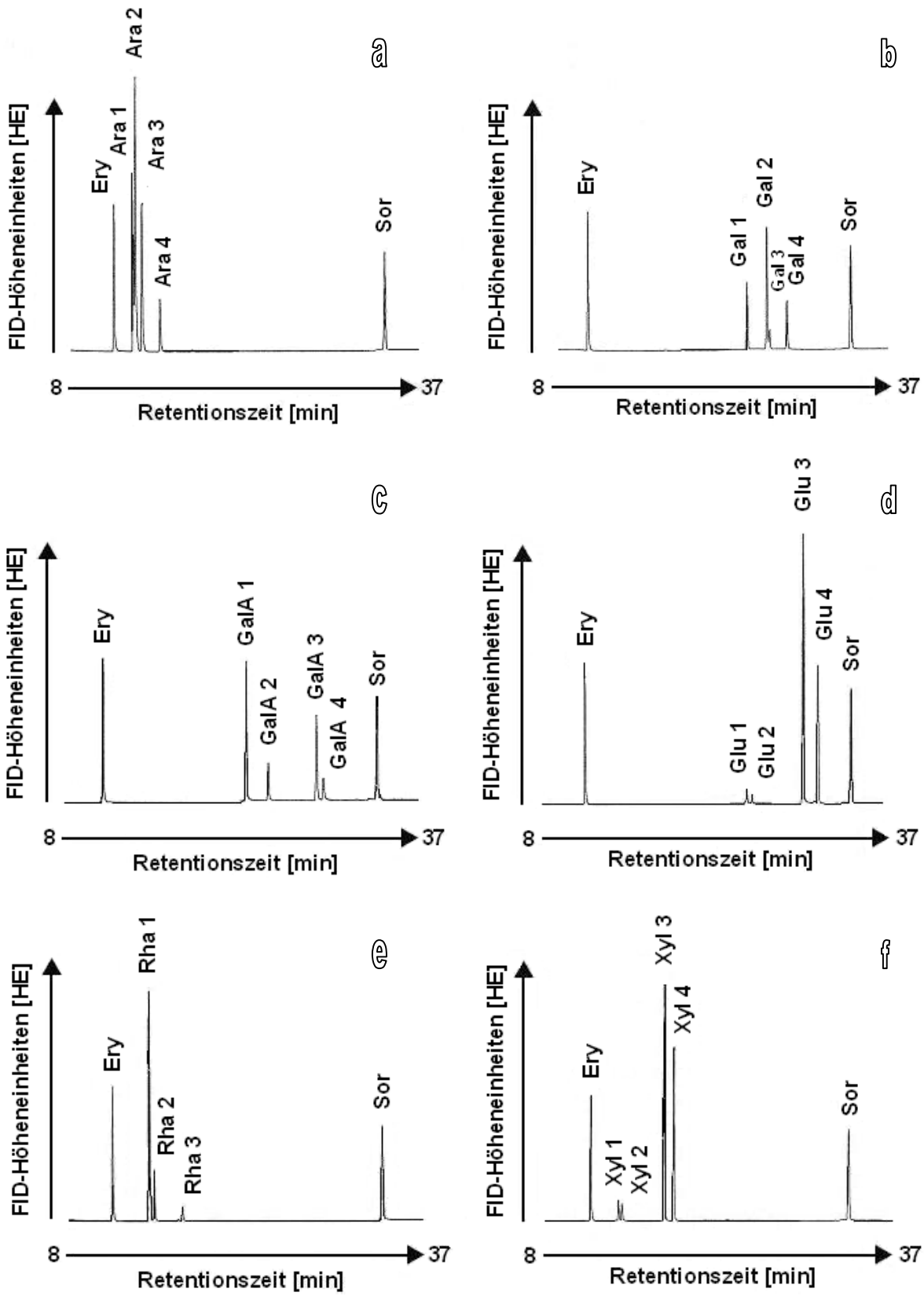


Abbildung 26: Gaschromatogramme der Referenzsaccharide. a) Arabinose, b) Galactose, c) Galacturonsäuremethylester, d) Glucose, e) Rhamnose und f) Xylose als Trimethylsilylether; interne Standards: 3,3 ng Erythrit-TMS (Ery) und 5 ng Sorbit-TMS (Sor). Die Saccharidpeaks sind mit den Anfangsbuchstaben der jeweiligen Zucker und einer Ziffer bezeichnet; GalA: Galacturonsäuremethylester

Die Peaks der Referenzsaccharide Arabinose, Rhamnose, Xylose, Galactose und Glucose sowie Galacturonsäuremethylester liegen mit ihren Retentionszeiten zwischen den Peaks von Erythrit und Sorbit. Die Retentionszeiten der einzelnen Peaks der Referenzsaccharide und ihre relativen Retentionszeiten (RRZ) zu Erythrit und Sorbit sind in der Tabelle 18 aufgelistet. Die RRZ zu Sorbit von Ara 1 (0,418) und Ara 2 (0,423) unterscheiden sich nur knapp um 0,005. Ebenso dicht liegen die RRZ zu Erythrit von Gal 1 und Glu 1 (2,013 und 2,014) bzw. zu Sorbit 0,754 bzw. 0,755.

Die quantitative Auswertung erfolgt a) über die Summe der Peakhöhen der Einzelpeaks eines Monosaccharids, b) über die Höhen der Einzelpeaks ins Verhältnis gesetzt zur Höhe des internen Standardsubstanzpeaks Erythrit und c) über die Höhen der Einzelpeaks ins Verhältnis gesetzt zur Höhe des internen Standardsubstanzpeaks Sorbit. Die Daten sind in der Tabelle 19 aufgelistet. Arabinose findet sich in den Chromatogrammen als Peak Ara 1, Ara 2, Ara 3 und Ara 4 wieder mit den hier in Abbildung 26a) gezeigten Anteilen von 17, 48, 26 und 9 %. Glucose bildet 2 Hauptpeaks Glu 3 und Glu 4 mit relativen Anteilen von 68 und 29 % an der Gesamtpeakhöhe. Die Restanteile (3 %) gehören zu Glu 1 und Glu 2 und werden bei den folgenden Berechnungen vernachlässigt. Bei Rhamnose geben der 1. und 2. Peak 88 % und 9 % der gesamten Peakhöhe wieder und der Rest von 3 % fällt auf den Peak Rha 3. Xyl 1 und Xyl 2 ergeben mit 4 % bzw. 3 % einen kleinen Anteil am Xylosepeak. Der Hauptanteil gehört zu Xyl 3 und Xyl 4 (60 % bzw. 33 %).

Tabelle 18: Retentionszeiten der einzelnen Peaks der Referenzsaccharide und ihre relativen Retentionszeiten bezogen auf Erythrit und Sorbit

Saccharide und interne Standardsubstanzen	RZ [min]	RRZ zu	
		Erythrit	Sorbit
Erythrit	*13,284*		
Sorbit	*35,491*		
Ara 1	14,840	1,117	0,418
Ara 2	15,004	1,129	0,423
Ara 3	15,520	1,168	0,437
Ara 4	16,932	1,275	0,477
Erythrit	*13,301*		
Sorbit	*35,509*		
Gal 1	26,770	2,013	0,754
Gal 2	28,443	2,138	0,801
Gal 3	28,658	2,155	0,807
Gal 4	30,145	2,266	0,849
Erythrit	*13,277*		
Sorbit	*35,470*		
GalA 1	24,838	1,871	0,700
GalA 2	26,260	1,978	0,740
GalA 3	30,528	2,299	0,861
GalA 4	31,098	2,342	0,877
Erythrit	*13,330*		
Sorbit	*35,531*		
Glu 1	26,840	2,014	0,755
Glu 2	27,263	2,045	0,767
Glu 3	31,561	2,368	0,888
Glu 4	32,779	2,459	0,923
Erythrit	*13,279*		
Sorbit	*35,485*		
Rha 1	16,307	1,228	0,460
Rha 2	16,720	1,259	0,471
Rha 3	19,052	1,435	0,537
Erythrit	*13,280*		
Sorbit	*35,489*		
Xyl 1	15,683	1,181	0,442
Xyl 2	15,975	1,203	0,450
Xyl 3	19,574	1,474	0,552
Xyl 4	20,400	1,536	0,575

Tabelle 19: GC-Peakhöhen der Referenzsaccharide sowie die Verhältnisse der Peakhöhen der Einzelpeaks zu den Höhen der internen Standardsubstanzen Erythrit und Sorbit und zur Höhensumme des jeweiligen Monosaccharids

Peak-Art	Peakhöhe [HE]	Peakhöhe/ Erythrithöhe	Peakhöhe/ Sorbithöhe	Peakhöhe/ Σ Einzelpeakhöhen
Erythrit	*4145*			
Sorbit	*2779*			
Ara 1	1421	0,343	0,511	0,173
Ara 2	3951	0,953	1,422	0,481
Ara 3	2092	0,505	0,753	0,255
Ara 4	754	0,182	0,271	0,092
Σ Ara	**8218**	**1,983**	**2,957**	**1,000**
Erythrit	*4259*			
Sorbit	*3145*			
Gal 1	2050	0,481	0,652	0,259
Gal 2	3781	0,888	1,202	0,477
Gal 3	606	0,142	0,193	0,076
Gal 4	1490	0,350	0,474	0,188
Σ Gal	**7927**	**1,861**	**2,521**	**1,000**
Erythrit	*4341*			
Sorbit	*2827*			
GalA 1	4202	0,968	1,486	0,489
GalA 2	1147	0,264	0,406	0,134
GalA 3	2560	0,590	0,906	0,298
GalA 4	680	0,157	0,241	0,079
Σ GalA	**8589**	**1,979**	**3,038**	**1,000**
Erythrit	*3715*			
Sorbit	*3302*			
Glu 1	140	0,038	0,042	0,020
Glu 2	73	0,020	0,022	0,011
Glu 3	4724	1,272	1,431	0,682
Glu 4	1992	0,536	0,603	0,287
Σ Glu	**6929**	**1,865**	**2,098**	**1,000**
Erythrit	*4521*			
Sorbit	*3163*			
Rha 1	8233	1,821	2,603	0,881
Rha 2	863	0,191	0,273	0,092
Rha 3	251	0,056	0,079	0,027
Σ Rha	**9347**	**2,067**	**2,955**	**1,000**

Forstsetzung Tabelle 19

Peak-Art	Peakhöhe [HE]	Peakhöhe/ Erythrithöhe	Peakhöhe/ Sorbithöhe	Peakhöhe/ Σ Einzelpeakhöhen
Erythrit	*4138*			
Sorbit	*2985*			
Xyl 1	339	0,082	0,114	0,039
Xyl 2	283	0,068	0,095	0,032
Xyl 3	5280	1,276	1,769	0,603
Xyl 4	2861	0,691	0,958	0,326
Σ Xyl	**8763**	**2,118**	**2,936**	**1,000**

Weiterhin wurden Calibrierreihen mit den Referenzsacchariden im Konzentrationsbereich von 10 – 50 ng Monosacchrid/µl erstellt und wie oben beschrieben ausgewertet (Tabelle 20).

Tabelle 20: Calibrierreihen der Referenzsaccharide mit Angabe der Summe der GC-Peakhöhen der Referenzsaccharide sowie der Verhältnisse der Peakhöhen der Einzelpeaks zu den Höhen der internen Standardsubstanzen Erythrit und Sorbit

Saccharide	Konz. [ng/µl]	Σ Einzelpeak-Höhe [HE]	Σ Einzelpeak-Höhen/ Erythrithöhe	Σ Einzelpeak-Höhen/ Sorbithöhe
Ara	10	5136	1,2	1,8
	20	9217	2,2	3,3
	30	12124	3,3	5,3
	40	19194	4,2	6,3
	50	22679	5,3	8,0
Gal	10	4375	1,0	1,4
	20	7927	1,9	2,5
	30	11534	2,8	3,8
	40	15413	3,7	4,9
	50	19438	4,6	6,1
GalA	10	4006	1,0	1,7
	20	8589	2,0	3,0
	30	12548	3,1	4,7
	40	17280	4,2	6,6
	50	21326	5,1	8,3
Glu	10	6694	2,0	2,3
	20	13432	3,6	4,1
	30	17434	4,7	6,0
	40	25450	6,8	7,9
	50	30135	7,6	9,9
Rha	10	4551	1,1	1,6
	20	9348	2,1	3,0
	30	13068	2,9	4,4
	40	17425	3,9	5,8
	50	21140	4,9	7,0
Xyl	10	5193	1,1	1,5
	20	8763	2,1	2,9
	30	12794	3,0	4,4
	40	16403	3,8	5,3
	50	20344	4,7	6,6

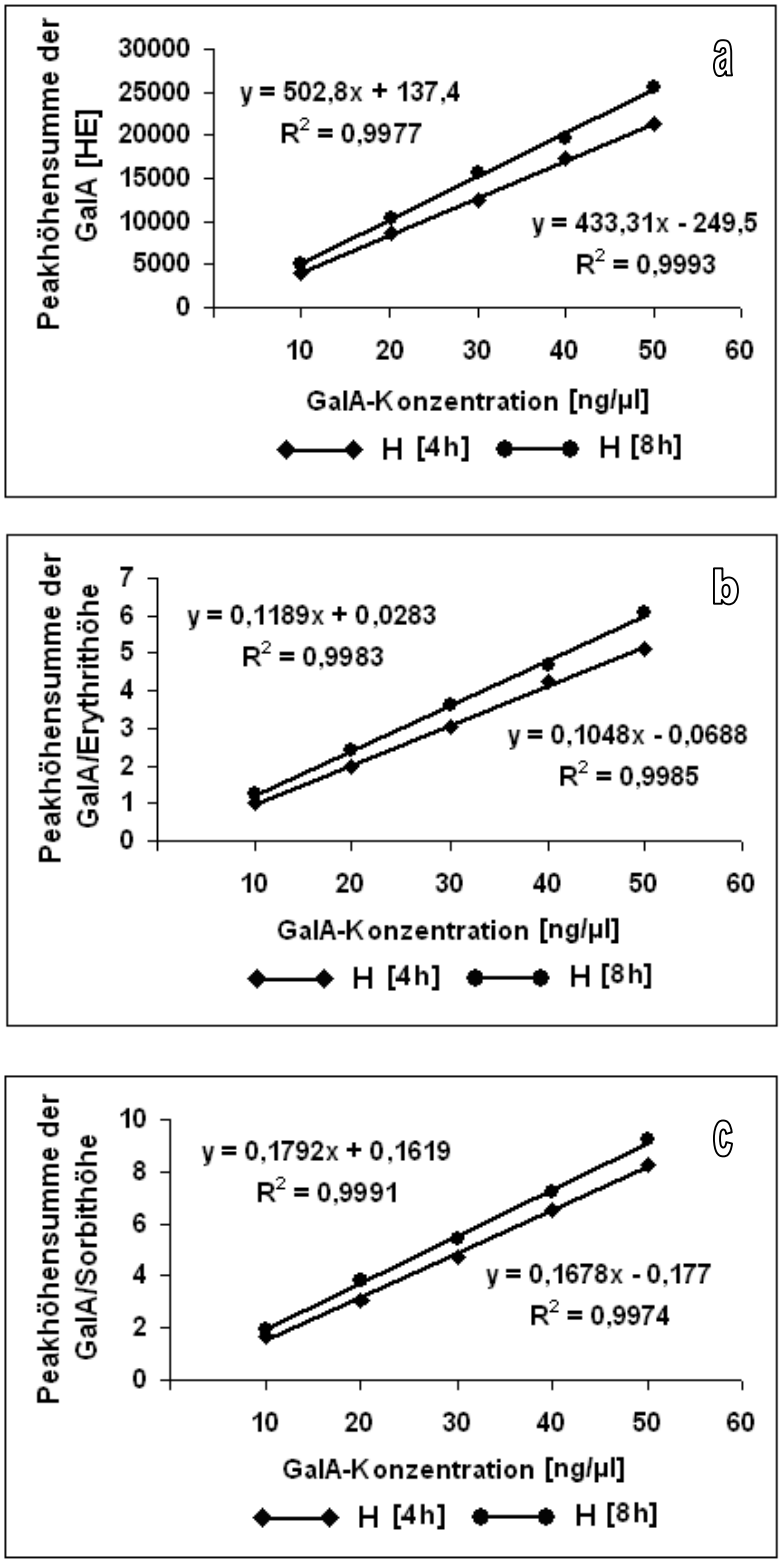


Abbildung 27: Calibriergeraden des Referenzsaccharids Galacturonsäuremethylester als TMS (GalA) mit vorgeschalteter Hydrolysezeit von H [4h] und H [8h]; die Konzentration ist aufgetragen gegen a) die Summe der GC-Einzelpeakhöhen von GalA, b) das Verhältnis der Summe der GC-Einzelpeakhöhen von GalA zu der Peakhöhe der internen Standardsubstanz Erythrit und c) das Verhältnis der Summe der GC-Einzelpeakhöhen von GalA zu der Peakhöhe der internen Standardsubstanz Sorbit.

Da die Hydrokolloide aus *Premna oblongata* vor der Silylierung und der gaschromatografischen Analyse hydrolysiert werden mussten, wurden auch die Referenzsubstanzen während der Optimierungsphase 4 und 8 Stunden diesen Bedingungen unterzogen (siehe Kapitel 2.10.). Für Galacturonsäure sind die Ergebnisse in der Abbildung 27 zusammengefasst. Die Grafiken der anderen Referenzsaccharide sind im Anhang 1 zu finden. Die Daten dienen als Basis für die Ermittlung der quantitativen Zusammensetzung der Hydrokolloide.

3.11.2. Qualitative Zusammensetzung der Hydrokolloide

Ein typisches Gaschromatogramm von aufgearbeiteten Hydrokolloiden aus ausgewachsenen Blätter von *Premna oblongata* mit 4 stündiger Hydrolysezeit wird in der Abbildung 28 gezeigt. Es sind folgende Peaks identifizierbar: Rha 1, Xyl 3, GalA 1, GalA 2, Glu 2, Gal 2, Gal 3, GalA 3, GalA 4, Glu 3 und Glu 4. Ihre RZ, RRZ zu Erythrit und Sorbit sowie ihre Peakhöhen bzw. deren Anteile an der Gesamtpeakhöhe sind in der Tabelle 21 aufgelistet. Rhamnose, Xylose, Galactose und Glucose ergeben 2,7 %, 0,5 %, 4,9 % bzw. 8,1 % der Gesamtpeakhöhe aller Monosaccharidpeaks. Galacturonsäure dominiert mit 83,8 %.

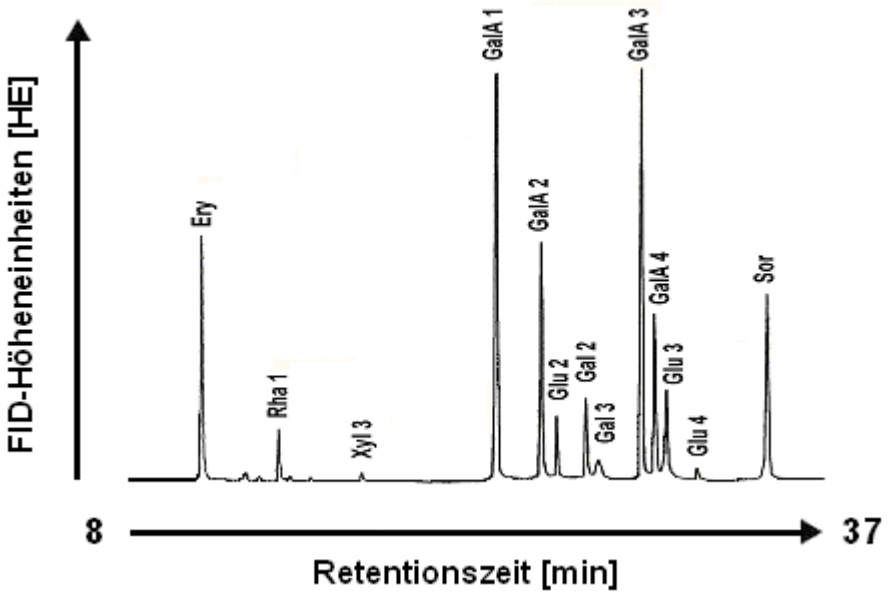


Abbildung 28: Typisches Gaschromatogramm einer Hydrokolloidaufarbeitung von ausgewachsenen Blättern von *Premna oblongata*

Tabelle 21: GC-Peakhöhen der Monosaccharide, RZ, RRZ zu Erythrit und Sorbit und die Höhenanteile der Einzelpeaks an der Summe aller Monosaccharidpeaks

Peak	RZ	RRZ zu Erythrit	RRZ zu Sorbit	[HE]	Anteil [%]
Erythrit	*13,347*				
Rha 1	16,353	1,23	0,46	915	2,68
Xyl 3	19,626	1,47	0,55	156	0,46
GalA 1	24,915	1,87	0,70	13706	40,13
GalA 2	26,670	2,00	0,75	4107	12,03
Glu 2	27,271	2,04	0,77	1061	3,11
Gal 2	28,429	2,13	0,80	1422	4,16
Gal 3	28,824	2,16	0,81	259	0,76
GalA 3	30,611	2,29	0,86	8025	23,50
GalA 4	31,112	2,33	0,87	2789	8,17
Glu 3	31,585	2,37	0,89	1490	4,36
Glu 4	32,806	2,46	0,92	220	0,64
Sorbit	*35,568*				

3.11.3. Quantitative Zusammensetzung der Hydrokolloide

Die quantitative Zusammensetzung der Trockenhydrokolloide erfolgte mit Hilfe von Calibrierreihen der in Kapitel 3.11.1 beschriebenen Monosaccharide. Die Peakhöhensummen der GalA-TMS der Hydrokolloide wurden in Abbildung 27a) grafisch dargestellt (Berechnungsverfahren a). Nach dem Berechnungsverfahren b wurde das Verhältnis der Peakhöhensumme der GalA-TMS zur Erythritpeakhöhe in der Abbildung 27b) aufgetragen. Analog wurde das Verhältnis der Peakhöhensummen der GalA-TMS zur Sorbitpeakhöhe in der Abbildung 27c) aufgetragen (Berechnungsverfahren c). Für die Auswertung weiterer Monosaccharide der Hydrokolloide wurde nach dem gleichen Verfahren vorgegangen. Als Berechnungsbasis dienten die jeweiligen Monosaccharid-Regressionsgeraden, die in Anhang 1 beschrieben wurden. Danach wurden die Anteile der jeweiligen Monosaccharide Galactose, Galacturonsäure, Glucose und Rhamnose im Hydrolysat nach diesen 3 beschriebenen Verfahren berechnet. Da Xylose nur in Spuren im Hydrokolloid enthalten war, wurde es bei der quantitativen Bestimmung nicht erfasst. Die grafischen Darstellungen der Hydrokolloid-zusammensetzung, die nach 4 stündiger Hydrolyse erhalten wurde, sind in Abbildung 29 aufgeführt. Nach dem Berechnungsverfahren a ergibt sich als mittlere

Zusammensetzung für das Hydrokolloid: 4 % Galactose (n = 4; Std. = +/- 0,3 %), 91 % Galacturonsäure (n = 4; Std. = 4,1 %), 4 % Glucose (n = 4; Std. = 0,3 %) und 1 % Rhamnose (n = 4; Std. = 0,3 %). Nach dem Berechnungsverfahren b erhält man 4 % Galactose (n = 4; Std. = 0,3 %), 91 % Galacturonsäure (n = 4; Std. = 4,0 %), 4 % Glucose (n = 4; Std. = 0,3 %) und 1 % Rhamnose (n = 4; Std. = 0,1 %). Berechnungsverfahren c ergibt 4 % Galactose (n = 4; Std. = 0,3 %), 90 % Galacturonsäure (n = 4; Std. = 3,5 %), 5 % Glucose (n = 4; Std. = 0,3 %) und 1 % Rhamnose (n = 4; Std. = 0,1 %). Des Weiteren wurde die Zusammensetzung der Hydrokolloide nach 8 stündiger Hydrolyse nach dem Berechnungsverfahren a ermittelt: 4 % Galactose (n = 4; Std. = 0,9 %) , 94 % Galacturonsäure (n = 4; Std. = 9,9 %) und 2 % Glucose (n = 4; Std. = 0,8 %). Rhamnose ist nur in Spuren nachweisbar. Das Berechnungsverfahren b ergab, dass 5 % Galactose (n = 4; Std. = 1,1 %), 92 % Galacturonsäure (n = 4; Std. = 9,9 %), 2 % Glucose (n = 4; Std. = 0,7 %) und 2 % Rhamnose (n = 4; Std. = 0,2 %). Schließlich erhält man nach dem Berechnungsverfahren c 4 % Galactose (n = 4; Std. = 0,5 %), 93 % Galacturonsäure (n = 4; Std. = 6,1 %), 1 % Glucose (n = 4; Std. = 0,4 %) und 3 % Rhamnose (n = 4; Std. = 0,3 %).

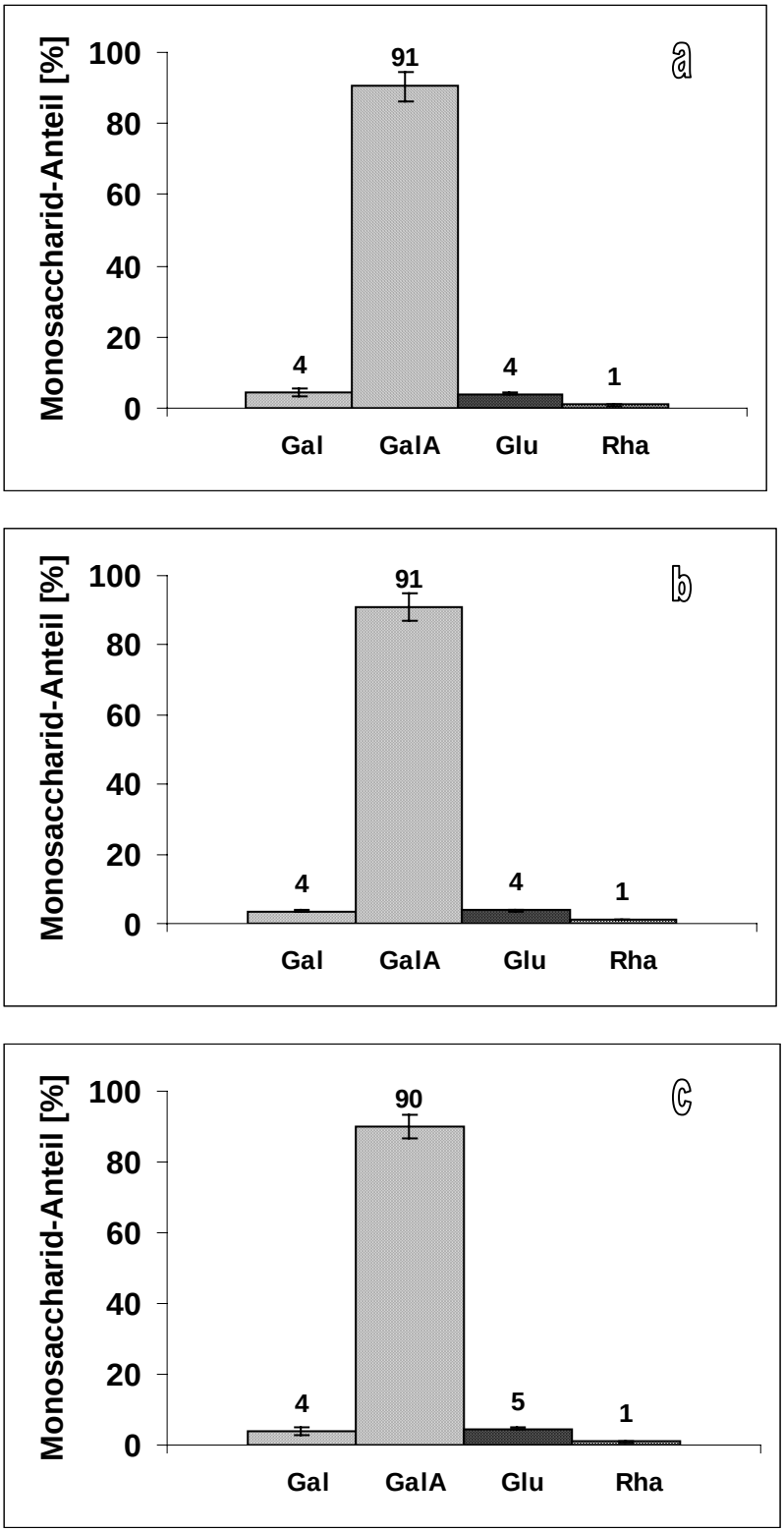


Abbildung 29: Anteile der einzelnen Monosaccharide in den Hydrokolloiden der ausgewachsenen Blätter mit Angabe der Standardabweichung, bestimmt nach a) der Peakhöhensumme des jeweiligen Saccharids, b) dem Verhältnis der Peakhöhensumme des jeweiligen Saccharids zur Erythritpeakhöhe, c) dem Verhältnis der Peakhöhensumme des jeweiligen Saccharids zur Sorbitpeakhöhe.

3.11.4. Gehalt an Hydrokolloiden junger Blätter

Qualitative Zusammensetzung der Hydrokolloide

Abbildung 30 zeigt ein typisches Gaschromatogramm von hydrolysierten und derivatisierten Hydrokolloiden junger Blätter aus *Premna oblongata*. Galacturonsäure besitzt den weitaus größten Anteil an der Summe aller Monosaccharidpeakhöhen des Chromatogramms. Neben der Galacturonsäure zeigt auch die Arabinose die erwarteten 4 Peaks. Von der Galactose finden sich die Peaks Gal 2 und Gal 4 im Chromatogramm wieder, wobei nicht auszuschließen ist, dass der Peak Gal 3 unaufgelöst mit dem Peak Gal 2 vorliegt. Bei der Glucose fehlt der Nebenpeak Glu 1. Rhamnose erscheint mit den beiden Hauptpeaks Rha 1 und Rha 2 im Chromatogramm. Das einzige Monosaccharid, das nur mit dem intensivsten Peak Xyl 3 in der Abbildung 30 vertreten ist, ist Xylose als Spurenkomponente.

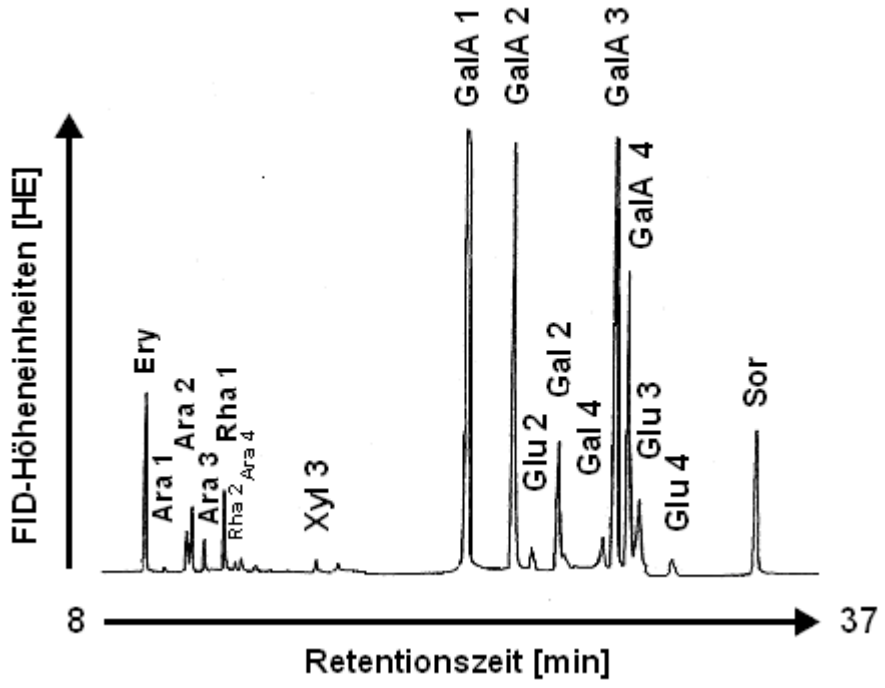


Abbildung 30: Typisches Gaschromatogramm von Hydrokolloiden aus einem jungen Blatt von *Premna oblongata*

Quantitative Zusammensetzung der Hydrokolloide

Des Weiteren wurden von 4 jungen Blättern mit Frischmassen zwischen 198,6 mg und 397,7 mg die Anteile der Saccharid-Peakhöhen in den Chromatogrammen ermittelt. Die Anteile der Peakhöhensummen der jeweiligen Monosaccharide nach

der Hydrolyse der Hydrokolloide sind in der Abbildung 31 mit den zugehörigen Standardabweichungen grafisch dargestellt. Arabinose, Galactose, Glucose, Rhamnose und Xylose weisen nur kleine Anteile (bis 5,9 %) an der Gesamtpeakhöhe auf: Arabinose 4,8 % (n = 4; Std. = 1,1 %), Galactose 5,9 % (n = 4; Std. = 1,0 %), Glucose 3,2 % (n = 4; Std. = 0,7 %), Rhamnose 2,2 % (n = 4; Std. = 0,4 %) und Xylose 0,6 % (n = 4; Std. = 0,2 %). Galacturonsäure dominiert mit 83,3 % (n = 4; Std. = 1,2 %).

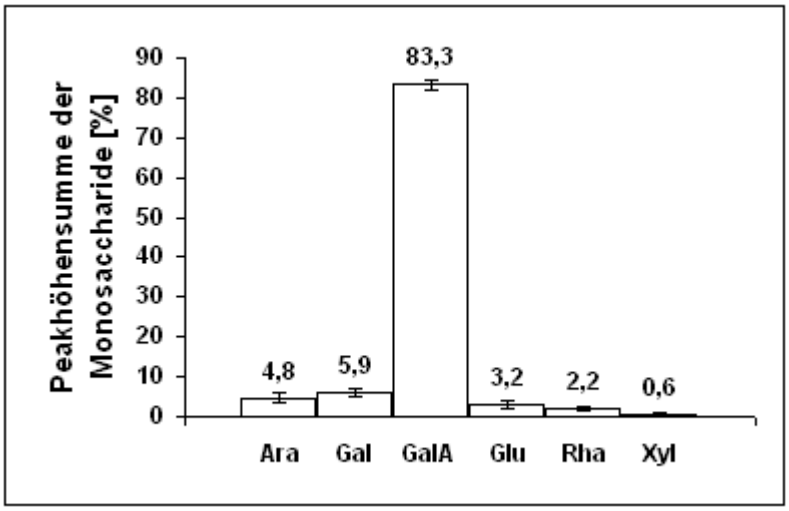


Abbildung 31: Anteil der Peakhöhensumme der Monosaccharide nach Hydrolyse der Hydrokolloide von jungen Blättern von *Premna oblongata*, n = 4

Weiterhin wurden die relativen Anteile der Monosaccharide in den Hydrokolloidhydrolisaten von jungen Blättern nach den Berechnungsverfahren a - c bestimmt und ihre Ergebnisse in der Abbildung 32 gezeigt. Da der Xyloseanteil nur im Spurenbereich liegt, wird er für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt. Abbildung 32a) zeigt die Ergebnisse nach dem Berechnungsverfahren a. Arabinose, Galactose, Glucose und Rhamnose weisen nur Anteile bis 6 % auf. Die Mittelwerte liegen bei 4,5 % (n = 4; Std. = 1,1 %) für Arabinose, 6,0 % (n = 4; Std. = 1,5 %) für Galactose, 2,1 % (n = 4; Std. = 0,5 %), für Glucose und 1,5 % (n = 4; Std. = 0,4 %) für Rhamnose. Den Hauptanteil bildet Galacturonsäure mit 87,0 % (n = 4; Std. = 1,0 %). Nach dem Berechnungsverfahren b (Abbildung 32b)) ergeben sich folgende Mittelwerte: 4,0 % (n = 4; Std. = 1,4 %) Arabinose, 6,3 % (n = 4; Std. = 1,5 %) Galactose, 87,5 % (n = 4; Std. = 2,8 %) Galacturonsäure, 1,0 % (n = 0,1 %) Glucose und 1,7 % (n = 4; Std. = 0,3 %) Rhamnose. Nach dem Berechnungsverfahren c (Abbildung 32c)) liegen Arabinose, Galactose, Galacturonsäure, Glucose und

Rhamnose bei 3,7 % (n = 4; Std. = 1,5 %), 7,3 % (n = 4; Std. = 1,7 %), 85,9 % (n = 4; Std. = 3,6 %), 2,4 % (n = 4; Std. = 0,6) und 1,5 % (n = 4; Std. = 0,4 %).

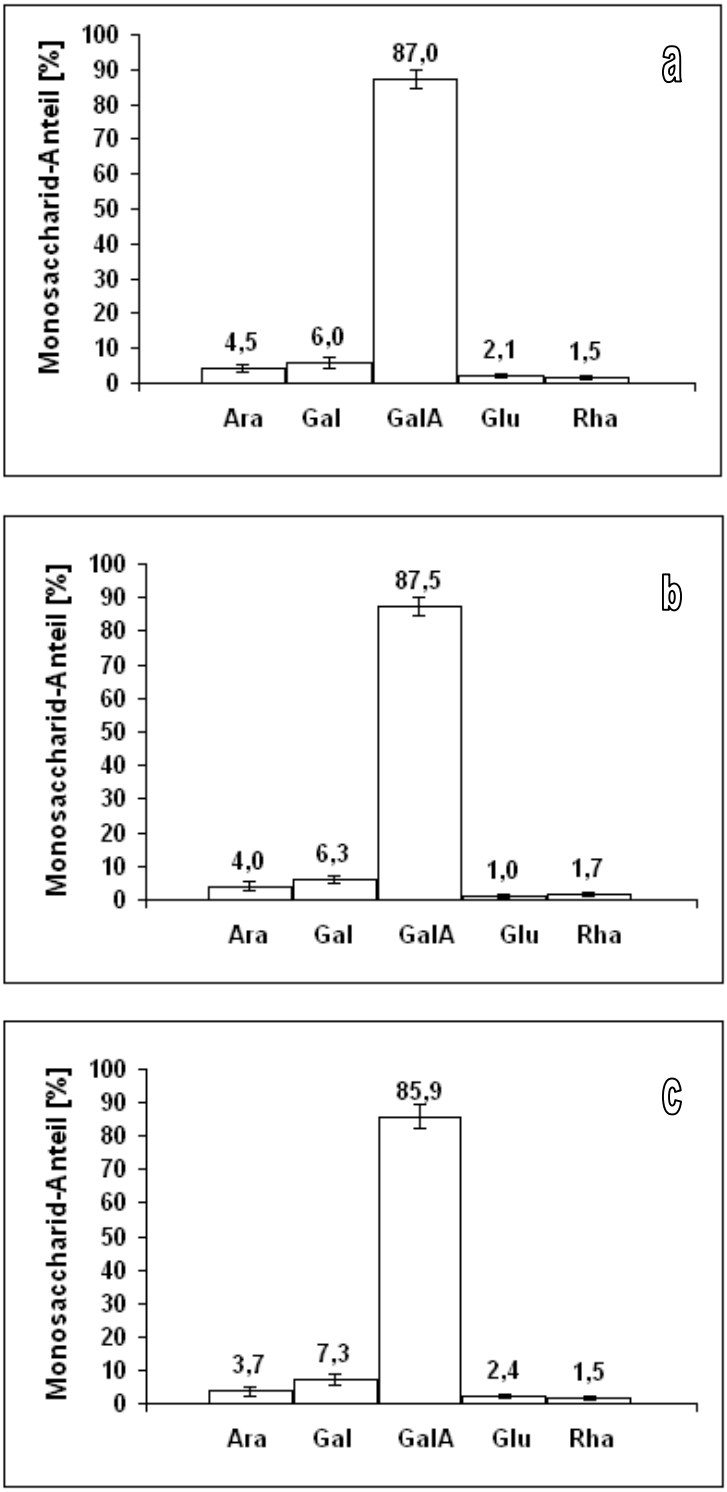


Abbildung 32: Anteile der einzelnen Monosaccharide in den Hydrokolloiden der jungen Blätter mit Angabe der Standardabweichung, bestimmt nach a) der Peakhöhensumme des jeweiligen Saccharids, b) dem Verhältnis der Peakhöhensumme des jeweiligen Saccharids zur Erythritpeakhöhe, c) dem Verhältnis der Peakhöhensumme des jeweiligen Saccharids zur Sorbitpeakhöhe.

4. Diskussion

4.1. Blattanatomie und ihre Hydrokolloide

Pflanzliche Epidermen wurden von KAUSSMANN (1963) in vier cytologisch verschiedene Epidermisformen aus der Flächenansicht der Zelltypen eingeteilt. Die erste Form der Epidermis ist charakterisiert durch isodiametrische Epidermiszellen wie z.B. bei saftigen Früchten und Speicherorganen. Die zweite Form ist die Epidermis mit tafelförmigen gestreckten Zellen wie bei Sprossachsen, Blattstielen und –nerven. Die dritte Zellgrundform ist die verbreiterte, quer zur Längsachse gestreckte Zelle wie bei manchen Cycadeen und Commelinaceen. Die vierte Form der Epidermis ist gekennzeichnet durch Zellen mit gewellten, antiklinalen Wänden, wodurch Festigkeit und Zusammenhalt des Abschlussgewebes erhöht werden. Epidermiszellen der Blätter von *Premna oblongata* gehören zur häufig vertretenen vierten Form. Währen die Epidermis der Blattoberseite leicht gewellte, antiklinale Wände aufzeigt, sind die Zellen der Blattunterseiten mit einer starken Wellung versehen. Im Blattquerschnitt von *P. oblongata* dominieren tangential lang gestreckte Epidermiszellen.

Trichome oder Haare sind epidermale Strukturen. Sie sind als Ausstülpungen der Epidermis zu verstehen. Man findet sie in großer Formenvielfalt, wie z.B. die gestielten Blasenhaare bei Chenopodiaceen, Eckzahnhaare bei der Gattung *Thymus* und Sternhaare der Malvaceen. Laut ESCHRICH (1995) sind die jungen Blätter an Sprossspitzen fast immer behaart. Mit zunehmendem Wachstum der Blattspreite weichen die Haare auseinander; oft sterben sie rasch ab, da ihre Aufgabe zur Verminderung der Wasserabgabe durch Transpiration abgeschlossen ist. Die jungen Zweige und Stängel von *Premna oblongata* sind mit kurzen, dünnen braunen Haaren bedeckt, die im Laufe der Zeit durch mechanischen Abrieb rasch verloren gehen (BACKER und VAN DEN BRINK, 1968). Wie in den Abbildungen 3a) und b) gezeigt wird, verändert sich die Farbe der Haare von rot nach braun. Möglicherweise beeinflussen die Licht- und Temperaturverhältnisse diese Veränderungen. Bei den Untersuchungen der Rosella (*Hibiscus sabdariffa*, L. var. *sabdariffa*) aus Thailand, Indien, Ägypten, Senegal und Mittelamerika zeigte El AFRY (1978), dass die

Pflanzen biphotoperiodisch sind, d.h. Kurztage und Dauerlicht beeinflussen Physiologie und Morphologie der Pflanzen in unterschiedlicher Weise.

Bei *P. oblongata* ist Kollenchymgewebe – wie bei vielen anderen Blättern auch, überwiegend in der Peripherie des Stiels ausgebildet (ESAU, 1965). Kollenchymgewebe ist mit seiner stark ausgeprägten Pektinschicht der wesentliche Grund für die mechanische, flexible Eigenschaft des Stiels. Bei *P. oblongata* wirken die verzahnten Verbindungen zwischen tangentialen bzw. radialen Zellwänden vermutlich als Stabilitätsfaktor gegen mechanische Belastungen. Die Kombination beider Phänomene wird als Kompromisslösung zwischen den Anforderungen zur Flexibilität einerseits und zur Versteifung andererseits angenommen. Somit ist die Rolle als Festigungsgewebe garantiert.

Die mit Hydrokolloid (Pektin) gefüllten Ausstülpungen, wie in den Abbildungen 5a) und 9a) bis 9d) gezeigt, kommen nicht nur im Rindenparenchym des Stiels sondern auch in der Epidermis des Stiels und der Blattspreite, im Kollenchym und Zentralparenchym sowie im Mesophyllgewebe vor. In dem Mesophyllgewebe war das gelöste Hydrokolloid in Richtung der Interzellularen konzentriert und wurde durch die Entwässerungslösung bei der Blattfixierung für mikroskopische Analysen in einer unregelmäßigen Gestalt oder in kugelähnlichen Ausstülpungen geliert. Im Gegensatz dazu nahm das Hydrokolloid in der Epidermis des Stiels sowie im Kollenchym, Rindenparenchym und Zentralparenchym in Richtung Cytoplasma ab. Während der Untersuchungen wurde insbesondere nach den möglichen Bildungs- und Speicherorten der Hydrokolloide im Gewebe wie zum Beispiel Schleimepidermen, Schleimzellen und -gängen gesucht, jedoch nicht gefunden.

Die Sklerenchymzellen des Stiels von *P. oblongata* waren ursprünglich Parenchymzellen und wurden durch Einlagerungen von Polysacchariden in die Zellwand in Zellen mit veränderter, verstärkter Zellwand umgewandelt. ESAU (1965) teilte Sklerenchymzellen in Sklereiden und Sklerenchymfasern ein. Sklerenchymfasern werden in xyläre Fasern und extraxyläre Fasern eingeteilt. Zu den xylären Fasern gehören Holz- und Xylemfasern. Bastfasern gehören zu den extraxylären Fasern. Bei *P. oblongata* findet die teilweise Umwandlung des Rindenparenchyms zu Sklerenchymzellen nicht in der Nähe des Phloems, sondern in weiter entfernt liegenden Bereichen statt, d.h. in der Anfangsphase ist das Sklerenchym mehr extraxylär und nach Übergang in die Bündelscheidenstruktur verstärkt xylär.

FAHN (1979) teilte schleimhaltiges Gewebe in Schleimidioblasten, Schleimkanäle, Schleimepidermen und schleimsezernierende Drüsenhaare ein. Als Idioblast wird eine Zelle bezeichnet, die sich aus einem Verband gleichartiger Zellen durch besondere Form oder Inhaltstoffe heraushebt (FROHNE, 1985). Schleimidioblasten entstehen entweder durch lysigene oder rhexigene Prozesse. Bei lysigenen Schleimidioblasten handelt es sich um die Auflösung innen liegender Zellwände. Rhexigene Schleimidioblasten werden durch Zerreissen von Zellwänden gebildet.

Über die Entstehung von Schleimzellen und –gängen gibt die Arbeit von CLASSEN et al. (1994) Auskunft. Während Schleimzellen und –gänge in den Blattstielen, Blattspreiten, Kelchblättern und Blüten von *Malva sylvestris* gebildet werden, sind Schleimepidermen nur auf Blättern zu finden. Als erstes Anzeichen der Differenzierung einer Zelle zur Schleimzelle ist die Bildung des so genannten Schleimsaums anzusehen, der in der Peripherie der Zellen angelegt wird. Danach werden die Zellwände dünner, bis sie sich schließlich auflösen. Zum Schluss wird das gesamte Cytoplasma mit Schleim aufgefüllt. Durch Auflösung der Zellwände weiterer Zellen entsteht der Schleimgang.

Die histologischen Untersuchungen bei dieser Arbeit wiesen darauf hin, dass bei *P. oblongata* keine Ablösung oder Zerreisen der Zellwand auftritt, sondern dass die Zellwände in einem lytischen Vorgang aufgelöst werden. Die Fixierung zur Erstellung mikroskopischer Präparate mit PEM-Puffer reicht nicht aus, um den natürlichen Zustand des Protopektins in der Zellwand aufrecht zu erhalten, sondern sie verlangsamt lediglich ihre Auflösung. PEM-Puffer enthält EGTA und NaOH, die bekannt dafür sind, das erforderliche Calcium für die Stabilisierung des Pektins aus dem Hydrokolloid zu entfernen (JARVIS, 1982; DONGOWSKI, 1985; BLASCHEK, 1991). Durch Fixierung in dem entsprechenden Puffer sind die Pektine langsam löslich geworden und nach der Entwässerungsreihe mit Ethanol sind die verbliebenen, teilweise gelösten Pektine geliert und im Gegensatz zur Verteilung im unbehandelten Gewebe in Interzellularen oder Cytoplasma verteilt worden. Durch Einbettung in LR-White ist ihr Vorhandensein in den Interzellularen oder dem Cytoplasma konserviert worden, so dass sie nach dem Schneiden und nach Färbung als unregelmäßige oder eingestülpte Oberfläche als Artefakt vorliegen. Durch Färbung mit Rutheniumrot und Hydroxylamin-$FeCl_3$ sind diese Hydrokolloide als

wasserlösliches Pektin und damit als normaler Bestandteil der Zellwand belegt worden.

Traditionell werden zur Gewinnung der Hydrokolloide durch Kneten der Blätter die Zellwände zerstört und die Pektine in Wasser gelöst und geliert. Nach Angaben von KOOIMAN (1969) werden durch Mörsern der frischen Blätter Pektin und Pektinesterase gelöst. Pektinesterase verseift die gelösten Pektine und gelöste Ca^{++}-Ionen vernetzen die vorhandenen Pektinsäuren zum Gel. Gel bildende Hydrokolloide lassen sich auch aus den Blättern der *P. oblongifolia* gewinnen (RUSTANTI, 2000; WYATNO, 2000; SETYANINGTYAS, 2000). *Cyclea barbata* dient als Alternative zur Gewinnung von Gel bildenden Hydrokolloiden in Indonesien (KURNIATI, 1999; RAHAYU, 2000).

Pektine wurden auch in den Wänden der Basis-, Hals- und Kopfzellen von Drüsenhaaren nachgewiesen; sie reagieren rosarot bis hellbraun mit Rutheniumrot. Bei einer Untersuchung von *Nymphoides peltata*-Blättern fand MEYBERG (1986) Hydrokolloide auf der Haaroberfläche. Dieses Phänomen wird als Protrubation bezeichnet und ist im Grunde eine Ausstülpung von gelöstem Material aus der Zellwand.

Pektin ist in der Lage, Wasser zu binden, so dass es der Pflanze zur Wasserspeicherung dient. Die dicken tangentialen Außenwände der Epidermis mit ihrer Cuticula sowie die reichlich vorhandenen Pektine in den verschiedenen Geweben sind als Anzeichen für die Anpassungsfähigkeit von *P. oblongata* an Lebensräume mit niedriger Feuchtigkeit anzusehen. Das Wasserbindungsvermögen des Pektins unterstützt den apoplastischen Wassertransport im Blatt.

Die in dieser Arbeit bestimmten Hydrokolloidgehalte von *P. oblongata* Blättern, erreichten - bezogen auf die Frischmasse - mittlere Werte von 3,4, 3,2 und 2,5 % für die Untersuchungsgruppen A, B und C. Bezogen auf die Blatt-Trockenmasse betragen ihre Werte 18,4, 16,4 und 14,2 %. Nach dem Titrationsverfahren ergeben sich für die Pektingehalte Mittelwerte von A) 35 %, B) 32 % und C) 41 %, mit Esterifizierungsgraden von A) 65 %, B) 40 % und C) 36 %. Nach Angaben von MERGENTHALER (1984) beträgt der Pektingehalt in den Schalen von Zitrusfrüchten ca. 30 %, in Apfelschalen 15 %, in den Blütenkörben der Sonnenblume 25 % und in Zuckerrübenpulpe ca. 20 %. Anhand des Anteils der mit Methanol veresterten Carboxylgruppen sind Pektine in hochveresterte (Veresterungsgrad $>$ 50 %) und niederveresterte Pektine (Veresterungsgrad $<$ 50 %) zu unterscheiden. KOOIMAN

(1969) gewann Pektine aus *Cyclea barbata* (7,5 % bezogen auf die Blatt-Frischmasse), *Gardenia jasmoides* (6,3 %), *Premna parasitica* (2,7 %) und *Stephania hernandifolia* (2,2 %) mit den zugehörigen Esterifizierungsgraden von 68, 82, 60 und 40 %. El AFRY (1979) untersuchte den Schleim- und Pektingehalt von *Hibiscus sabdarifa*. Die Blütenkelche ergaben Schleimgehalte zwischen 12 % und 26 %. Die Pektingehalte von trockenen Kelchen lagen zwischen 2 und 5 %. SURADI (1984) untersuchte Pektine aus Schalen von *Citrus maxima, C. aurantium* und *C. nobilis*. Er bekam Pektingehalte bezogen auf die Frischmasse von 3,65 bis 3,67 % für *C. maxima*, 4,27 bis 4,70 % für *C. aurantium* und 3,72 bis 4,04 % für *C. nobilis*. DONGOWSKI (1996) prüfte die Pektinfraktionen der Alkohol unlöslichen Substanzen von Roten Rüben *(Beta vulgaris var. conditiva*). Die Ergebnisse sind in der Tabelle 22 aufgeführt.

Tabelle 22: Galacturonangehalt in 100 g Alkohol unlöslicher Substanzen der Roten Rübe (*Beta vulgaris var. conditiva*) und deren Esterifizierungsgrad (DE)

Lösungsmittel	Galacturonan [g/100g]	DE
Wasser	3,93	51,3
Ammoniumoxalat-Lösung	0,8	33,7
0,05 mol/l HCl	2,96	40,2
0,05 mol/l NaOH	3,8	14,1

4.2. Hydrokolloidzusammensetzung

Die in dieser Arbeit durchgeführten gaschromatografischen Untersuchungen an ausgewachsenen Blättern von *Premna oblongata* zeigten, dass die Hydrokolloide aus ca. 4 % Galactose, 91 % Galacturonsäure, 4 % Glucose und 1 % Rhamnose bestehen (4 h Hydrolysezeit, Berechnungsverfahren a und b, s. Kap. 3.11.3). Xylose war nur in Spuren nachweisbar. Nach dem Berechnungsverfahren c ergaben sich für den Galacturonsäureanteil 91 % und für Glucose 5 %. Die Verlängerung der Hydrolysezeit auf 8 Stunden führte nur zu einer unwesentlichen Veränderung. Bei dem Berechnungsverfahren a wurde die Rhamnose nicht miterfasst. Die relativen Anteile der Monosaccharide lagen bei 4 % Galactose, 94 % Galacturonsäure und 2 % Glucose, beim Berechnungsverfahren b wurden 5 % Galactose, 92 % Galacturonsäure, 2 % Glucose und 2 % Rhamnose ermittelt, beim Verfahren c wurden 4 % Galactose, 93 % Galacturonsäure, 1 % Glucose und 3 % Rhamnose

ermittelt (s. Kap. 3.11.3). Obwohl der Galacturonsäureanteil bei 8 Stunden Hydrolysezeit höher liegt, gibt es grundsätzlich keine Steigerung der Genauigkeit, da die Daten hier mit höherer Standardabweichung gegenüber der Versuchsreihe mit 4 stündiger Hydrolysezeit verbunden sind; die Ergebnisse sind unschärfer. Die Hydrokolloide der jungen Blätter zeigten eine deutlich andere Zusammensetzung. Arabinose war nachweisbar, Xylose jedoch nur in Spuren. Nach dem Berechnungsverfahren a ergaben sich folgende Gehalte an Monosacchariden: 4,0 % Arabinose, 6,0 % Galactose, 87,0 % Galacturonsäure, 2,1 % Glucose und 1,5 % Rhamnose (s. Kap. 3.11.4.). Beim Berechnungsverfahren b wurden 4,0 % Arabinose, 6,3 % Galactose, 87,5 % Galacturonsäure, 1,0 % Glucose und 1,7 % Rhamnose ermittelt, bei c 3,7 % Arabinose, 7,3 % Galactose, 85,9 % Galacturonsäure, 2,4 % Glucose und 1,5 % Rhamnose. Galacturonsäure ist in beiden Gruppen dominant; das Hydrokolloid gehört daher zur Gruppe der Pektine. KIWITT-HASCHEMIE (1994) zeigte bei der Untersuchung an Nichtstärke-Polysacchariden mit der Permethylierungsanalyse bei kommerziellen Pektinen molare Verhältnisse von 0,5 (Arabinose) : 1,9 (Galactose) : 9,5 (Galacturonsäure) : 1,0 (Rhamnose) : 0,5 (Xylose). Während bei dem Hydrokolloid der ausdifferenzierten Blätter Arabinose nur als Spur vorhanden ist, enthalten die jungen Blätter 3,7 bis 4 % dieses Monosaccharids. Die Arabinose des Pektins von jungen Blättern stammt möglicherweise von Arabinogalactanproteinen, die wichtig bei der Blattentwicklung sind und in jungen Geweben vermehrt aufzufinden sind.

NAGLSCHMID (1979) untersuchte den wasserlöslichen Schleim aus den Blättern von *Verbascum densiflorum*. Er enthielt Arabinose, Galactose, Glucose, Ribose, Rhamnose und Xylose; Uronsäuren fehlten. BRÄUTIGAM (1985) wies nach der Aufarbeitung der Schleimpolysacharide aus den Blättern von *Plantago lanceolata* mit Hilfe der Dünnschichtchromatografie die Monosacharide Arabinose, Galactose, Glucose, Galacturonsäure, Glucuronsäure, Mannose, Rhamnose und Xylose nach. Quantitative Prüfungen durch die Anwendung von Hydroxydiphenyl-Reagenz ergaben ein Verhältnis von 6:1 für Galacturonsäure und Glucuronsäure. DISTELBARTH (1982) untersuchte die Schleimpolysaccharide von *Taxus baccata* und *Thuja occidentalis*. Stachyose, Raffinose, Saccharose und Glucose wurden aus der Rinde gewonnen, Raffinose, Saccharose, Glucose und Fructose aus den Nadeln.

4.3. Analyse-Methoden

Histologisch wurden Thionin, Rutheniumrot und Hydroxylamin-$FeCl_3$ zum Färben von Hydrokolloiden angewendet. Thionin und Toluidinblau sind basische und metachromatische Thiazinfarbstoffe, die zur Färbung von Mucopolysaccariden angewendet werden können. Verschiedene Strukturen der Pflanzenzellen reagieren metachromatisch; Zellulose und Schleimstoff färben sich blau bzw. violett (FROHNE, 1985). In der Abbildung 9d) wurde mit einem Cookin P20 Filter behandeltes Licht verwendet, so dass die mit Thionin gefärbten Ausstülpungen der Zellwände kräftiger dargestellt werden konnten. Der Cookin P20-Filter erhöht die Farbtemperatur des eingestrahlten Lichtes auf ca. 5400 K, so dass es mit der Farbtemperatur der 35 mm Negativfilme übereinstimmt. Eine Erhöhung der Farbtemperatur des eingestrahlten Lichtes hebt die geprüften Objekte vor dem Hintergrund besser hervor. Zum Nachweis von Pektin empfiehlt GERLACH (1969) die Benutzung von Methylenblau, Safranin oder Rutheniumrot. Pektin färbt sich mit Methylenblau, Safranin oder Rutheniumrot blau, bräunlich bis orangegelb bzw. karminrot. FLINT (1994) beschrieb die Anwendung verschiedener Färbemittel für Hydrokolloide. Statt Thionin benutzte er Toluidinblau. Hydratisierte Pektine reagierten violett. Die mit Oxalsäure angesäuerten Pektine erscheinen farblos mit Toluidinblau. Rutheniumrot ist ein wasserlöslicher Farbstoff mit sechsfach positiv geladenen Kationen. Es bildet Ionenbindungen mit Säuregruppen von Uronsäuren oder Sulfonsäurederivaten (LILLIE und FULLMER, 1976).

Hydroxylamin reagiert mit den Carboxylgruppen der Pektine und bildet Hydroxamsäure. Nach Zugabe von Fe^{+++}-Ionen im Überschuss bildet sich ein rötlicher Niederschlag.

Traditionell erhält man durch Kneten der Blätter von *Premna oblongata* mit warmem Wasser die gelierenden Hydrokolloide. Die Gelfestigkeit ist abhängig von dem Verhältnis zwischen Blattmenge und Wasser. RAHAYU (2000) untersuchte die Gelfestigkeit von *Cyclea barbata*. Ein Verhältnis von Blattmaterial zu deionisiertem Wasser von 5 zu 100 (w/v) ergab ein optimales Gel. Mit Hilfe von Stärke und der Asche von Reisstroh oder Kokosschalen (Abu Qi) kann man *Mesona palustris* Blätter zur Herstellung von Cincau benutzen. ASYAR (1988) benutzte die getrockneten Blätter sowie die Stängel und Wurzeln, um den Einfluss des pH-Wertes auf die Gelfestigkeit zu prüfen. Es ergibt sich eine maximale Gelfestigkeit bei pH 7,0 bis 8,0.

Die Gewinnung der Pektine von Roten Rüben zeigte, dass die mit Ammoniumoxalat extrahierte Probe geringere Ausbeuten an Pektinen liefert als die mit Wasser, HCl oder NaOH versetzten Proben (DONGOWSKI, 1996). Nachteilig war auch der Gehalt an größeren Mengen Oxalat. Zum Entfernen von Oxalat wird empfohlen, die Hydrokolloidlösung zuerst mit Wasser 24 Stunden zu dialysieren, anschließend das Hydrokolloid mit Kupferacetatlösung zu fällen, um es danach mit Cu^{++}-haltigem Wasser zu reinigen. Zusätzlich wird das Kolloid mit 96 %igem Ethanol gewaschen. Zur Entfernung von Cu^{++}-Ionen wird das Hydrokolloid mit 0,05 mol/l Natriumcitratlösung bei pH 6,5 gelöst und über Wofatit MC 50, einem Sorbens, perkoliert. Eine Verbesserung der Pektingewinnung ist möglich durch zweimaliges Kochen der Proben in Oxalatlösung (DEKKER und RICHARDS, 1972).

Eventuell wird vorhandene Stärke mit DMSO entfernt. Eine Verbesserung der Methoden ist möglicherweise durch eine längere Behandlungszeit mit DMSO (24 h) und anschließender Behandlung mit Glucoamylase erreichbar, wie GORSHKOVA et al. (1996) es bei ihren Untersuchungen an *Linum usitatissimum* beschrieben.

Die Hydrolyse der Polysaccharide ist entweder mit löslichen Mineralsäuren oder mit einer Mischung aus Alkohol und Säure durchzuführen. Der Nachteil des 1. Verfahrens ist, dass Nebenprodukte wie Furan-Derivate enstehen und im Gaschromatogramm zusätzliche Peaks auftreten. Dies führt zu einem Verlust an Polysacchariden. Das 2. Verfahren mit methanolischer Salzsäure wird als mildes Verfahren bezeichnet (SCHERZ und BONN, 1998). Die Methanolyse besitzt gegenüber der sauren Hydrolyse in wässrigem Medium den Vorteil, dass die empfindlichen funktionellen Gruppen der Monosaccharide geschützt werden, wodurch sich Zersetzungsreaktionen und die Umsetzungen mit Aminosäuren aus der Matrix weitgehend vermeiden lassen (SCHMOLCK und MERGENTHALER, 1973).

Nach SCHMOLK und MERGENTHALER (1973) haben die Methanolyse und die Trimethylsilylierung jedoch einen Nachteil: für jedes Monosaccharid ergeben sich 2 bis 4 Derivate, durch Lactonbildung sogar bis zu 6. PREUß und THIER (1982) bekamen bei der Silylierung von Pektin mit Trimethylchlorsilan und N,O-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid 4 Peaks von Galacturonsäure und 1 Peak von Rhamnose.

Bei der Gaschromatografie von Trimethylsilylderivaten wird häufig der Flammenionisationsdetektor durch Ablagerung von SiO_2 an den Elektroden verschmutzt, so dass die Detektorempfindlichkeit nachlässt. Dies kann durch Zugabe von 1,1,2-Trichlortrifluoroethan vermieden werden, wodurch die Ablagerung von SiO_2

durch die Bildung von Fluorwasserstoff verhindert wird (PREUß und THIER, 1982). Hexamethyldisilazan und Trimethylchlorsilan werden meistens verwendet, um Methylglycoside bzw. Methylglycosid-6-Methylester zu verflüchtigen. Dadurch wird jedoch häufig die Spritzenkanüle verstopft. Um diese Verstopfung zu verhindern, ist zu empfehlen, Hexamethyldizilazan durch N,O-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid auszutauschen. Eine weitere Alternative zur Bildung von O-Trimethylsilylethern stellen N-Methyl-N-trimethylsilylacetamid, Bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid, N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid, N-Trimethylsilylimidazole und N-N-Methyl-N-trimethylsilylheptafluorobutyramid dar (SCHERZ und BONN, 1998).

Es sind zahlreiche gaschromatografische Methoden publiziert, um Hydrokolloide zu analysieren. Das Methylierungsverfahren ist eine Alternativmethode zur Prüfung auf Hydrokolloide. Die Standardmethylierungsanalyse nach BJÖRNDAL et al. (1970) und das reduktive Depolymerisationsverfahren nach ROLF und GRAY (1982) gehören zu den Methylierungsverfahren. Bei der Standardmethylierungsanalyse (SDA) werden die Hydrokolloide methyliert. Danach werden die permethylierten Hydrokolloidsäuren hydrolisiert und die freien α–Pyranosen und β–Pyranosen sowie Furanosen zu Alditolen reduziert. Anschließend werden sie acetyliert. Man erhält partiell methylierte Alditoacetate (PMAA), die danach gaschromatografiert werden können. In dem reduktiven Depolymerisationsverfahren werden die permethylierten Hydrokolloide mit Triethylsilan (TES) unter Einwirkung eines Katalysators zu cyklischen Anhydroalditolen gespalten. Anschließend werden sie acetyliert und man bekommt partiell methylierte Anhydroalditolacetate (PMAAA). KIWITT-HASCHEMIE (1994) berichtete ausführlich über die Anwendung der beiden Methoden zum Nachweis von Nichtstärke-Polysacchariden.

Die Chromatogramme der Hydrokolloidaufarbeitungen von jungen und ausgewachsenen Blättern von *P. oblongata* haben bestätigt, dass keine andere Uronsäure als Galacturonsäure zu finden ist. Die Galacturonsäure-Bestimmung der Trockenhydrokolloide nach dem MHDP-Verfahren lieferte mittlere Gehalte von 31, 34 und 42 % für die Gruppen A, B und C (s. Tabelle 17). Wenn man die Gehalte aus den Tabellen 12 und 17 miteinander vergleicht, zeigen sich beim MHDP-Verfahren kleinere Standardabweichungen als beim Titrationsverfahren. Die Pektinbestimmung mit meta-Phenylphenol bringt einen Vorteil, da die Störung durch Anwesenheit von neutralen Mono- und Disacchariden eliminiert werden konnte. Ein anderer Vorteil dieser Bestimmung liegt darin, dass m-Hydroxydiphenyl-Lösung spezifisch mit

Uronsäure reagiert (STROOT, 2001). Diese Methode ist abhängig von der Farbbildung von Mono- und Polysacchariden, sowie dem passenden Messzeitpunkt nach der Abkühlungsphase im Eisbad. LIST et al. (1985) empfehlen eine Erhitzungsdauer von 10 min und 5 minütige Abkühlung, um optimale Chromogenbildung zu erreichen. Als alternative fotometrische Pektinbestimmung dient die Carbazol-Methode. Diese Methode ist jedoch abhängig von der Reinheit der Proben. Begleitende neutrale Mono- und Disaccharide beeinflussen die Richtigkeit.
In dieser Arbeit betragen die relativen Standardabweichungen nach dem MHDP-Verfahren 19 %, 18 % und 29 % für die Gruppen A, B, und C. Homogene wieder gelöste Hydrokolloide garantierten die besseren Messergebnisse. BLASCHECK (1991) empfiehlt die Zugabe von NaCl vor der Trocknung der Hydrokolloide, damit sich ihre spätere Lösbarkeit in Wasser erhöht.

4.4 Die potentielle Anwendung von *Premna oblongata*

P. oblongata wird meistens als Gel-Quelle genutzt und ist in dieser Nutzungsform besonders in West Java bekannt. Diese Pflanzen haben einen potentiellen Nutzungswert auch für andere Regionen. Als Pektinquelle hat diese Pflanzen einige Vorteile:

1. Die Blattproduktion ist nicht sehr stark abhängig vom Wetter und der Kulturzeit. Die Blätter sind in jeder Zeit erntbar.
2. Diese Pflanzen brauchen keine spezifischen Maßnahmen für den Anbau; sie sind widerstandfähig gegen niedrige Feuchtigkeit und wachsen in verschiedenen Bodenqualitäten.
3. Die Blätter können für lange Zeit gelagert werden. Somit kann die Pektinproduktion jeder Zeit stattfinden.
4. Die frischen Blätter werden als Material für die Cincau-Produktion mit niedrigem Preis gehandelt. Durch Extraktion der Pektine ist es möglich, bessere Einkommen für die Produzenten zu erzielen.
5. Diese Pflanze ist als Alternative für Kleinbauern zur Verbesserung des Einkommens einsetzbar.
6. Als Alternative für die Rekultivierung degenerierter Felder und Wälder ist *P. oblongata* geeignet.
7. Die Blattreste von der Pektinherstellung können als Biodüngemittel verwendet werden.

Traditionell wird der Blattsaft zur Bekämpfung von Bluthochdruck genutzt. Über seine Aktivstoffe sind bis jetzt keine Angabe in der Literatur bekannt; bei anderen Arten jedoch gibt es einige Informationen. MURTHY et al. (2006) untersuchten die Wurzeln von *P. herbaceae*. Die Ergebnisse zeigten, dass der mit Hexan extrahierte gelbe Bharangin antimikrobielle Aktivität aufweist. Des Weiteren zeigen zwei Diterpene aus *P. oligotricha* und *P. schimperi* Cytotoxizität gegen Krebszellen (HABTEMARIAM, 1995). RAO et al. (1981) berichteten von zwei Iridoiden, Bisdesoxydihydromonotropein und Geniposidinsäure von *Premna latifolia*.

5. Zusammenfassung

Premna oblongata ist eine tropische Nutzpflanze, die in Südostasien wegen ihrer pektinhaltigen Blätter traditionell als Lieferant für Süßspeisen Verwendung findet. In dieser Arbeit wurden die Anatomie der Blätter sowie die Qualität und Quantität der in ihnen enthaltenen Hydrokolloide beschrieben.

Für die anatomischen Untersuchungen wurden Dünnschnittpräparate, die mit Vibratome in 100 µm dicke Scheiben geschnitten wurden, vorbereitet und als Semidünnschnittpräparate verwendet. Für die Semidünnschnittproben wurden die Blätter in PEM-Puffer fixiert, in 50 %igem, 70 %igem, 90 %igem und 100 %igem Ethanol entwässert, danach in LR-White eingebettet und anschließend bei 60 °C getrocknet. Zum Nachweis von Hydrokolloiden wurden Thionin, Rutheniumrot und Hydroxylamin-$FeCl_3$ eingesetzt. Es wurde nachgewiesen, dass die Hydrokolloide als schnell in Wasser lösliche Pektine vorkommen, die normale Bestandteile der Zellwände sind. Ihr Hauptvorkommen liegt in den Kollenchymgeweben des Stiels und des Mesophylls der Blätter.

Das Kollenchym des Stiels liegt unmittelbar unter der Epidermis als kontinuierliches Gewebe in der Peripherie des Stiels. Das zugehörige Sklerenchym liegt neben dem Phloem und ist als xyläres Sklerenchym zu bezeichnen. Ein markantes Merkmal von *P. oblongata* sind ihre Haare. Ein undifferenziertes, junges Blatt besitzt rote Haare, die sich später zu braun umfärben. Während der Blattentwicklung fallen die meisten Haare ab.

Im Oktober 2002 wurden vier Mal je 20 ausdifferenzierte Blätter von verschiedenen Pflanzen geerntet, getrocknet und ihre Frisch- und Trockenmassen ermittelt (Versuchsreihe A). Als Parameter für die innerartliche Variabilität wurden ebenfalls ausgewachsene Blätter – je 20 von 4 verschiedenen Pflanzen - im März 2003 untersucht (Versuchsreihe B). Anschließend wurden von März 2003 bis Februar 2004 monatlich je 20 Blätter von verschiedenen Pflanzen geerntet (Versuchsreihe C).

Die Hydrokolloide wurden mit 0,5 %iger Ammoniumoxalat-Lösung aus den Blättern extrahiert, mit 96 %igem Ethanol gewaschen und als Trockenhydrokolloid bestimmt. Dessen Pektingehalt wurde mit 0,01 mol/l NaOH und 0,01 mol/l HCl titriert, sowie mit meta-Phenylphenol photometriert. Die Hydrokolloidgehalte von *P.*

oblongata Blättern erreichten - bezogen auf die Frischmasse - mittlere Werte von 3,4, 3,2 und 2,5 % für die Untersuchungsgruppen A, B und C. Bezogen auf die Blatt-Trockenmasse betragen ihre Werte 18,4, 16,4 und 14,2 %. Nach dem Titrationsverfahren ergeben sich für die Pektingehalte Mittelwerte von A) 35 %, B) 32 % und C) 41 %, für die Esterifizierungsgrade A) 65 %, B) 40 % und C) 36 %. Die Galacturonsäure-Bestimmung der Trockenhydrokolloide nach dem meta-Phenylphenol-Verfahren lieferte mittlere Gehalte von 31, 34 und 42 % für die Gruppen A, B und C. Auf die Blatt-Frischmasse oder die Blattfläche bezogene Pektinkonzentrationen erwiesen sich als weniger geeignet.

Ihre Monosaccharidzusammensetzung wurde mit Hilfe der Gaschromatografie untersucht. Das Hydrokolloid wurde mit methanolischer Salzsäure hydrolisiert und getrocknet. Die erhaltenen Monosaccharide wurden als Trimethylsilylether gaschromatografisch mit Hilfe einer Fused-silica-Kapillarsäule (stationäre Phase: DB 5) und Flammenionisationsdetektor bestimmt. Zur Absicherung erfolgte die Auswertung mit den jeweiligen Referenzsubstanzen a) über die Peakhöhe, b) und c) über die internen Standardsubstanzen Erythrit und Sorbit. Alle drei Verfahren führten zu vergleichbaren Ergebnissen. Nach 4 Stunden Hydrolyse wurden die Proben silyliert und gaschromatografiert. Nach dem Berechnungsverfahren a ergibt sich als mittlere Zusammensetzung für das Hydrokolloid der ausdifferenzierten Blätter: 4 % Galactose, 91 % Galacturonsäure, 4 % Glucose und 1 % Rhamnose. Nach dem Berechnungsverfahren b erhält man 4 % Galactose, 91 % Galacturonsäure, 4 % Glucose und 1 % Rhamnose. Berechnungsverfahren c ergibt 4 % Galactose, 90 % Galacuronsäure, 5 % Glucose und 1 % Rhamnose. Bei älteren, ausdifferenzierten Blättern war Xylose in Spuren nachweisbar. Als Hauptbestandteil wurde Galacturonsäure nachgewiesen – die Hydrokolloide sind damit als Pektine zu charakterisieren.

Für junge, undifferenzierte Blätter ergibt sich im Mittel folgende Zusammensetzung für die Trockenhydrokolloide nach dem Berechnungsverfahren a): 4,5 % für Arabinose, 6,0 % für Galactose, 2,1 % für Glucose und 1,5 % für Rhamnose. Den Hauptanteil bildet Galacturonsäure mit 87,0 %. Nach dem Berechnungsverfahren b ergeben sich folgende Mittelwerte: 4,0 % Arabinose, 6,3 % Galactose, 87,5 % Galacturonsäure, 1,0 % Glucose und 1,7 % Rhamnose. Nach dem Berechnungsverfahren c liegen Arabinose, Galactose, Galacturonsäure,

Glucose und Rhamnose bei 3,7 %, 7,3 %, 85,9 %, 2,4 % und 1,5 %. Xylose wurde in Spuren nachgewiesen.

6. Verzeichnisse

6.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ara	Arabinose
BSA	N,O-Bis(trimethylsilyl)-acetamid
c	Stoffmengenkonzentration
CDTA	trans-1,2-Cyclohexylendinitrilotetraessigsäure
cm	Zentimeter
DE	Esterifizierungsgrad
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EDV	elektronische Datenverarbeitung
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
Ery	Erythrit
Fa.	Firma
FG	Freiheitsgrad
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Gramm
Gal	Galactose
GalA	Galacturonsäure
GC	Gaschromatografie
Glu	Glucose
h	Stunde
H [4h]	vierstündige Hydrolyse
Ḥ [8h]	achtstündige Hydrolyse
Hb	Hauptnerven der Laminabasis
Hm	Hauptnerven der Laminamitte
He	Hauptnerven des Laminaendes
HE	Höheneinheiten
Kap.	Kapitel

Lb	Laminabasis
Lm	Laminamitte
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
Le	Laminaende
Max.	Maximum
mbar	Millibar
mg	Milligramm
MHDP	meta-Hydroxydiphenyl (m-Phenylphenol)
min	Minute
Min.	Minimum
Mittelw.	Mittelwert
MK-Wert	Momentenkoeffizient
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mol	Mol
n	Anzahl der Proben
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NPK	Stickstoff-Phosphor-Kalium
P	Pektingehalt
PIPES	Piperazine-N,N'-bis(2-ethylsulfonsäure)
Rha	Rhamnose
RZ	Retentionszeit
RRZ	relative Retentionszeit
s	Sekunde
Sa	Stielanfang
Se	Stielende
Sm	Stielmitte
Sor	Sorbit
Std.	Standardabweichung
t-Wert	Prüfgröße nach dem Welch-Test
TMS	Trimethylsilylether
var.	Varietät
U/min	Umdrehungen pro Minute

UV	ultraviolett
Xyl	Xylose
α	Irrtumswahrscheinlichkeit
°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
$\sum$ Ara	Peakhöhensumme der Arabinose-TMS
$\sum$ Gal	Peakhöhensumme der Galactose-TMS
$\sum$ GalA	Peakhöhensumme der Galacturonsäuremethylester-TMS
$\sum$ Glu	Peakhöhensumme der Glucose-TMS
$\sum$ Rha	Peakhöhensumme der Rhamnose-TMS
$\sum$ Xyl	Peakhöhensumme der Xylose-TMS

6.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Blattbereiche für die mikroskopischen Untersuchungen (Sa = Stielanfang, Sm = Stielmitte, Se = Stielende, Hb = Hauptnerven der Laminabasis, Hm = Hauptnerven der Laminamitte, He = Hauptnerven des Laminaendes, Lb = Laminabasis, Lm = Laminamitte, Le = Laminaende) 12

Abbildung 2: Cuticula von *Premna oblongata, gefärbt mit* a) Sudan III, b) Safranin-Astrablau, c) Rutheniumrot, d) Primulin, Fluoreszenzlichtmikroskopie 22

Abbildung 3: 100 µm dicker Querschnitt einer *Premna oblongata*-Blattknospe a) Drüsen- und Borstenhaare sind auf der Blattbasis verteilt; b) rötliche Drüsen- und Borstenhaare 23

Abbildung 4: a) 100 µm dicker Querschnitt eines Blattstiels mit Hydroxylamin-$FeCl_3$-Lösung gefärbt; b) keilförmige Grenze zwischen Zellwänden (1 µm dick; mit Thionin gefärbt) 24

Abbildung 5: Rindenparenchym-Schichten sind mit a) Thionin, b) Rutheniumrot und c) Primulin gefärbt. d) ist ein farbloser 1 µm dicker Schnitt; das Licht ist polarisiert und invertiert. 26

Abbildung 6: Sklerenchymzellen sind mit a) Safranin–Astrablau und b) Ruthenium rot gefärbt; c) zeigt die Xylemgefäße und die Sklerenchymzellen gegen Safranin-Astrablau; d) zeigt die Sklerenchymzellen und Xylemgefäße mit Primulin gelbgrün gefärbt. 27

Abbildung 7: mit Thionin gefärbte Xylemgefäße: a) parallel verlaufende Gefäße zwischen Parenchymzellen liegend; b) 2 nebeneinander liegende Gefäße; das eine ist links, das andere rechts gedreht; c) Netztracheide mit Schlitztüpfel; d) Netztracheide, vergrößert 32

Abbildung 8: Rindenparenchymzellen mit nadelförmigen Kristallen, a) linear polarisiertes Licht mit Blaufilter, b) wie bei a) aber weiter invertiert. 33

Abbildung 9: Färbung des Schwammparenchyms, gefärbt mit a) Hydroxylamin-$FeCl_3$, b) Rutheniumrot, 1 µm dicker Querschnitt der Lamina, c) Hydroxylamin-$FeCl_3$ und d) Thionin sowie mit Einsatz des Blaufilters P.020 von Cokin 35

Abbildung 10: Histogramme der Frisch- und Trockenmassen der Blätter. a) und b) Frisch- und Trockenmassen der Versuchsreihe A; c) und d) Frisch- und Trockenmassen der Versuchsreihe B; e) und f) Frisch- und Trockenmassen der Versuchsreihe C. 39

Abbildung 11: Histogramme der Blattflächen von den Versuchsreihen a) A, b) B, und c) C. 41

Abbildung 12: Histogramme der Epidermiszellflächen der a) Sa-, b) Sm-, c) Se-Oberseite sowie der d) Hb- , e) Hm- und f) He-Oberseite: n = 200 44

Abbildung 13: Histogramme der Epidermiszellflächen der a) Sa-, b) Sm-, c) Se-Unterseite sowie der d) Hb- , e) Hm- und f) He-Unterseite; n = 200 45

Abbildung 14: Histogramme der Epidermiszellumfänge der a) Sa-, b) Sm-, c) Se-Oberseite sowie der d) Hb- , e) Hm- und f) He-Oberseite; n = 200 47

Abbildung 15: Histogramme der Epidermiszellumfänge der a) Sa-, b) Sm-, c) Se-Unterseite sowie der d) Hb- , e) Hm- und f) He-Unterseite, n = 200 49

Abbildung 16: Histogramme der Epidermiszellflächen der a) Lb-, b) Lm-, c) Le-Oberseite sowie der d) Lb-, e) Lm- und f) Le-Unterseite; n = 200 51

Abbildung 17: Histogramme der Epidermiszellumfänge der a) Lb-, b) Lm-, c) Le-Oberseite sowie der d) Lb-, e) Lm- und f) Le-Unterseite; n = 200 53

Abbildung 18: Histogramme der Hydrokolloidgehalte von 80 einzeln untersuchten Blättern der Versuchsreihen A und B bzw. 240 Blättern der Versuchsreihe C; a), c) und e) bezogen auf die Frischmasse, b), d) und f) bezogen auf die Trockenmasse..... 55

Abbildung 19: Histogramme der Hydrokolloidgehalte bezogen auf die Blattfläche [µg/mm²] von a) 80 einzeln untersuchten Blättern der Versuchsreihen A und b) der Versuchsreihe B bzw. c) von 240 Blättern der Versuchsreihe C 58

Abbildung 20: Trockenpektinpulver von a) jungen und b) ausgewachsenen Blättern 61

Abbildung 21: Mikroskopische Untersuchung von Hydrokolloiden, zum Teil angefärbt: a) Trockenhydrokolloid mit Phloroglucin-HCl gefärbt, b) Zellreste in gelöstem Hydrokolloid (ohne Färbung), c) Hydrokolloidpulver reagiert mit Thionin violett bis blau, d) gereinigtes Pektin mit Thionin gefärbt und mit Halogenlicht beleuchtet, e) nicht gereinigte Pektinprobe, behandelt wie (d)..... 62

Abbildung 22: Histogramme der Pektingehalte a), b) und c) der Blätter und deren Esterifizierungsgrad d), e) und f) der Versuchsreihen A - C 64

Abbildung 23: Histogramme der Pektingehalte der Blätter a), b) und c) bezogen auf die Frischmasse und d), e) und f) bezogen auf die Trockenmasse der Versuchsreihen A - C..... 69

Abbildung 24: Histogramme der Pektingehalte der Blätter bezogen auf die Blattfläche [µg/mm²] der Versuchsreihen a) A, b) B und c) C..... 73

Abbildung 25: Histogramme der Uronsäuregehalte der Trockenhydrokolloide der Blätter der Versuchsreihen a) A, b) B und c) C 75

Abbildung 26: Gaschromatogramme der Referenzsaccharide. a) Arabinose, b) Galactose, c) Galacturonsäuremethylester, d) Glucose, e) Rhamnose und f) Xylose als Trimethylsilylether; interne Standards: 3,3 ng Erythrit-TMS (Ery) und 5 ng Sorbit-TMS (Sor). Die Saccharidpeaks sind mit den Anfangsbuchstaben der jeweiligen Zucker und einer Ziffer bezeichnet; GalA: Galacturonsäuremethylester 77

Abbildung 27: Calibriergeraden des Referenzsaccharids Galacturonsäuremethyl-ester als TMS-Silylether (GalA) mit vorgeschalteter Hydrolysezeit von H [4h] und H [8h]; die Konzentration ist aufgetragen gegen a) die Summe der GC-Einzelpeakhöhen von GalA, b) das Verhältnis der Summe der GC-Einzelpeakhöhen von GalA zu der Peakhöhe der internen Standardsubstanz Erythrit und c) das Verhältnis der Summe der GC-Einzelpeakhöhen von GalA zu der Peakhöhe der internen Standardsubstanz Sorbit. 83

Abbildung 28: Typisches Gaschromatogramm einer Hydrokolloidaufarbeitung von ausgewachsenen Blättern von *Premna oblongata* 84

Abbildung 29: Anteile der einzelnen Monosaccharide in den Hydrokolloiden der ausgewachsenen Blätter mit Angabe der Standardabweichung, bestimmt nach a) der Peakhöhensumme des jeweiligen Saccharids, b) dem Verhältnis der Peakhöhensumme des jeweiligen Saccharids zur Erythritpeakhöhe, c) dem Verhältnis der Peakhöhensumme des jeweiligen Saccharids zur Sorbitpeakhöhe. 87

Abbildung 30: Typisches Gaschromatogramm von Hydrokolloiden aus einem jungen Blatt von *Premna oblongata* 88

Abbildung 31: Anteil der Peakhöhensumme der Monosaccharide nach Hydrolyse der Hydrokolloide von jungen Blättern von *Premna oblongata*, n = 4 89

Abbildung 32: Anteile der einzelnen Monosaccharide in den Hydrokolloiden der jungen Blätter mit Angabe der Standardabweichung, bestimmt nach a) der Peakhöhensumme des jeweiligen Saccharids, b) dem Verhältnis der Peakhöhensumme des jeweiligen Saccharids zur Erythritpeakhöhe, c) dem Verhältnis der Peakhöhensumme des jeweiligen Saccharids zur Sorbitpeakhöhe. 90

Abbildung 33: Calibriergeraden des Referenzsaccharids Arabinose als TMS (Ara) mit vorgeschalteter Hydrolysezeit von H [4h] und H [8h]; die Konzentration ist aufgetragen gegen a) die Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Ara, b) das Verhältnis der Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Ara zu der Peakhöhe der internen Standardsubstanz Erythrit und c) das Verhältnis der Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Ara zu der Peakhöhe der internen Standardsubstanz Sorbit. 119

Abbildung 34: Calibriergeraden des Referenzsaccharids Galactose als TMS (Gal) mit vorgeschalteter Hydrolysezeit von H [4h] und H [8h]; die Konzentration ist aufgetragen gegen a) die Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Gal, b) das Verhältnis der Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Gal zu der Peakhöhe der internen Standardsubstanz Erythrit und c) das Verhältnis der Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Gal zu der Peakhöhe der internen Standardsubstanz Sorbit. 120

Abbildung 35: Calibriergeraden des Referenzsaccharids Glucose als TMS (Glu) mit vorgeschalteter Hydrolysezeit von H [4h] und H [8h];

die Konzentration ist aufgetragen gegen a) die Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Glu, b) das Verhältnis der Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Glu zu der Peakhöhe der internen Standardsubstanz Erythrit und c) das Verhältnis der Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Glu zu der Peakhöhe der internen Standardsubstanz Sorbit. 121

Abbildung 36: Calibriergeraden des Referenzsaccharids Rhamnose als TMS (Rha) mit vorgeschalteter Hydrolysezeit von H [4h] und H [8h]; die Konzentration ist aufgetragen gegen a) die Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Rha, b) das Verhältnis der Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Rha zu der Peakhöhe der internen Standardsubstanz Erythrit und c) das Verhältnis der Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Rha zu der Peakhöhe der internen Standardsubstanz Sorbit. 122

Abbildung 37: Calibriergeraden des Referenzsaccharids Rhamnose als TMS (Rha) mit vorgeschalteter Hydrolysezeit von H [4h] und H [8h]; die Konzentration ist aufgetragen gegen a) die Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Rha, b) das Verhältnis der Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Rha zu der Peakhöhe der internen Standardsubstanz Erythrit und c) das Verhältnis der Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Rha zu der Peakhöhe der internen Standardsubstanz Sorbit. 123

6.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des verwendeten Blaukorn NPK-Düngers (Compo GmbH & Co KG, Münster) 7

Tabelle 2: Verdünnungsreihe der Galacturonsäure-Lösungen zur Ermittlung der Calibriergeraden 8

Tabelle 3: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Blatt-Frischmassen und –Trockenmassen der Versuchsreihen A - C 40

Tabelle 4: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Blattflächen der Versuchsreihen A - C 42

Tabelle 5: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Epidermiszellflächen von Sa-, Sm-, Se-, Hb-, Hm- und He- Ober- und Unterseite 46

Tabelle 6: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Epidermiszellumfänge von Sa-, Sm-, Se-, Hb-, Hm- und He- Ober- und Unterseite 50

Tabelle 7: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Epidermiszellflächen von Lb-, Lm-, Le-Oberseite und Lb-, Lm- und Le-Unterseite 52

Tabelle 8: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Epidermiszellumfänge von Lb-, Lm-, Le-Oberseite und Lb-, Lm- und Le-Unterseite 54

Tabelle 9: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Hydrokolloidgehalte der Blätter der Versuchsreihen A – C, bezogen auf die Frischmasse 56

Tabelle 10: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Hydrokolloidgehalte der Blätter der Versuchsreihen A – C, bezogen auf die Trockenmasse 57

Tabelle 11: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Hydrokolloidgehalte der Blätter der Versuchsreihen A – C, bezogen auf die Blattfläche 59

Tabelle 12: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Pektingehalte der Trockenkolloide der Versuchsreihen A – C 66

Tabelle 13: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Esterifizierungsgrade der Trockenkolloide der Versuchsreihen A – C 67

Tabelle 14: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Pektingehalte bezogen auf die Blatt-Frischmasse der Versuchsreihen A - C 70

Tabelle 15: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Pektingehalte bezogen auf die Blatt-Trockenmasse der Versuchsreihen A - C 71

Tabelle 16: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Pektingehalte bezogen auf die Blatt-Fläche der Versuchsreihen A – C 74

Tabelle 17: Minimale, maximale und Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Uronsäuregehalte der Blätter der Versuchsreihen A – C 76

Tabelle 18: Retentionszeiten der einzelnen Peaks der Referenzsaccharide und ihre relativen Retentionszeiten bezogen auf Erythrit und Sorbit 79

Tabelle 19: GC-Peakhöhen der Referenzsaccharide sowie die Verhältnisse der Peakhöhen der Einzelpeaks zu den Höhen der internen Standardsubstanzen Erythrit und Sorbit und zur Höhensumme des jeweiligen Monosaccharids 80

Tabelle 20: Calibrierreihen der Referenzsaccharide mit Angabe der Summe der GC-Peakhöhen der Referenzsaccharide sowie der Verhältnisse der Peakhöhen der Einzelpeaks zu den Höhen der internen Standardsubstanzen Erythrit und Sorbit 82

Tabelle 21: GC-Peakhöhen der Monosaccharide, RZ, RRZ zu Erythrit und Sorbit und die Höhenanteile der Einzelpeaks an der Summe aller Monosaccharidpeaks 85

Tabelle 22: Galacturonangehalt in 100 g Alkohol unlöslicher Substanzen der Roten Rübe (*Beta vulgaris var. conditiva*) und deren Esterifizierungsgrad (DE) 95

6.4. Literaturverzeichnis

ASYAR, C., 1988: Isolasi dan Karakteristiksa Komponen Pembentuk Gel dari Tanaman Cincau Hitam (*Mesona palustris* BL.). Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

BACKER, R.C., VAN DEN BRINK, R.C.B, 1965: Flora of Java. N.V.P. Noordhoff, Groningen

BACKER, C. J., AIST, J. R. und BATEMAN, D. F., 1980: Ultrastructural and Biochemical Effect of Endopectate Lyase on Cell Walls from Suspension Cultures of Bean and Rice. Can J Bot, **58**: 867-880

BJÖRNDAL, H., HELLERQUIST, C. G., LINDBERG, B., und SVENSSON, S., Gas-Flüssigkeits-Chromatographie und Massenspektrometrie bei der Methylierungsanalyse von Polysacchariden. Angew. Chem., **82**: 643-674

BOUVENG, H.O., LINDBERG, B., 1965: Native acylated wood polysaccharides. Extraction with dimethyl sulfoxide. In: Whistler RL (ed) Method in Carboydrat Chemistry, Vol.5. Academic Press, New York, 147- 150

BLASCHEK, W., 1991: Isolierung und Analytik von Polysacchariden in: FRANZ, G. (Hrsg.): Polysaccharide. Springer Verlag Berlin

BRÄUTIGAM, M., 1985: Untersuchungen über die Schleimpolysaccharide aus *Plantaginis lanceolatae Folium* und Versuche zur Gewebekultur von schleimbildenden pflanzlichen Geweben. Dissertation. Universität Regensburg

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), 2002: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG, Band 1/1, 00.00-13 „Untersuchung von Lebensmitteln – Nachweis von natürlichen Dickungsmitteln in Lebensmitteln“. Beuth Verlag Berlin

BURKILL, I.H., 1935: A Dictionary of the Malay Peninsula. Goverments of the Straits Settlements and Federatet Malay States by the Crown Agents for the Colonies, London

CAMUS, A., 2000: Karakteristik Pembentukan Gel Campuran Hidrokoloid Cincau Hijau (*Premna oblongifolia* MERR.), Alginat dan Low Methoxyl Pectin (LMP) 36-44 % Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

CLASSEN, B., AMELUNXEN, F., BLASCHEK, W., 1994: *Malva sylvestris*. Untersuchungen zur Entstehung von Schleimbehältern. Apotheker Zeitung, **134**, Nr. 38

DECKE, U., 1980: Anatomische Studien über Guar (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) TAUB.). Dissertation. Universität Hamburg

DEKKER, R.F.H., RICHARDS, G.N., 1972: Determination of Pectic Substances in Plant Material. J. Sci. Food Agric., **23 (1972)**: 475-483

DONGOWSKI, G., 1996: Untersuchungen an Ballaststoff- und Pektinfraktion von *Beta vulgaris var.conditiva*. *Z. Lebensm*. *Forsch*. **(2002):** 285-293

DEUTSCHMANN, F., 1976: Zur mikroskopischen Untersuchung von pflanzlichen Dickungsmitteln verschiedener botanischer Herkunft. In: JAHRESBERICHT 91. bis 92. Jahrgang für die Jahre 1973 und 1974. Institut für Angewandte Botanik der Universität Hamburg

DIESTELBARTH, H., 1982: Die Schleimpolysaccharide von *Taxus baccata* und *Thuja occidentalis*. Dissertation. Universität Stuttgart

EL AFRY, M.M.F. (1978): Untersuchungen zur Morphologie, Anatomie, Physiologie und zum Schleim- und Pektingehalt von Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*). Dissertation. Georg-August-Universität Göttingen

ESCHRICH, W., 1995: Funktionelle Pflanzenanatomie. Springer Verlag, Berlin

ESAU, K., 1965: Plant Anatomy. John Wiley & Sons, Inc., New York

FAHN, A., 1979: Secretory Tissues in Plants. Academic Press, London

FLINT, O., 1994: Food Microscopy. Bios Scientific Publisher

FROHNE, D., 1985: Anatomisch-mikroskopische Drogenanalyse. 3. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart

GERLACH, D., 1969: Botanische Mikrotechnik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

GORSHKOVA. T.A., WYATT, S.E., SALNIKOV, V.V., GIBEAUT, D.M., IBRAGIMOV, M.R., LOZOVAYA, V.R., CARPITA, N.C., 1996: Cell-Wall Polysaccharides of Developing Flax Plants. Plant Physiol. **110 (1996):** 721-729

GROB, K., GROB, G. (1972). Techniques of Capillary Gas Chromatography of the Full Utilization of High-Performance Columns. Part I: Direct Sample Injection. Chromatographia, **5 (1972):** 3-12

HABTEMARIAM, S., 1995: Cytotoxicity of diterpenes from *Premna schimperi* and *Premna oligotricha*. Planta Med. **61 (1995):** 368-369

HEYNE, K., 1927: De Nuttige Planten van Nederlandsche Indië. Ruygrok & Co., Batavia

HOLZACH, O., FLÜCK, H., 1950: Untersuchungen über Zusammensetzung und Aufbau der Schleimstoffe von *Tamus communis* L. Pharm. Acta Helve., **10 (1950)**: 299-366

HOOKER, J.D., 1885: Flora of British India. Vol. IV, L. Reeve & Co., London

JARVIS M.C., 1982: The proportion of calcium-bound pectin in plant cell wall. Planta, **154 (1982)**: 344-346

KAUSSMANN, B., 1963: Pflanzenanatomie: Unter besonderer Berücksichtigung der Kultur- und Nutzpflanzen. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

KIWITT-HASCHEMIE, K., 1994: Hydrokolloide. Beitrag zur strukturellen Charakterisierung von Nichtstärke-Polysacchariden und ihrem Nachweis in Lebensmitteln. Dissertation. Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Universität Hamburg

KOOIMAN, P., 1969: Cold Water-extractable Pectin in Cell Walls of Plant Leaves. J. Sci. Food. Agric. , **20 (1969)**: 18-20

KOORDERS, S. H., VALETON, TH., 1914: Atlas der Baumarten von Java. Buch und Steindruckerei von Fa. P. W. M. Trap, Leiden

KURNIAWAN, O., 1999: Mempelajari Pengaruh pH, Penambahan $FeSO_4$. Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

KURNIATI, I., 1999: Mempelajari Pengaruh pH, Penambahan $MnCl_2$ dan CMC terhadap Karakteristik Gel Cincau Hijau. Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

LAM, H.J., 1919: The Verbenaceae of the Malayan Archipelago, Together with Those from the Malayan Peninsula, the Philippines, the Bismarck-Archipelago and the Palau, Marianne and Caroline-Islands. M. De Waal, Groningen

LAM, H.J., VAN DEN BRINK, R.C.B., 1921: Revision of the Verbenaceae of the Dutch East-Indies and surrounding countries. In: Bulletin du Jardin Botanique. Série III, Vol. III, S. 1-120, Archipel Drukkerij, Buitenzorg

LILIE, R.D., FULLMER, H.M., 1976: Histopathologic Technique and Practical Histochemistry. Mc.Graw-Hill, New York, 611-678

LIST, D., BUDDRUß, S., BODTKE, M., 1985: Pectinbestimmung mit meta-Phenylphenol. Z. Lebensm. Unters.- Forsch, **180 (1985)**: 48-52

LOZÁN, J., 1992: Andgewandte Statistik für Naturwissenschaftler. Verlag Paul Parey, Berlin

MELCHIOR, H. (Hrsg.), 1964: A. Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien mit besonderer Berücksichtigung der Nutzpflanzen nebst einer Übersicht über die Florenreiche und Florengebiete der Erde. II. Band, 12. Aufl., Gebrüder Borntraeger, Berlin-Nikolassee

MERGENTHALER, E. (Hrsg.) 1984: Hydrokolloid. Stabilisatoren, Dickungsmittel- und Geliermittel in Lebensmitteln. Fachgruppe Lebensmittelchemie und gerichtliche Chemie in der GDCh. Behr's Verlag, Hamburg

MEYBERG, M., 1986: Bildung, Sekretion und Zusammensetzung des Schleims in den Blattknospen von *Nymphoides peltata* (S.G. GMEL.) O. KTZE. Dissertation. Fachbereich Biologie, Universität Hamburg

MURTHY, M.M., SUBRAMANYAM, M., GIRIDHAR, K. V. und JETTY, A., 2006: Activities of bharangin from *Premna herbaceae* Roxb. and bharangin monoacetate. J. Ethnopharm., **104 (2006)**: 290-292

NAGLSCHMID, F.G.M., 1979: Über die wasserlöslichen polymeren Kohlenhydrate aus den Blättern von *Verbascum densiflorium* BERTOLONI und ihre physiologische Bedeutung. Dissertation. Universität Stuttgart

ODENTHAL, S., 1984: Über immunologisch wirksame Schleimpolysaccharide aus der Kamille und andere Drogen. Dissertation. Ludwig-Maximilian-Universität München

PERRY, L.M., METZGER, J., 1979: Medical Plants of East and Southeast Asia: Attributed Properties and Uses. The MIT Press, Cambridgde, Massachusetts

PREUß, A., THIER, H.P., 1982: Quantitative Analyse natürlicher Dickungsmittel durch Methanolyse und Capillargaschromatographie. Z. Lebensm. Unters.-Forsch., **175 (1982)**: 93-100

QUISUMBING, E., 1959: Medical Plant of the Philippines. Departement of Agriculture and Natural Resources, Republic of the Philippines

RAO, C.B., VIJAYAKUMAR, E.K.S., VIJAYALAKSHMI, K.V., 1981: Two iridoids, 7-deoxyloganic acid also known as bisdesoxydihydromonotropein and geniposidic acid, from *Premna latifolia* ROXB. (Verbenaceae) have been reported. Planta Med., **41 (1981)**: 80-83

RAHAYU, S., 2000: Mempelajari Pengaruh pH, Penambahan $CaCl_2$ dan Alginat terhadap Karakteristik Gel Cincau Hijau (*Cyclea barbata* L. MIERS). Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

ROLAND, J.C., VIAN, B., 1991: General Preparation and Staining of Thin Sections. In: Hall, J.L., HAWES, C. (Hrsg.): Electron Microscopy of the Plant Cells. Academic Press, London

ROLF, D., GRAY, G.R., 1982: Reductive Cleavage of Glycoside. J. Am. Chem. Soc., **104 (1982):** 3539-3541

ROY, S., CONWAY, W.S., WATADA, A.E., SAMS, C.E., POOLEY, C.D., WERGIN, W.P., 1994: Distribution of the Anionic Sites in the Wall of Apple Fruit after Calcium Treatment. Protoplasma, **178 (1994):** 156-167

RUSTANTI, N., 2000: Karakteristik Pembentukan Gel Campuran Hidrokoloid Cincau Hijau (*Premna oblongifolia* Merr) dan Low Methoxyl Pectin (LMP) DE 36 – 44. Faklutas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

SCHERZ, H., BONN, G., 1998: Analytical Chemistry of Carbohydrates. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

SCHMOLCK, W., MERGENTHALER, E., 1973: Beiträge zur Analytik von Polysacchariden, die als Lebensmittelzusatzstoffe verwendet werden. II. Gaschromatographischer Nachweis nach Methanolyse und Trimethylsilylierung, Z. Lebensm. Unters.-Forsch., **152 (1973)**: 263-273

SETYANINGSIH, W., 2000: Karakteristik Pembentukan Gel Campuran Hidrokoloid Cincau Hijau (*Premna oblongifolia* Merr.) dan Alginat. Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

SMITH, F., MONTGOMERY, R., 1959: The Chemistry of Plant Gums and Mucilage. Verlag Reinhold, New York

STEINEGGER, E., HÄNSEL, R., 1968: Lehrbuch der Pharmakognosie auf phytochemischer Grundlage, 2. Auflage, Verlag Springer, Berlin

STROOT, S., 2001: Eine praxisbezogene Labormethode zur Ermittlung der Wirksamkeit von Pektinasen für die Sekundärmembran-Minderung bei Membrantrenn-Prozessen. Dissertation, Universität Oldenburg

SUMARTI, L., 1999: Mempelajari Pengaruh pH, Penambahan $MgCl_2$ dan Metilselulosa terhadap Karakteristik Gel Cincau Hijau (*Cyclea barbata* L.). Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

SURADI, K., 1984: Ekstraksi, Isolasi dan Karakterisasi Pektin dari Beberapa Jenis Kulit Jeruk. Fakultas Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor

SUNANTO, H., 1995: Budidaya Cincau. Penerbit Kanisius, Yogyakarta

TORKELSON, A.R., 1996: The Cross Name Index to Medicinal Plants, Vol III. CRC Press, London

TSCHIRCH, A., 1912: Handbuch der Pharmakognosie Bd. I, Verlag Chr. Herm. Tauchnitz, Leipzig

WU, Z.Y., RAVEN P.H., eds. 1994: Flora of China. Vol. 17 (Verbenaceae through Solanaceae). Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.

WYATNO, A.K., 2000: Karakteristik Pembentukan Gel Campuran Hidrokoloid Cincau Hijau (*Premna oblongifolia* Merr.) dan Low Methoxyl Pectin (LMP) DE 34, 8. Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

7. Anhang

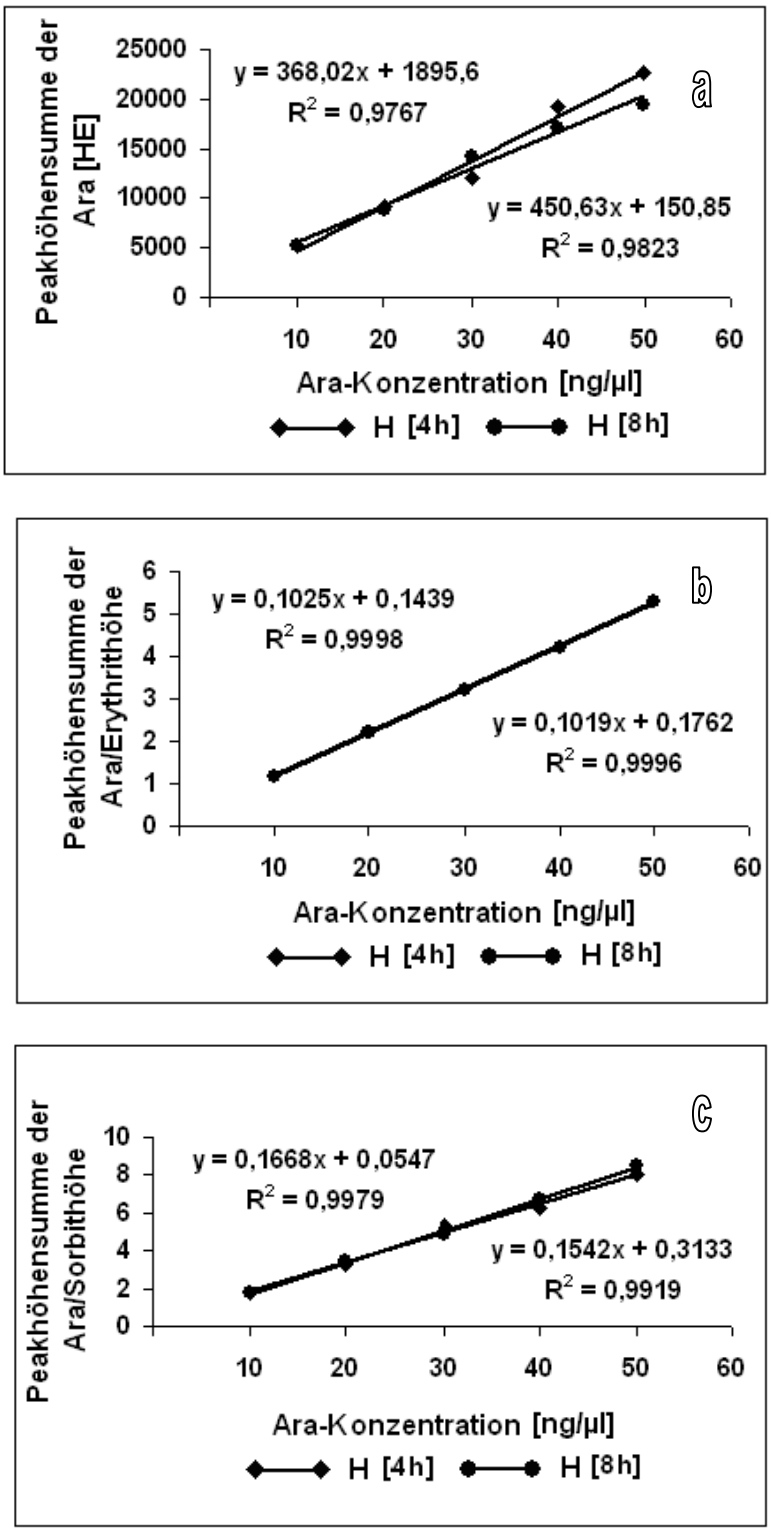


Abbildung 33: Calibriergeraden des Referenzsaccharids Arabinose als TMS (Ara) mit vorgeschalteter Hydrolysezeit von H [4h] und H [8h]; die Konzentration ist aufgetragen gegen a) die Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Ara, b) das Verhältnis der Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Ara zu der Peakhöhe der internen Standardsubstanz Erythrit und c) das Verhältnis der Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Ara zu der Peakhöhe der internen Standardsubstanz Sorbit.

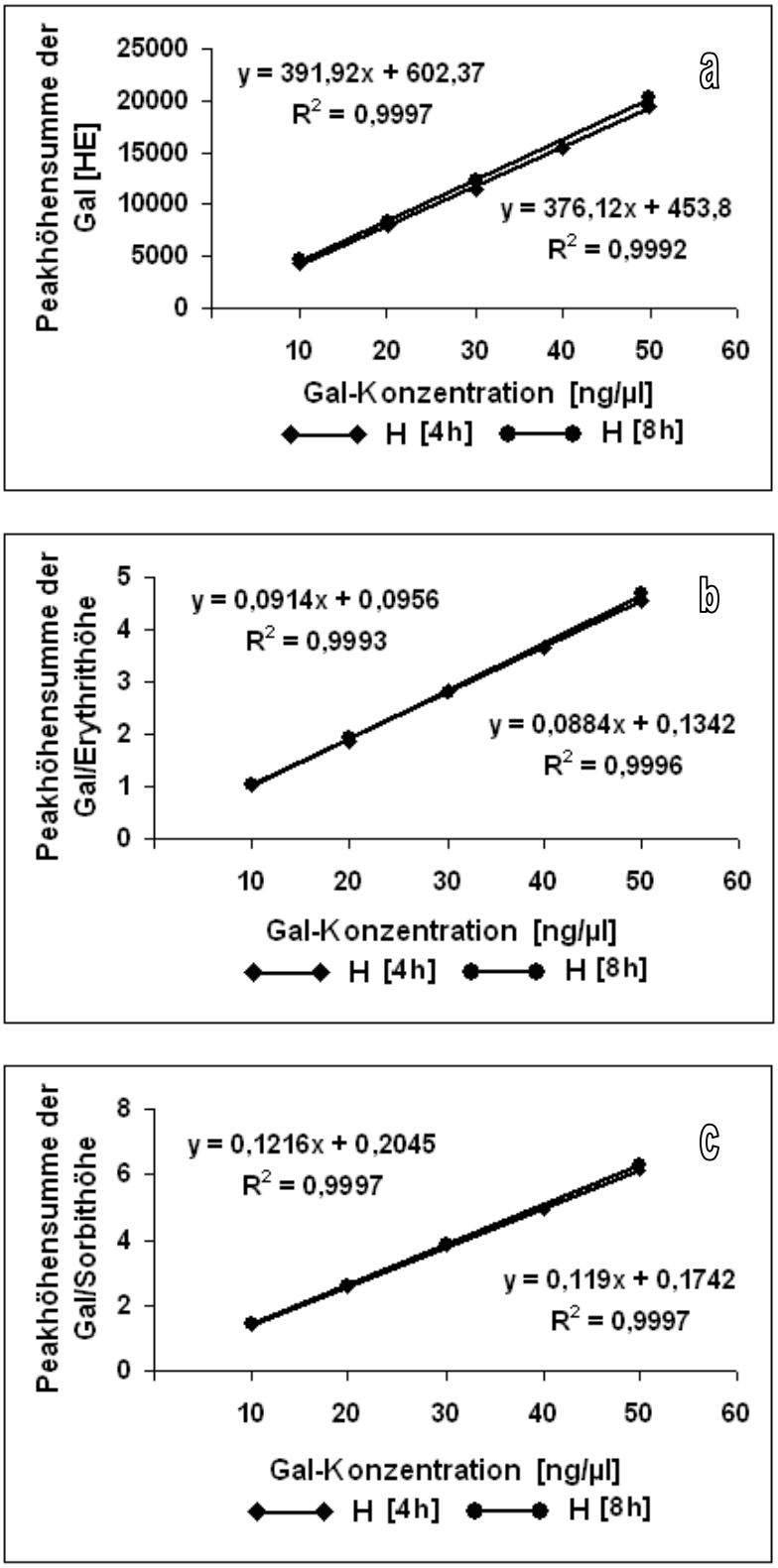


Abbildung 34: Calibriergeraden des Referenzsaccharids Galactose als TMS (Gal) mit vorgeschalteter Hydrolysezeit von H [4h] und H [8h]; die Konzentration ist aufgetragen gegen a) die Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Gal, b) das Verhältnis der Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Gal zu der Peakhöhe der internen Standardsubstanz Erythrit und c) das Verhältnis der Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Gal zu der Peakhöhe der internen Standardsubstanz Sorbit.

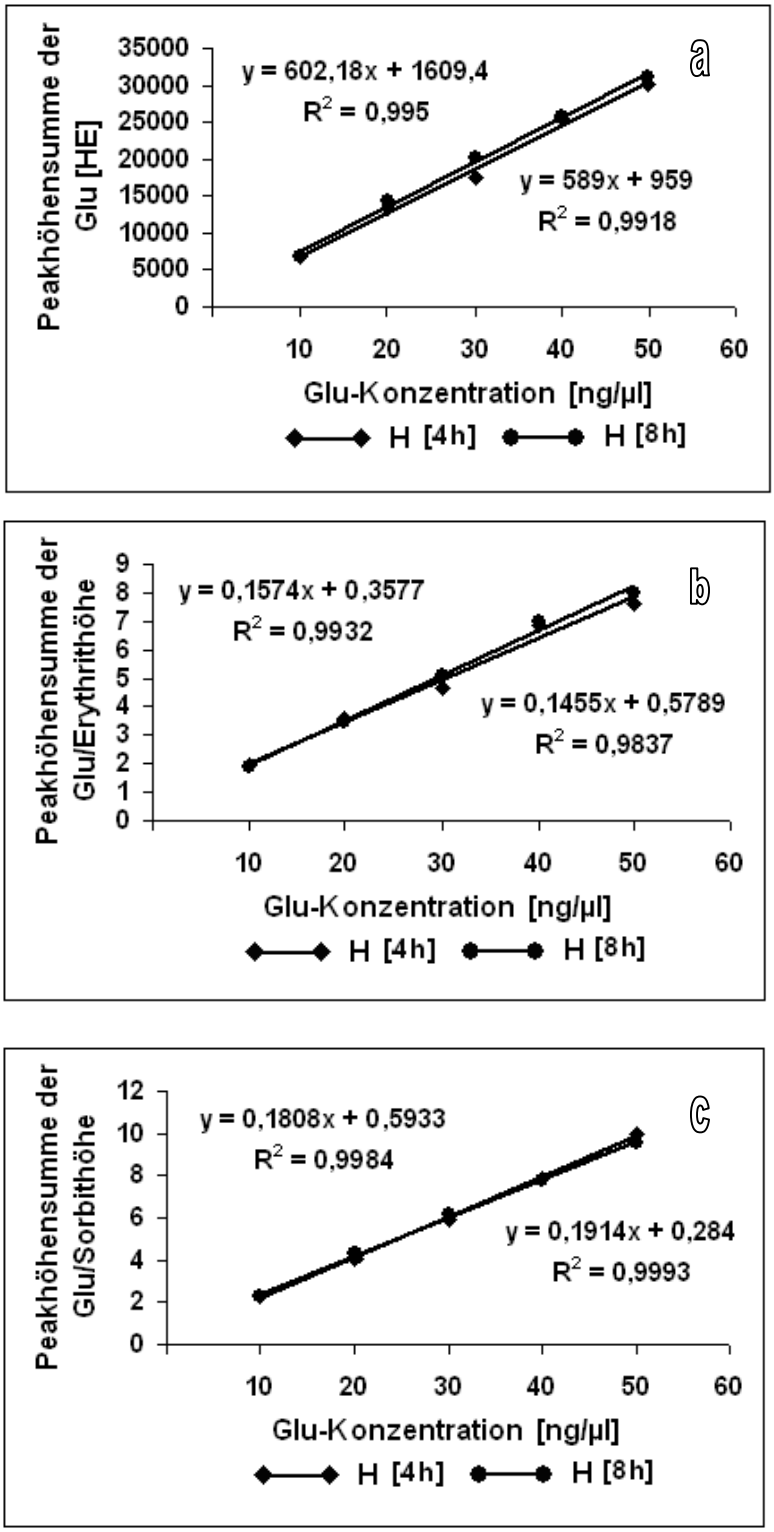
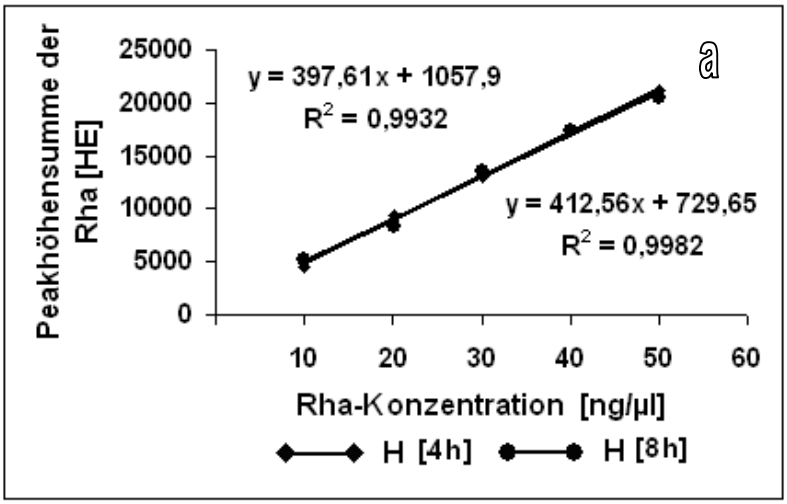
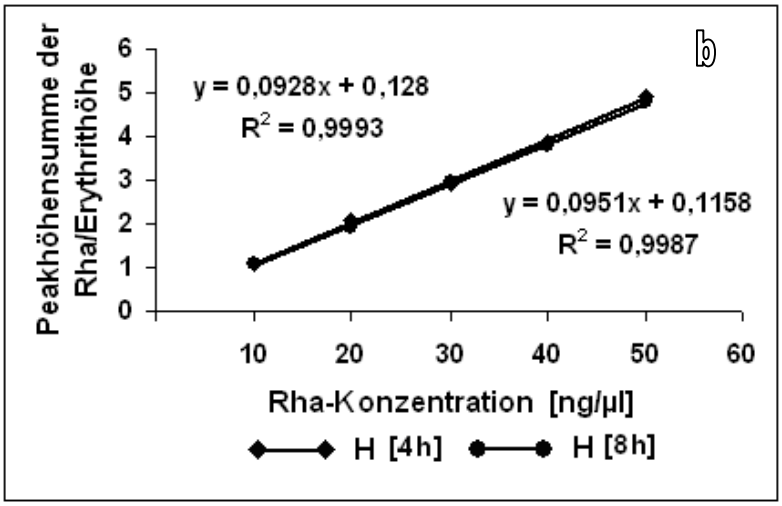


Abbildung 35: Calibriergeraden des Referenzsaccharids Glucose als TMS (Glu) mit vorgeschalteter Hydrolysezeit von H [4h] und H [8h]; die Konzentration ist aufgetragen gegen a) die Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Glu, b) das Verhältnis der Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Glu zu der Peakhöhe der internen Standardsubstanz Erythrit und c) das Verhältnis der Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Glu zu der Peakhöhe der internen Standardsubstanz Sorbit.





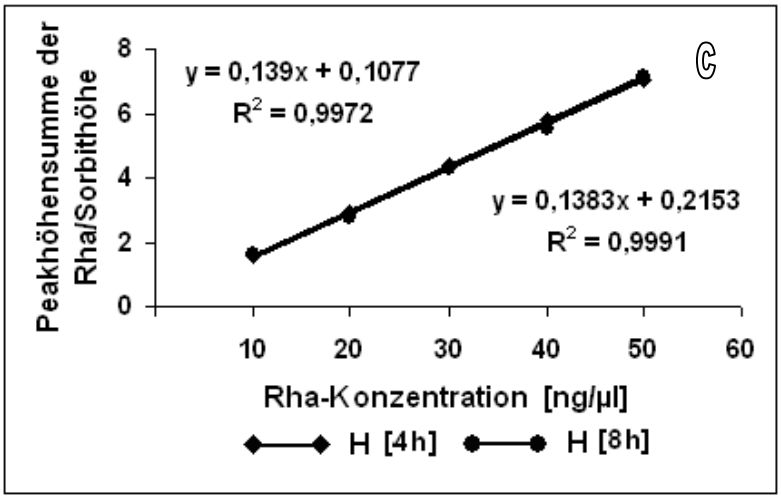


Abbildung 36: Calibriergeraden des Referenzsaccharids Rhamnose als TMS (Rha) mit vorgeschalteter Hydrolysezeit von H [4h] und H [8h]; die Konzentration ist aufgetragen gegen a) die Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Rha, b) das Verhältnis der Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Rha zu der Peakhöhe der internen Standardsubstanz Erythrit und c) das Verhältnis der Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Rha zu der Peakhöhe der internen Standardsubstanz Sorbit.

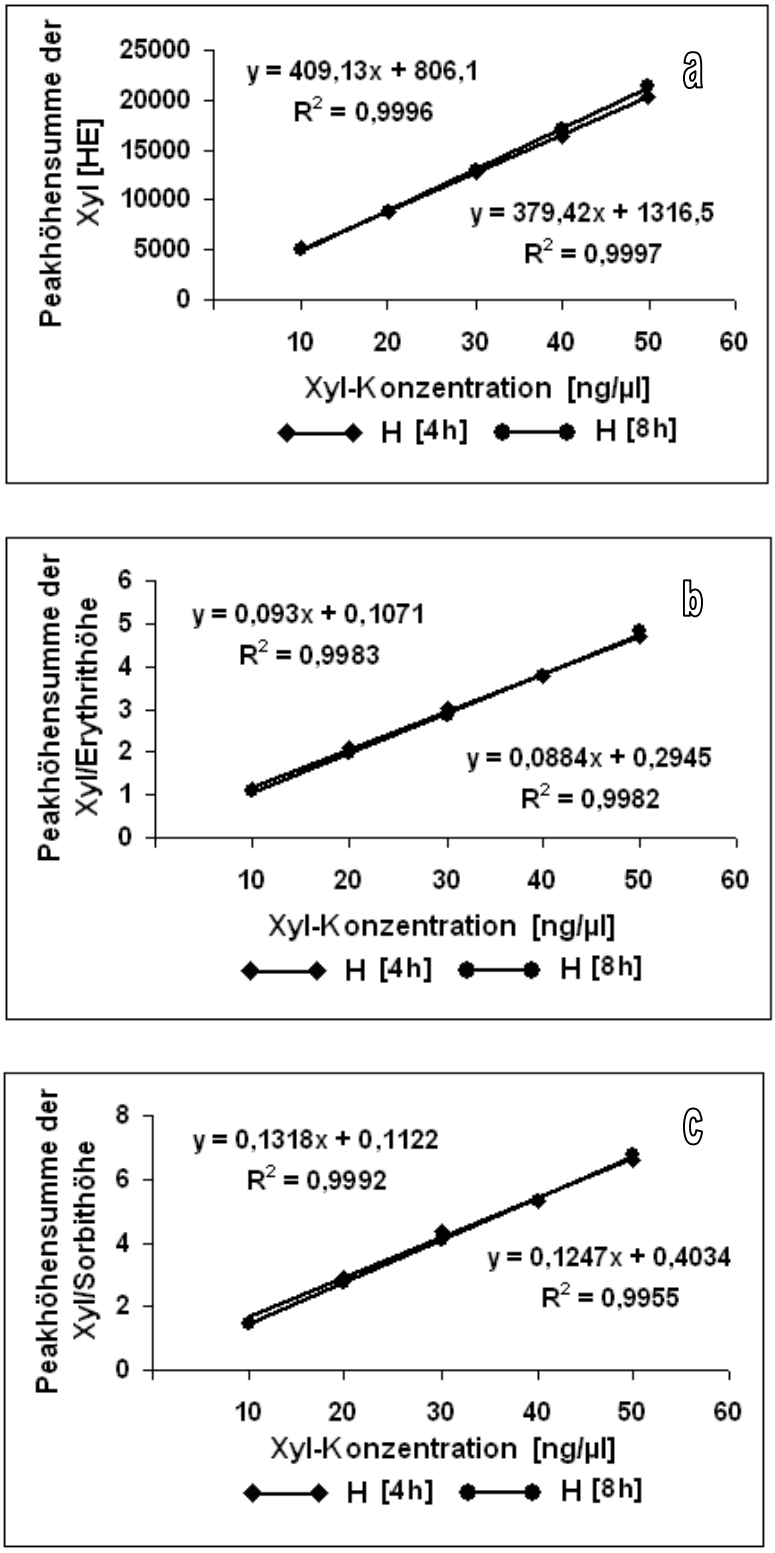


Abbildung 37: Calibriergeraden des Referenzsaccharids Xylose als TMS (Xyl) mit vorgeschalteter Hydrolysezeit von H [4h] und H [8h]; die Konzentration ist aufgetragen gegen a) die Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Xyl, b) das Verhältnis der Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Xyl zu der Peakhöhe der internen Standardsubstanz Erythrit und c) das Verhältnis der Summe der GC-Einzelpeakhöhen von Xyl zu der Peakhöhe der internen Standardsubstanz Sorbit.

8. Danksagung

Für die Überlassung des Themas möchte ich zuallererst Frau Prof. Dr. Gisela Dreyling danken, die mich während der langjährigen Anfangsphase betreut hat. Ihre große Hilfe und Unterstützung hat zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Lieberei danke ich ganz herzlich für die Übernahme der kompetenten Betreuung und der Unterstützung vor allem in der Endphase.

Dankbar bin ich auch Herrn Dr. Helmut Kassner sowohl für die nicht immer ganz so leichte Korrektur des Schriftstückes, als auch für die tatkräftige Unterstützung bei meiner gaschromatographischen Arbeit.

Für die Hilfe im Labor möchte ich Herrn Detlef Böhm und Herrn Thomas Tumforde danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Kai Jensen, der mir das Labor und den Arbeitsraum zur Verfügung gestellt hat.

Frau Claudia Mählmann möchte ich für die Hilfe bei der Chemikalienbestellung danken.

Frau Ulrike Hermes und Frau Andrea Krohn danke ich für die Unterstützung bei der Literaturbeschaffung.

Mein Dank geht auch an meine Kollegin Frau Dr. Annette Sethmann für die Motivationsunterstützung und Freundlichkeit während der schwierigen Phasen meiner Arbeit.

Schließlich möchte ich meiner Familie danken, die mich stets unterstützt hat.

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern Afia und Yakub.