

# Untersuchungen der aktivierten und induzierten chemischen Verteidigung von marinen Makroalgen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena  
von Dipl. Chemikerin (Umweltchemie) Theresa Wiesemeier  
geboren am 08. Januar 1977 in Berlin

Gutachter:

1. Prof. Dr. Georg Pohnert
2. Prof. Dr. Dieter Klemm

Tag der öffentlichen Verteidigung: 11.04.2007

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	Fehler! Textmarke nicht definiert.
1.1	Dynamische Verteidigungsstrategien	3
1.2	Infochemikalien	6
1.2.1	Botenstoffe	6
1.2.2	Biogene Gase	7
1.2.2.1	Dimethylsulfid (DMS) und seine biogenen Quellen	8
1.3	Phytohormone	10
1.4	Versuchsalgen	12
1.4.1	Braunalgen <i>Dictyota</i> spp.	12
1.4.1.1	Vorkommen	12
1.4.1.2	Verteidigungsstrategien von <i>Dictyota</i> spp.	13
1.4.2	Rotalge <i>Gracilaria chilensis</i>	14
<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>18</b>
3.1	Aktivierte chemische Verteidigung von <i>Dictyota</i> spp.	18
3.1.1	Kultivierung	19
3.1.2	Sekundärstoffwechseluntersuchungen	20
3.1.2.1	GC/LC-Analysen	20
3.1.2.2	Flüchtige Substanzen	26
3.1.2.2.1	Closed-Loop-Stripping/Mec-Worm	26
3.1.2.2.2	Festphasenmikroextraktion (SPME)	28
3.1.2.2.2.1	Methodenentwicklung	28
3.1.2.2.2.2	Quantifizierung von TMA und DMS	31
3.1.3	Fütterungsexperimente	34
3.2	Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP)	42
3.2.1	Basisch medierte Spaltung des DMSP in DMS und Acrylsäure	42
3.2.2	Identifizierung und Quantifizierung	43
3.2.2.1	Synthese und Derivatisierung von DMSP und [ <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]-DMSP	43
3.2.2.2	Methodenentwicklung	44
3.2.2.3	Untersuchung von Mikro und Makroalgen auf den DMSP-Gehalt	46
3.2.2.3.1	Extraktionsmethoden	46
3.2.2.3.2	Quantifizierung von DMSP in marinen Mikro- und Makroalgen	48
3.2.3	Fütterungsexperimente	49
3.2.4	Rolle als Verteidigungsmetaboliten	51
3.2.5	Methodenvergleich: SPME und UPLC/UV/MS	53

3.3	Phytohormone	55
3.3.1	Vorkommen und Rolle von Jasmonsäure in <i>D. dichotoma</i>	55
3.3.1.1	Ionenaustausch-Festphasenextraktion	55
3.3.1.2	Induktionsexperimente	56
3.3.1.2.1	<i>D. dichotoma</i>	56
3.3.1.3	Umesterung der Fettsäuren in <i>D. dichotoma</i>	60
3.3.2	Weitere marine Braunalgen	61
3.3.3	Fütterungsexperimente	62
3.4	Rotalge <i>Gracilaria chilensis</i>	64
3.4.1	Verwundungsaktivierte Verteidigung in <i>G. chilensis</i>	64
3.4.2	Einfluss von Lipasen auf die oxolipinvermittelte verwundungsaktivierte Verteidigung	65
3.4.3	Induzierung von chemischer Verteidigung in <i>G. chilensis</i>	69
3.4.3.1	Direkte Inkubation	69
3.4.3.2	Indirekte Inkubation	71
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>73</b>
<b>5</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>79</b>
6.1	Materialien und Geräte	79
6.1.1	Reagenzien	79
6.1.2	Massenspektroskopie	79
6.1.2.1	Gaschromatographie/Massenspektroskopie (GC/MS)	79
6.1.2.2	Flüssigkeitschromatographie/Massenspektroskopie (HPLC/MS bzw. UPLC/MS)	80
6.1.3	NMR	80
6.2	Organismen	80
6.2.1	Makroalgen	80
6.2.2	Mikroalgen	81
6.2.2.1	Flohkrebse	81
6.3	Kulturbedingungen	81
6.3.1	Herstellung vom künstlichen Seewasser	81
6.3.2	Herstellung von Seewasser für Reinkulturen	81
6.3.2.1	nach Maier <sup>[203]</sup>	81
6.3.2.2	SEL	82
6.3.3	Haltung von Makroalgen	83
6.3.4	Haltung von Reinkulturen	83
6.3.5	Haltung der Flohkrebse	83

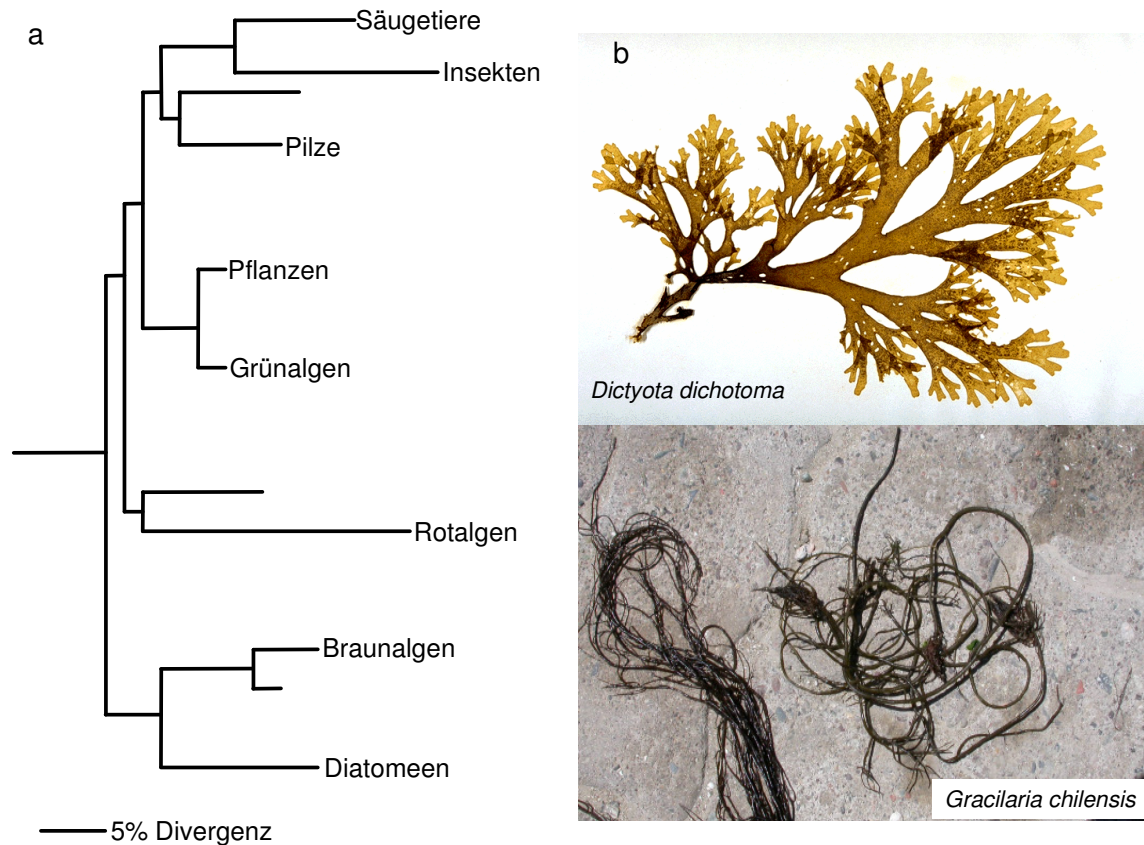
6.4	Profiling von <i>Dictyota</i> spp.	84
6.4.1	GC/LC-Analysen	84
6.4.1.1	Extraktionsmittel	84
6.4.1.2	Extraktionsprotokoll	85
6.4.1.2.1	Laborbedingungen	85
6.4.1.2.2	Clipping-Experimente	85
6.4.1.3	GC/MS Analytik	86
6.4.1.3.1	Derivatisierungsmethoden	86
6.4.1.3.2	GC/MS-Methode	87
6.4.1.3.3	HPLC/MS-Methode	87
6.4.2	Flüchtige Verbindungen	88
6.4.2.1	Closed-Loop-Stripping (CLS)	88
6.4.2.2	Mec Worm	88
6.4.2.3	Festphasenmikroextraktion (SPME)	89
6.4.2.3.1	Extraktionsprotokoll	89
6.4.2.3.2	GC/MS-Analytik	89
6.4.2.3.3	Nachweis von TMA und DMS	90
6.4.2.3.4	Quantifizierung und Linearität	90
6.4.3	SPME-Profiling von Mirko- und Makroalgen	91
6.4.4	Lipidextraktionen	91
6.4.4.1	Umesterung der Fettsäuren	91
6.4.4.2	Analyse von Oxylipinen als Pentafluorbenzyloxime <sup>[208]</sup>	92
6.5	Galaktolipide in <i>G. chilensis</i>	92
6.6	Induktionsexperimente	93
6.6.1	Darstellung von Jasmonsäure aus Methyljasmonat	93
6.6.2	Elizitoren	93
6.6.3	Gasphasenexperimente	94
6.6.4	Inkubationsexperimente	95
6.7	Bestimmung von DMSP in marinen Algen und Seewasser	96
6.7.1	Herstellung des synthetischen DMSP und Derivatisierung	96
6.7.2	Extraktion und Derivatisierung	96
6.7.3	UPLC/MS	97
6.7.4	Linearität und Quantifizierung	97
6.7.5	Stabilität der Derivate	98
6.8	Bioassays	98
6.8.1	Zubereitung des künstlichen Futters	98
6.8.1.1	Flüchtige Komponenten	98

6.8.1.2	DMSP-haltiges Futter	99
6.8.1.3	Induzierte Algenproben	99
6.8.2	Durchführung	100
6.8.2.1	Fütterungsexperimente	100
6.8.2.2	Fütterversuche mit induzierten Algenproben	100
6.9	Proteinuntersuchungen	101
6.9.1	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese <sup>[210]</sup>	101
6.9.2	Proteinprobenvorbereitung von <i>D. dichotoma</i>	101
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>102</b>
	<b>Anhang</b>	<b>118</b>

## 1 Einleitung

Pflanzen bilden ein eigenes Reich innerhalb der Domäne der Eukaryoten (Lebewesen mit Zellkern und Zellmembran), welche fast ausschließlich photoautotroph leben und oft in charakteristischen Gruppen, den so genannten Pflanzengesellschaften auftreten. Als Algen werden im weiteren Sinne im Wasser lebende, eukarotische, pflanzenartige Organismen bezeichnet, die Photosynthese betreiben. Entsprechend der systematischen Klassifikation werden eukarotische Algen in unterschiedliche Klassen eingeteilt: Cryptophyta (Flagellaten), Dinophyta (Dinoflagellaten), Haptophyta, Chrysophyta (z.B. Diatomeen), Rhodophyta (Rotalgen), Chlorophyta (Grünalgen), Phaeophyta (Braunalgen), and Xantophyta (Gelbgrünalgen).<sup>[1]</sup> Algen stellen keine echte Verwandtschaftsgruppe zu den Pflanzen im Sinne der biologischen Evolution und Systematik dar, da sie sich schon früh auf der evolutionären Zeitskala unabhängig von den höheren Pflanzen entwickelt haben. Diese evolutionären Vorgänge spiegeln sich auch im Verwandtschaftsgrad der Algen zu höheren Pflanzen wieder (Abb. 1).<sup>[2]</sup> Er zeigt, dass sich Algen mit Ausnahme der Grünalgen schon ab einem frühen Zeitpunkt im Lauf der Evolution unabhängig von terrestrischen Pflanzen entwickelt haben.

Photoautotrophe Organismen, wie Algen und Pflanzen, haben nicht die Möglichkeit ihren Lebensraum aktiv durch Migration zu verlassen. Daher ist es notwendig, dass sie sich diesem anpassen. Trotz offensichtlicher Unterschiede zwischen den jeweiligen Lebensräumen, müssen sich sowohl Pflanzen als auch Algen unter ähnlichen Umwelteinflüssen behaupten und sich z.B. im Wettkampf um Ressourcen, wie Lebensraum, Nährstoffe und Licht, durchsetzen. Beispielsweise wirken sich wechselnde Lichtverhältnisse oder auch Salzgehalte des Wassers auf das Wachstum und die Struktur der Algengesellschaften im marinen Lebensraum aus.<sup>[3, 4, 5]</sup> Doch auch die Belastungen durch Infektionen und Herbivorie sind in aquatischen und terrestrischen Lebensräumen vergleichbar.<sup>[3]</sup> Um unter diesen Bedingungen erfolgreich zu sein, sind Pflanzen und Algen auf effektive Verteidigungsmechanismen angewiesen. Diese Abwehr muss erfolgen bevor der Organismus irreversibel beschädigt wird, das heißt beispielsweise ehe die Abnahme der Biomasse durch Fraß, die Biomasseproduktion überwiegt.



**Abbildung 1: a) Mittels 18S-rRNA-Analyse ermittelter Verwandtschaftsgrad ausgewählter Abteilungen nach Mc Fadden *et al.*<sup>[2]</sup> b) Abbildung von *Dictyota dichotoma* (Braunalge) und *Gracilaria chilensis* (Rotalge) deren Untersuchung Hauptbestandteil dieser Arbeit ist**  
**Quellen: *D. dichotoma*: <http://research.kahaku.go.jp/botany/seaweeds>; *G. chilensis*: U. Lion, MPI für chemische Ökologie, Jena, Deutschland**

Zur Verteidigung haben Pflanzen und Algen im Laufe der Evolution neben physikalischen Barrieren gegen Infektionen und Herbivorie, wie verstärktes Gewebe an der Außenseite (Wachse) oder Dornen, effiziente chemische Abwehrsysteme entwickelt.<sup>[3, 6, 7, 8, 9]</sup> Wie im terrestrischen Bereich, wo die pflanzlichen Sekundärmetaboliten und ihre Wirkungsweise in der chemischen Verteidigung gegen Herbivore und Pathogene gut untersucht sind, ist schon länger bekannt, dass auch in marinen Algen chemische Abwehrstoffe weit verbreitet sind.<sup>[3, 7, 10]</sup> Aufgrund ihrer Gemeinsamkeiten könnte die chemische Verteidigung in aquatischen Algen in Analogie zu terrestrischen Pflanzen erfolgen, jedoch ist aufgrund ihrer unterschiedlichen Lebensräume und evolutiven Entwicklung auch die Ausbildung verschiedener Strategien denkbar. Da die Bildung von physikalischen Abwehrmechanismen, aber auch die Produktion von chemischen Verteidigungsmetaboliten immer Ressourcen benötigt und verbraucht, die daraufhin nicht mehr in das Wachstum und die Fortpflanzung investiert werden können, ist die



fortwährende Verteidigung eines Organismus gegen Herbivorie oder Pathogene mit ökologischen Kosten verbunden.<sup>[9, 11]</sup> Sekundärmetaboliten können verschiedene Funktionen in marinen Algen haben.<sup>[12]</sup> Sie können direkt abschreckend auf Fraßfeinde wirken, das Ansiedeln anderer Algen verhindern oder durch Kaskadeneffekte Einfluss auf das gesamte Ökosystem nehmen.<sup>[13]</sup> Sie haben damit einen wichtigen direkten und indirekten Einfluss auf die Wechselbeziehung zwischen Algen und ihren Fraßfeinden, sowie auf die gesamte marine Lebensgemeinschaft.<sup>[3, 7]</sup>

## 1.1 Dynamische Verteidigungsstrategien

Es gibt bei Pflanzen und Algen statische und dynamische Verteidigungsstrategien. Die statische konstitutive Verteidigung erfolgt durch Metaboliten, die permanent im Organismus gespeichert sind oder an dessen Oberfläche angereichert vorliegen. Zahlreiche konstitutive Verteidigungsmetaboliten von marinen Makroalgen sind identifiziert. Viele von ihnen zeigen, vergleichbar zu denen aus höheren Pflanzen, eine abwehrende Wirkung auf Fraßfeinde, sind in der Lage den Bewuchs durch andere Algen zu verhindern oder den Angriff durch Pathogene zu unterdrücken.<sup>[7, 13, 14, 15]</sup>

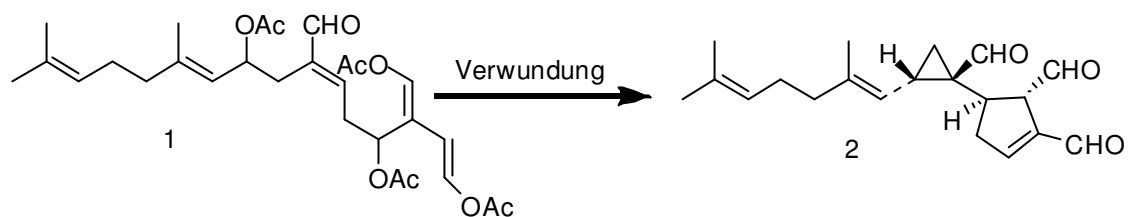
Bei den dynamischen Verteidigungsstrategien wird zwischen der induzierten und einer aktivierten Verteidigung unterschieden. Die dynamische Strategie der induzierten Verteidigung beinhaltet die Produktion der Verteidigungsmetaboliten erst nach der Detektierung von Fraßfeinden oder Pathogenen durch deren Signale. Erst nach der Signalrezeption erfolgt die *de novo*-Synthese durch hormonell gesteuerte Prozesse.<sup>[16, 17, 18, 19]</sup> Bei der aktivierten Verteidigung werden gespeicherte, wenig aggressive Metaboliten direkt nach der Gewebeerletzung in reaktive Folgeprodukte umgewandelt, die toxisch oder abschreckend auf die Fraßfeinde oder Pathogene wirken.<sup>[20, 21, 22, 23, 24, 25, 26]</sup>

Während bei höheren Pflanzen sehr viel über die konstitutive und die beiden dynamischen Verteidigungsstrategien und deren Mechanismen bekannt ist, gab es bis vor kurzem nur wenige Studien zu dynamischen Verteidigungsstrategien in Algen. Es wurde lange Zeit angenommen, dass sich Algen ausschließlich konstitutiv verteidigen.<sup>[3, 7]</sup>

Die permanente Verfügbarkeit der konstitutiven Verteidigungsmetaboliten bedeutet nicht nur einen hohen stoffwechsel-physiologischen Aufwand, der sich nachhaltig auf die allgemeine Fitness, wie Wachstum und Fortpflanzung, auswirken kann. Auch die Gefahr der Selbsttoxifizierung des Organismus durch eine Anreicherung der Sekundärmetaboliten im Gewebe kann einen Nachteil darstellen. Bei dynamischen Verteidigungsprozessen werden hingegen die Verteidigungsmetaboliten nur im Bedarfsfall gebildet. Bei der aktivierten Verteidigung wird die inaktive Form des Verteidigungsmetaboliten ohne das Risiko der Selbstvergiftung im Organismus gespeichert. Bei der induzierten Verteidigung ist keine Speicherung eines Metaboliten

notwendig. Die Verteidigungsstoffe werden erst als Antwort auf Veränderungen im Umfeld der Pflanzen und Algen neu gebildet.<sup>[19]</sup> Da die dynamischen Verteidigungsstrategien den Nachteil haben, dass sie eine bestimmte Zeit zur Aktivierung benötigen, wäre es von ökologischem Vorteil, wenn diese Art der Verteidigung in Ökosystemen genutzt wird, wo nur zeitweise ein starker Fraßdruck herrscht.<sup>[3]</sup>

Der erste Nachweis einer dynamischen chemischen Reaktion einer Alge auf Verwundung gelang der Gruppe um V. Paul.<sup>[22]</sup> Bei einigen *Halimeda*-Arten wird nach Gewebeverletzung durch Fraßfeinde ein gespeichertes Sesquiterpen (Halimedatetraacetat) vermutlich enzymatisch in das fraßhemmende Halimedatrial umgewandelt (Abb. 2).



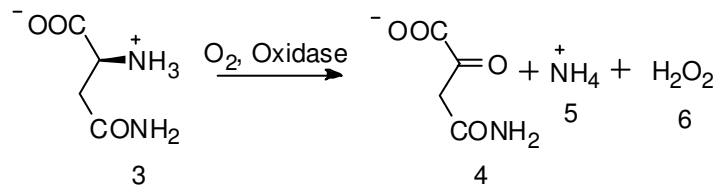
**Abbildung 2: Nach Verwundung wird das gespeicherte Halimedatetraacetat (1) in *Halimeda* spp. vermutlich enzymatisch in das fraßhemmende Halimedatrial (2) umgewandelt.**

Eine Arbeit von Cetrulo und Hay aus dem Jahr 2000 untersucht die Verbreitung der aktivierten chemischen Verteidigung in marinen Makroalgen,<sup>[20]</sup> wobei die Metabolitenzusammensetzung intakter und verwundeter Algen deskriptiv verglichen wurde. Parallel dazu durchgeführte Bioassays ließen auf eine aktivierte Verteidigung zahlreicher Algen schließen, deren zugrunde liegenden chemischen Mechanismen wurden jedoch nicht aufgeklärt.

Eine induzierte chemische Verteidigung konnte bei Braunalgen festgestellt werden. Phlorotannine werden als Verteidigungsmetaboliten der Algen angesehen und spielen auch im Heilungsprozess von marinen Braunalgen eine Rolle.<sup>[27]</sup> Da die Bildung von Phlorotanninen in *Ascophyllum nodosum* durch Herbivore induziert werden kann, liegt hier eine dynamische chemische Verteidigungsstrategie vor.<sup>[23]</sup>

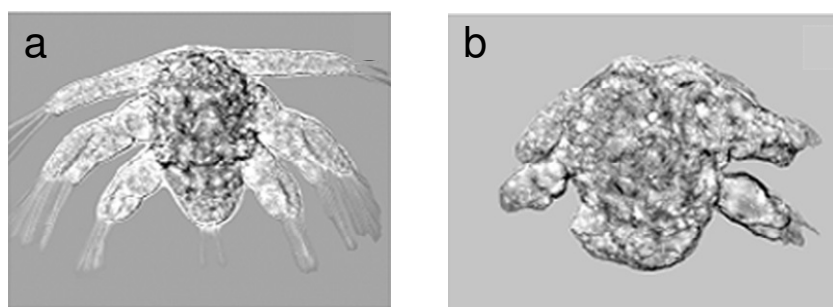
Ein relativ gut verstandenes Beispiel für die Interaktion zwischen Alge und Pathogen über eine induzierte chemische Verteidigung ist die Rotalge *Chondrus crispus*, die von der Grünalge *Acrochaete operculata* parasitiert wird.<sup>[15, 28, 29, 30, 31]</sup> Die Rotalge kann den Angriff der Grünalge während ihrer gametophytischen Entwicklungsphase abwehren.<sup>[28]</sup> Bei Penetration der Rotalge werden ihre Karragenane durch die Grünalge in Oligokarragenane gespalten und induzieren die Freisetzung von L-Asparagin (3) durch den Parasiten. Diese freie Aminosäure wird durch Oxygenasen in *C. crispus* spezifisch zu

$\text{H}_2\text{O}_2$ , Ammoniak (5) und einer Carbonylverbindung (Succinaminsäure) (4) umgewandelt. Die Freisetzung von Wasserstoffperoxyd (6) durch eine Aminosäureoxidase ist die erste Abwehrreaktion der Rotalge *C. crispus* (Abb. 3), gefolgt von einer langfristigen Hochregulierung chemischer Verteidigungsmetaboliten. Die Rotalge reagiert zwar selbst auf das Wasserstoffperoxyd (6) empfindlich und es wird nicht nur die Grünalge durch das  $\text{H}_2\text{O}_2$  abgetötet, sondern durch lokale Nekrosen auch eine weitere Parasitisierung verhindert.<sup>[8, 15]</sup>



**Abbildung 3: Freisetzung von Wasserstoffperoxyd durch eine Aminosäureoxidase ist die erste Reaktion in der Verteidigung der Rotalge *C. crispus* gegen die Besiedelung der Grünalge *A. operculata*.**<sup>[15]</sup>

Neben Beispielen für dynamische Verteidigungsstrategien in marinen Makroalgen gibt es ebenfalls in Mikroalgen aktivierte chemische Verteidigungsstrategien. Diatomeen (Kieselalgen) stehen als Primärproduzenten am Anfang der Nahrungskette und gehören zum Phytoplankton, das autotroph lebt. Obwohl sie als gute Nährstoffquelle für Zooplankton (beispielsweise Copepoden = Ruderfußkrebse) angesehen werden, zeigten Studien,<sup>[32, 33]</sup> dass der Fortpflanzungserfolg von Copepoden herabgesetzt wird, wenn diese auf einer diatomeenreichen Diät fressen (Abb. 4).<sup>[34, 35]</sup>



**Abbildung 4: Auswirkungen der Verfütterung mit einer PUA-produzierenden Diatomeenart auf die Nachkommen fruchtbarer Copepodenweibchen (b) im Vergleich zur Kontrolldiät (a).** Fotos nach Ianora et al. 2004<sup>[34]</sup>

Für die Beeinträchtigungen des Fortpflanzungserfolges wurden ungesättigte Aldehyde (PUA) verantwortlich gemacht, die ausschließlich nach Verwundung von Mikroalgen, wie z.B. *Skeletonema costatum* und *Thalassiosira rotula*, produziert werden.<sup>[36, 37, 38, 39, 40]</sup> Nach

Zellverletzung werden zunächst mehrfach ungesättigte Fettsäuren freigesetzt und dann durch eine Lipoxygenase vermittelte Enzymkaskade in mehrfach ungesättigte Aldehyde umgesetzt.<sup>[35, 36, 41]</sup> Diese Verteidigungsmetaboliten sind für die Fraßfeinde zwar selbst nicht toxisch, wohl aber schädigen sie die sich entwickelnden Eier und Embryonen.<sup>[34, 35, 37]</sup> Die oben aufgeführten Beispiele dynamischer Verteidigungsstrategien mariner Mikro- und Makroalgen zeigen, dass neben den höheren Pflanzen auch marine Algen komplexe chemische Verteidigungsstrategien entwickelt haben, um sich gegen äußere Umwelteinflüsse, wie Infektionen und Herbivorie, zu wehren.

## 1.2 Infochemikalien

### 1.2.1 Botenstoffe

Infochemikalien sind bioaktive Naturstoffe, die als Signal-, Erkennungs-, Abwehr-, Hemm- und Giftstoffe eine wichtige Rolle in den Ökosystemen spielen können.<sup>[42]</sup> Es sind häufig chemische Produkte des sekundären Stoffwechsels, die der biochemischen Kommunikation dienen. Dabei wirken chemische Signale zwischen Individuen derselben Art (*intraspezifisch*) oder verschiedener Arten (*interspezifisch*). Bei den interspezifischen Signalstoffen unterscheidet man Allomone (nur für den produzierenden Organismus vorteilhaft) und Kairomone (nur für den aufnehmenden Organismus nützlich); Pheromone hingegen sind Signalstoffe zwischen Individuen einer Art (Abb. 5).

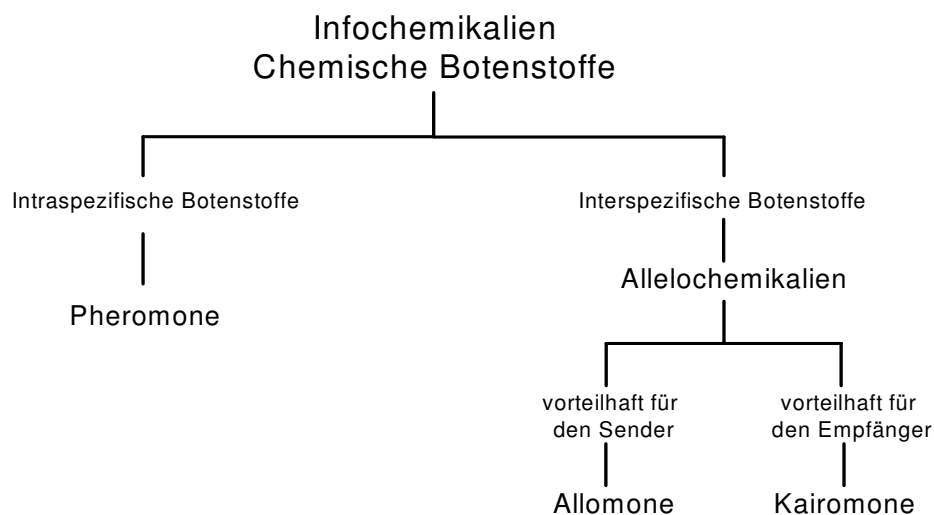


Abbildung 5: Kategorisierung von Infochemikalien.

Zahlreiche Beispiele beschreiben die Rolle von spezifischen Infochemikalien in terrestrischen und aquatischen Ökosystemen, aber die chemischen Strukturen und die Wirkmechanismen sind vielfältig und oft nicht ganz verstanden.

Hochflüchtige Stoffe haben ausgezeichnete Eigenschaften, um als Infochemikalien über größere Distanzen wirken zu können. Diese Botenstoffe interagieren zusätzlich zu ihrer Rolle in den bitrophischen Interaktionen (z.B. Pflanze vs. Herbivor), auch zwischen Pflanzen, Herbivoren und Karnivoren. Solche tritrophischen Systeme werden durch flüchtige Infochemikalien in terrestrischen Pflanzen vermittelt. Beispielsweise durch das Anlocken von karnivoren Insekten oder Schlupfwespen durch flüchtige Komponenten, die die angegriffene Pflanze aussendet.<sup>[43, 44, 45, 46]</sup> Da die Produktion dieser Infochemikalien in solch tritrophischen Wechselbeziehungen keinen direkten Einfluss auf die Herbivoren haben, spricht man hier von einer indirekten Verteidigung.<sup>[47, 48]</sup> Kessler und Baldwin<sup>[49]</sup> konnten zeigen, dass die induzierte Freisetzung von flüchtigen Substanzen durch Herbivorie in *Nicotiana attenuata* den Fraßdruck bei Feldversuchen um mehr als 90 % senkten.

Obwohl es vorstellbar ist, dass solche tritrophischen Wechselbeziehungen auch in der marinen Umgebung vorkommen, ist ihre Rolle in der biochemischen Kommunikation weitgehend unbekannt.<sup>[50]</sup> In marinen Organismen konnten tritrophische Wechselbeziehungen bisher nur bei Sequestrierung (Aufnahme und biosynthetische Umwandlung) von nichtflüchtigen giftigen Komponenten aus der Nahrung durch Schnecken<sup>[51]</sup> und Krabben<sup>[52]</sup> nachgewiesen werden. Sich im Wachstum befindende Krabben der Gattung *Libinia dubia* sind bekannt dafür, dass sie sich mit Algen tarnen. Findet dabei die chemisch verteidigte Braunalge *Dictyota menstrualis* Verwendung, wird der Fraßdruck durch potentielle Prädatoren, wie omnivore Fische, vermindert, da diese die Braunalge meiden.<sup>[52]</sup>

### 1.2.2 Biogene Gase

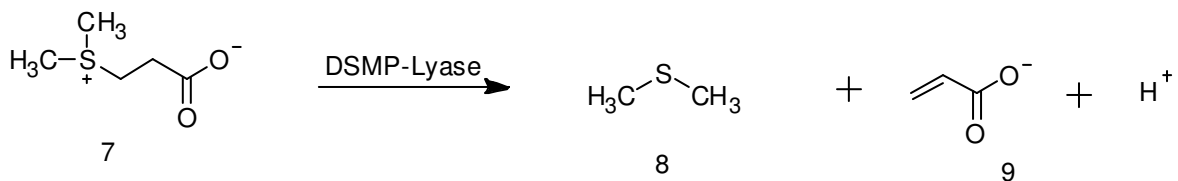
Biogene Gase, wie flüchtige Kohlenwasserstoffe (NMHCs), organische Halogenide, Ammoniak, Amine und auch Dimethylsulfid, werden von einer Vielzahl mariner Mikro- und Makroalgen produziert.<sup>[48, 53, 54, 55, 56]</sup> In den letzten Jahren wurde die Rolle dieser Gase in der chemischen Verteidigung untersucht.<sup>[26, 57, 58]</sup> Studien zeigen, dass die Freisetzung von NMHCs mit der Biomasse von Algen korrelieren.<sup>[59]</sup> Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass marine Algen eine Quelle für Isopren und Ethen sind.<sup>[60, 61]</sup> Letzteres ist zwar eine bekannte gasförmige Infochemikalie in höheren Pflanzen,<sup>[62]</sup> doch ihre ökologische Rolle in marinen Algen ist nicht geklärt. Duque et al. konnten eine erhöhte Freisetzung flüchtiger niedrigmolekularer Komponenten, wie Dimethylsulfid (DMS), Methylisocyanid und

Methylisothiocyanat, nach Verwundung des marinen Schwammes *Ircinia felix* nachweisen. Diese flüchtigen Stoffe haben eine antimikrobielle Aktivität.<sup>[63]</sup>

Flüchtige Amine in der Atmosphäre werden hauptsächlich durch Biodegradation organischen Stickstoffs in Proteinen oder Aminosäuren produziert. Einfache flüchtige Amine treten auch in marinen Mikro- und Makroalgen auf und können einen Einfluss auf die Osmoregulation haben.<sup>[48, 54, 64, 65, 66]</sup> Es wird vermutet, dass Amine eine Rolle in der chemischen Verteidigung spielen können,<sup>[64, 66]</sup> aber bisher gab es keine eindeutigen Beweise dieser Hypothese.

### 1.2.2.1 Dimethylsulfid (DMS) und seine biogenen Quellen

Das in diesem Zusammenhang am intensivsten untersuchte Gas ist DMS. Es gibt beträchtliches Interesse an dieser Schwefelverbindung, da sie in hohen Konzentrationen in der Atmosphäre über den Ozeanen vorkommt (55 bis > 200 nM).<sup>[67, 68, 69]</sup> DMS ist eine der wichtigsten biologischen Quellen des atmosphärischen Schwefels. Die Gesamtemission beträgt 17 - 34 Tg S/Jahr, das entspricht mehr als 90 % der biologischen Schwefelemissionen der Ozeane und ungefähr der Hälfte der totalen biogenen Schwefelemission.<sup>[70]</sup> Ozeane sind somit die wichtigste Quelle für atmosphärischen Schwefel.<sup>[71]</sup> Es handelt sich bei DMS um ein klimarelevantes Gas, da die Oxidationsprodukte Sulfatschwebstoffe bilden, welche wiederum für die Bildung von Wolken verantwortlich sein können.<sup>[72]</sup> Doch auch der Nachweis der Rolle von DMS als Infochemikalie ist bei der Untersuchung des Fraßverhaltens von Copepoden gelungen.<sup>[50]</sup> DMS (8) und Acrylsäure (9) entstehen in erster Linie durch die DMSP-lyase katalysierte enzymatische Spaltung von Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP) (7)) (Abb. 6).<sup>[72, 73, 74]</sup> Die Freisetzung von DMS aus DMSP kann auch basenmediert geschehen.<sup>[72, 75]</sup>



**Abbildung 6: Spaltung von DMSP in DMS und Acrylsäure durch DMSP-lyase.**

DMSP wird als Osmolyt und Antioxidationsmittel vom marinen Phytoplankton, Makroalgen und Unterwasserpflanzen produziert.<sup>[67, 76]</sup> Konzentrationen von DMSP in marinen Makroalgen reichen von 0,04 % bis zu 1,8 % des Feuchtgewichtes.<sup>[26]</sup> Die ursprüngliche Annahme, dass DMSP von Mikro- und Makroalgen lediglich zur Kontrolle des inneren osmotischen Druckes, sowie als Frostschutz produziert wird,<sup>[53, 71]</sup> widerspricht der Tatsache, dass DMSP auch von marinen Organismen aus warmen Gewässern gebildet

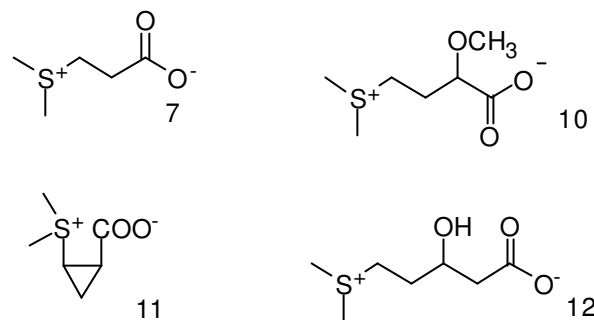
wird. Es kann direkt oder nach Spaltung zu DMS und Acrylsäure bei der chemischen Verteidigung von Mikro- und Makroalgen eine Rolle spielen.<sup>[26, 55, 57, 67, 72, 77]</sup>

Studien zeigen, dass die Freisetzung von DMS eine Rolle in der aktivierten chemischen Verteidigung spielen kann. So konnte nachgewiesen werden, dass durch den Befraß von Herbivoren DMS freigesetzt wird, was den Fraßdruck dann durch negative Rückkopplung vermindert.<sup>[26, 55, 57, 72, 77, 78]</sup>

DMS und andere biogene Gase stellen auch effektive Infochemikalien für Organismen höherer trophischer Ebenen dar.<sup>[48]</sup> So konnten Nevitt et al.<sup>[79]</sup> nachweisen, dass verschiedene pelagische Seevögel durch DMS angezogen werden, was ein Hinweis darauf ist, dass es sich bei dem flüchtigen DMS um einen Botenstoff handelt.

Trotz des Befundes, dass DMSP direkt für einige marine Organismen ungiftig ist,<sup>[80, 81]</sup> konnten neuere Untersuchungen zeigen, dass DMSP den Fraßdruck auf die Mikroalge *Emiliania huxleyi* vermindert<sup>[58, 78]</sup> oder Infektionen verhindert.<sup>[82]</sup>

Es gibt wenige direkte Methoden, DMSP in wässrigen oder Gewebeproben nachzuweisen und zu quantifizieren. In den meisten Studien erfolgt eine gaschromatographische Identifizierung und Quantifizierung von DMSP indirekt über das gasförmige DMS, das durch die Behandlung der Proben mit starken Basen freigesetzt wird.<sup>[68, 69, 83, 84, 85, 86, 87, 88]</sup> Obwohl davon ausgegangen wird, dass DMS und Acrylsäure hauptsächlich aus der enzymatischen Spaltung von DMSP hervorgehen, kann DMS auch aus anderen biosynthetischen Vorstufen (z.B. 10 – 12 Abb. 7) gebildet werden.<sup>[89, 90, 91]</sup>



**Abbildung 7: Einige natürlich vorkommende Dimethylsulfonium-Verbindungen als mögliche Vorläufer für DMS. Dimethylsulfoniumpropionat (7), 4-(Dimethylsulfonium)-2-butyrat (10), Gonylaurin (11) und Gonyol (12).**

Um DMSP als Haupt-DMS-Quelle in marinen Algen zu validieren und als Vorläufer der verwundungsaktivierten Freisetzung von DMS zu identifizieren, ist allerdings die Entwicklung einer robusten Methode notwendig, die Reihenuntersuchungen ermöglicht.

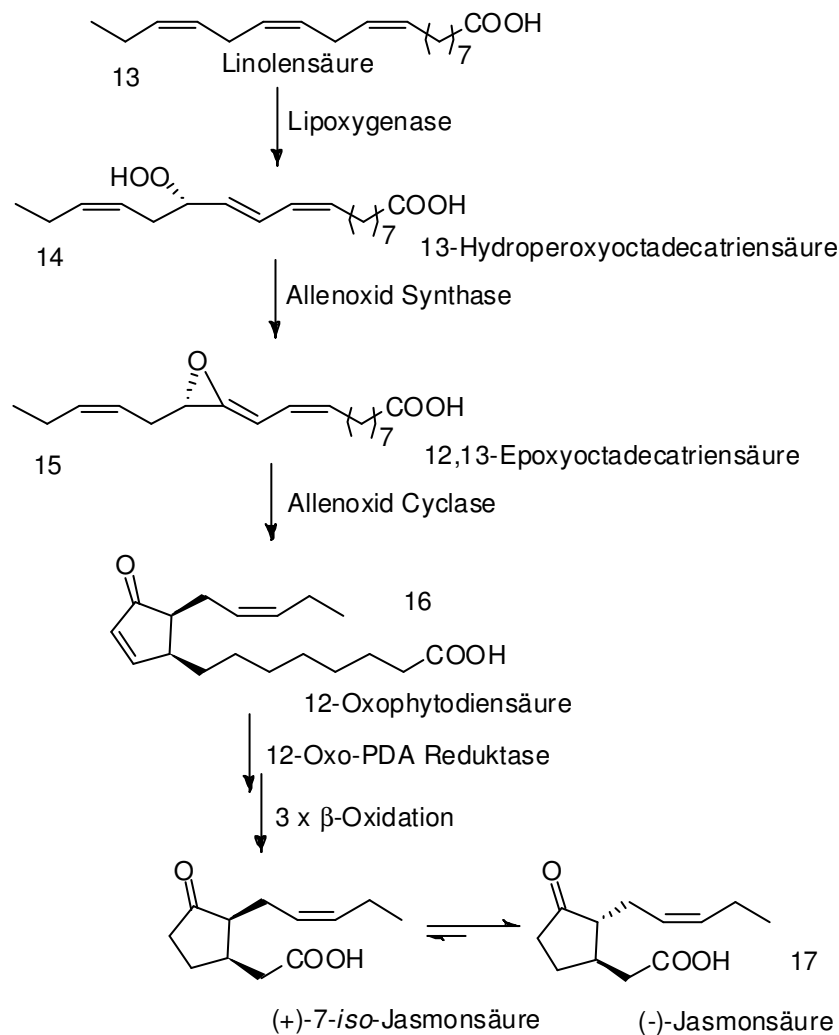
### 1.3 Phytohormone

In vielen Fällen konnte gezeigt werden, dass die Produktion von Sekundärmetaboliten hormoneller Regulation unterliegt. Im Unterschied zu Infochemikalien sind Hormone biochemische Botenstoffe, die innerhalb eines Organismus Informationen übermitteln. Bei Pflanzen werden sie als Phytohormone bezeichnet. Diese Botenstoffe steuern und koordinieren das Wachstum und die Entwicklung der Pflanze und sind schon in sehr niedrigen Konzentrationen physiologisch hoch wirksam. Doch auch in der chemischen Verteidigung spielen sie eine bedeutende Rolle. Sie regulieren und induzieren die indirekte chemische Verteidigung der Pflanze.<sup>[43, 44, 45, 46]</sup> Signalstoffe oder mechanische Reize unterstützen die Produktion von Phytohormonen, welche generell als Verantwortliche für die Koordinierung von Pflanzenreaktionen gesehen werden.<sup>[92]</sup>

Schlüsselrollen spielen die Phytohormone Jasmonsäure (JA), Salizylsäure und Ethylen. Die Produktion dieser Hormone wird in Stresssituationen (mechanische Verwundung, Fraßaktivität von Herbivoren oder durch Pathogene) ausgelöst.<sup>[43, 93, 94]</sup> Das Phytohormon Jasmonsäure (JA), das zunächst als wachstumshemmende Substanz beschrieben wurde,<sup>[95]</sup> hat weitere aktivierende als auch inhibierende Funktionen in physiologischen Prozessen. Zum Beispiel fördert es die Samenkeimung<sup>[96]</sup> und die Blütenbildung<sup>[97, 98]</sup> und es beeinflusst die Photosynthese, indem es die Bildung von Pigmenten induziert.<sup>[99]</sup> Neben der Kontrolle von Entwicklungsprozessen in der Pflanze, wurde die Wirkung von JA in der Regulierung von Pflanzenverteidigungsreaktionen gegen verschiedene Stressfaktoren festgestellt.<sup>[100, 101]</sup> In der induzierten Verteidigung gegen Herbivorie ist Jasmonsäure verantwortlich für die Signalübertragung.<sup>[93, 102]</sup> Erhöhte Jasmonsäuregehalte führen zur Aktivierung verteidigungsrelevanter Gene, und damit zur Realisierung verschiedener Verteidigungsreaktionen. Abbildung 8 zeigt die Jasmonsäurebiosynthese nach Vick und Zimmermann.<sup>[103]</sup>

In Pflanzenzellen kann JA (17) auch in den flüchtigen Methylester, Methyljasmonat (MeJA), umgewandelt werden. Dieser kann durch die Blattoberfläche transportiert werden<sup>[104, 105]</sup> und scheint ebenfalls in der Pflanzenkommunikation involviert zu sein.<sup>[19, 106]</sup>





**Abbildung 8: Schema der Jasmonsäurebiosynthese nach Vick und Zimmermann.**<sup>[103]</sup>

Auch in marinen Algen wurden JA (17) und MeJA nachgewiesen.<sup>[107, 108]</sup> Es wird vermutet, dass JA das Wachstum und die Entwicklung der Grünalge *Chlorella vulgaris* beeinflusst.<sup>[109]</sup> Auch können JA und MeJA einen positiven Einfluss auf die Temperaturtoleranz und Infektionen in marinen Organismen haben.<sup>[110]</sup> Aus diesen Studien ergibt sich die Frage, ob JA und Derivate eine universelle Rolle in der induzierten chemischen Verteidigung mariner Algen spielen können.<sup>[29, 111]</sup>

Arnold et al. stellten fest, dass in der Braunalge *Fucus vesiculosus* die Produktion von zu den Phlorotanninen gehörenden polyphenolischen Verteidigungsmetaboliten durch Herbivorie aber auch durch MeJA induziert werden kann.<sup>[111]</sup>

Ebenso wurde der Einfluss von MeJA auf die Wechselbeziehung von Alge/Pathogen untersucht,<sup>[110]</sup> wobei die Behandlung mit MeJA zu einem erhöhten Proteingehalt führt und damit die Entwicklung der bakteriellen Pathogene hemmt. Trotz dieser Beispiele sind meist die Struktur und die Rolle von Phytohormonen in Algen nicht geklärt. Es ist möglich, dass nicht nur Jasmonsäure (17) biologisch aktiv ist, auch die biosynthetischen Vorstufen

können physiologische Funktionen haben. Ausgangsstoff der JA-Biosynthese ist Linolensäure (LEA) (13) (Abb. 8).<sup>[103]</sup> Aber auch das Zwischenprodukt 12-Oxophytodiensäure (OPDA) (16) in der JA-Biosynthese, konnte in höheren Pflanzen als ein JA-unabhängiger Botenstoff identifiziert werden.<sup>[94, 112, 113, 114]</sup>

Die biosynthetischen Vorstufen von Jasmonsäure und anderen von Fettsäurehydroperoxiden abgeleiteten Metaboliten (Oxylipine) sind ungesättigte Fettsäuren, die meist lipidgebunden vorliegen. In marinen Algen ist viel über die Natur der lipidgebundenen Fettsäuren und der Lipide bekannt, wobei die Zusammensetzung als auch die Menge der Lipide variieren.<sup>[115, 116]</sup> In marinen Organismen ist die Kettenlänge und die Zahl der Doppelbindungen lipidgebundener Fettsäuren sehr variabel.<sup>[1]</sup> Während in höheren Pflanzen die beiden C18-Fettsäuren Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure als Hauptvorläufer für Oxylipine dienen,<sup>[117]</sup> werden in Algen überwiegend C18- und/oder C20-Fettsäuren umgesetzt.<sup>[118, 119]</sup> Mit wenigen Ausnahmen setzen Grünalgen bevorzugt C18-Fettsäuren zu Oxylipinen um, während Braunalgen C18- und C20-Fettsäuren umwandeln.<sup>[120]</sup> In den meisten Fällen ist über die hormonelle Funktion von Oxylipinen und die Rolle in der direkten chemischen Verteidigung wenig bekannt und bisher wurde kein grundsätzliches Konzept für ihre biologische Rolle eingeführt.

## 1.4 Versuchsalgen

In dieser Arbeit wurden für die Untersuchung der Ökologie von marinen Makroalgen, die Rotalge *Gracilaria chilensis* und die Braunalge *Dictyota dichotoma* als besonders geeignete Modellorganismen gewählt. Innerhalb der Dictyotales wird neben einer statischen Verteidigungsstrategie eine aktivierte chemische Verteidigung vermutet,<sup>[20]</sup> deren Grundlagen untersucht werden soll. Auch die hormonelle Regulation der Sekundärmetabolitenproduktion, die in der chemischen Verteidigung der Braunalge eine Rolle spielen, steht im Interesse der Untersuchungen.

Die mit Infektionen von *G. chilensis* verbundenen sozioökonomischen Probleme motivierten eine Zusammenarbeit der Universität Católica de Santiago (Chile) mit dem MPI für chemische Ökologie, Deutschland, um die Interaktionen bei Befall der Alge durch Epiphyten eingehender zu untersuchen.

### 1.4.1 Braunalgen *Dictyota* spp.

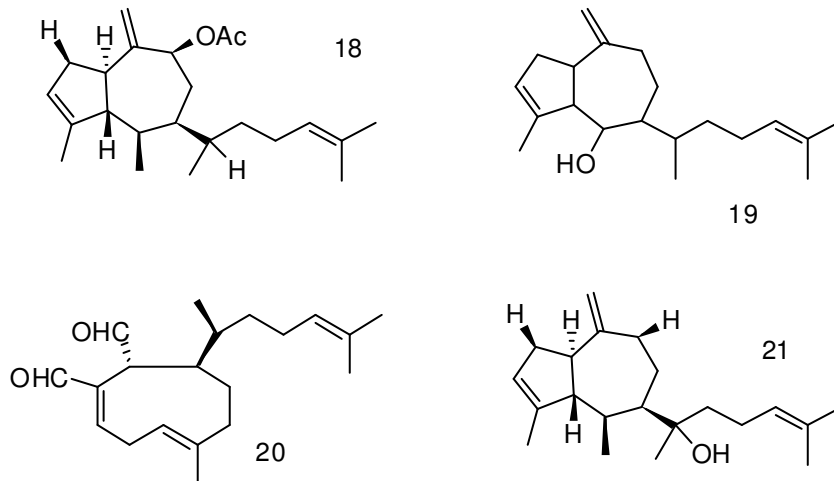
#### 1.4.1.1 Vorkommen

Die Braunalgen *Dictyota* spp. erreichen eine Größe von bis zu 12 cm und ihr dichotom (in zwei gleiche Teile) verzweigter Thallus hat eine Weite von ca. 1 cm mit runden Extremitäten. Diese Makroalgen sind einjährig und hauptsächlich im Sommer zu finden.

*Dictyota* Lamouroux ist eine schwierig zu bestimmende Gattung mariner Braunalgen, da es wenige morphologische und anatomische Unterschiede zwischen den Arten gibt. Diese können auch intraspezifisch stark variieren.<sup>[121]</sup> Früheren Studien zufolge ist *D. dichotoma* im Mittelmeer, Schwarzen Meer, Roten Meer, Indischem und im Pazifischem Ozean, an der europäischen Atlantikküste und dem Nord-Westatlantik zu finden (siehe Referenzen in<sup>[121]</sup>). Bezüglich der Braunalge *Dictyota dichotoma*, wurde früher angenommen, dass es sich hierbei um eine kosmopolitische marine Makroalge handelt, die sowohl in tropischen als auch in gemäßigten Regionen vorkommt. Spätere Studien die sich mit der Koexistenz verschiedener Arten der Dictyotales beschäftigten,<sup>[121, 122, 123, 124, 125, 126, 127]</sup> zeigten nach vergleichenden morphologischen und anatomischen Studien, dass die amerikanischen Dictyotales einer anderen Art (*D. menstrualis*) zugeordnet werden müssen Neben morphologischen Kriterien können auch die in diesen Braunalgen vorkommenden Sekundärmetaboliten, Fettsäuren und Lipide bei der taxonomischen Einordnung helfen.<sup>[123, 124, 125, 126, 127, 128, 129]</sup> Aufgrund solcher chemotaxonomischen Beziehungen wurden die Dictyotales vor Australien und Brasilien ebenfalls der Art *D. menstrualis* zugeordnet.

#### 1.4.1.2 Verteidigungsstrategien von *Dictyota* spp.

Aus marinen Algen der Gattung *Dictyota* konnten viele Diterpene isoliert und als Xenicane, erweiterte Sesquiterpene und Dolabellane identifiziert werden.<sup>[10, 130, 131]</sup> Die Rolle dieser Sekundärmetaboliten in der konstitutiven chemischen Verteidigung der Dictyotales wurde eingehend untersucht.<sup>[52, 122, 132, 133, 134, 135, 136, 137]</sup> Die Terpene, wie Dictyol-B-Acetat (18), Pachydictyol A (19), Dictyodial (20) und Dictyol E (21) (Abb. 9), beeinflussen das Fraßverhalten von Herbivoren negativ.<sup>[122, 133, 134]</sup> Beispielsweise konnten Barbosa *et al.* in der Braunalge *Dictyota pfaffii* zeigen, dass durch den Hauptmetaboliten, 10,18-Diacetoxy-8-hydroxy-2,6-dolabelladien, der Fraßdruck durch Herbivore, wie Seeschnecken und verschiedene Fische, vermindert werden kann.<sup>[135]</sup> Eine weitere physiologische Funktion dieser Substanzen wurde von Schmitt *et al.* identifiziert.<sup>[12]</sup> Pachydictyol A (19) und Dictyol E (21) halten Epiphyten und andere Organismen davon ab, sich auf der Alge anzusiedeln.<sup>[12]</sup> Bei den Terpenen der Dictyotales handelt es sich also um Sekundärmetaboliten, die diese effektiv vor Infektionen, Kompetitoren und Herbivoren schützen können.



**Abbildung 9: Gut untersuchte Terpene der Dictyotales; Dictyol-B-Acetat (18), Pachydictyol A (19), Dictyodial (20) und Dictyol E (21).**

In diesem Zusammenhang wurde auch die induzierte chemische Verteidigung diskutiert. Cronin und Hay konnten zeigen, dass *D. menstrualis*, die unter dem Fraßdruck von Amphipoden standen, im Vergleich zu den unbeschädigten Algen 19 – 34 % mehr der möglichen Verteidigungsmetaboliten enthielten.<sup>[21]</sup> In Fütterungsexperimenten mit der Flohkrebsart *Amphithoe longimana* zeigten Cronin und Hay,<sup>[21]</sup> dass induzierte Thalli bis zu 50 % stärker von den Amphipoden gemieden wurden, was auf eine herbivorenspezifische induzierte Verteidigung der Braunalge hindeuten kann.<sup>[21]</sup>

#### 1.4.2 Rotalge *Gracilaria chilensis*

*G. chilensis* gehört zu den marinen Rotalgen (Rhodophyta), dabei handelt sich um eine mehrjährige Algenart, die meist auf Felsen und Steinen wächst. Die Rotfärbung der Thalli wird durch Phycoerythrin (Phycoerythrobilin) hervorgerufen, und das gleichfalls vorhandene Phycocyanin (Phycocyanobilin) bewirkt einen ins Bläuliche gehenden Farbton. Knorpelige, zylinderförmige, stumpfe purpurrote Wedel, die bis zu 50 cm lang werden können, sind typisch für *G. chilensis*.<sup>[138]</sup>

Die Kultivierung der marinen Rotalge *G. chilensis* (C.J. Bird, McLachlan & E.C. Oliveira) hat in Chile einen hohen ökonomischen Stellenwert, da sie Hydrokolloide für die Agarproduktion liefert. Mehr als 500 Anbaugelände von *G. chilensis* sind an der Küste verteilt und produzieren über 120 000 Tonnen Frischgewicht pro Jahr.<sup>[139]</sup>

Der Befall durch Epiphyten (Aufsitzeralgen) (Abb. 10) führt zu Ertragsrückgang.<sup>[139]</sup> Da die Epiphyten die Rotalge sowohl beschatten als auch Nährstoffe abfangen, führt dieser Befall zu einer starken Beeinträchtigung des Wachstums und zu Biomasseverlusten. Darüber hinaus werden durch erhöhte Verunreinigungen mit artfremden Algen Hydrokolloide mit einem niedrigeren ökonomischen Wert generiert.<sup>[139, 140, 141]</sup>



a) gegen Epiphyten resistente *G. chilensis* b) mit Epiphyten befallene *G. chilensis*

**Abbildung 10: Darstellung einer gegen Epiphyten resistenten *G. chilensis* (a) im Vergleich zu einer mit Epiphyten befallenen *G. chilensis* (b). Foto F. Weinberger, Station de Biologique, Roscoff, Frankreich**

Die Ursachen, die bestimmte Rotalgen vor epiphytisch lebenden Algen schützen, sind bisher kaum verstanden. Die Phänomenologie der Anlagerung, Ansiedlung und Keimung von epiphytischen Algensporen wurden in einer Reihe verschiedener Rotalgen untersucht.<sup>[142, 143]</sup> Die frühen chemischen und biochemischen Prozesse während der Besiedlung der Wirtspflanze sind im Gegensatz dazu bisher meist nicht eindeutig geklärt. Neben den physikalischen Eigenschaften von Oberflächen gibt es eine Vielzahl von Metaboliten in Algen, die eine Besiedlung durch Epiphyten reduzieren.<sup>[144, 145, 146]</sup> Bisherige Studien konzentrieren sich lediglich auf die Aktivität verschiedener *G. chilensis*-Extrakte,<sup>[147]</sup> dabei werden komplexe Wechselwirkungen beim Ansiedlungsprozess kaum diskutiert.

## 2 Aufgabenstellung

Im Laufe der Evolution haben Algen und Pflanzen verschiedene Verteidigungsstrategien, wie die konstitutive, induzierte aber auch aktivierte Verteidigung, entwickelt. Somit können sie im Wettkampf um Ressourcen, gegen Herbivore und Infektionen besser bestehen. Jedoch sind die aktivierten und hormonell regulierten Prozesse bei der Produktion von Abwehrstoffen hier noch weitgehend unbekannt; auch die Art der Signalübertragung ist noch nicht eindeutig geklärt.

Innerhalb der Dictyotales wird neben einer statischen Verteidigungsstrategie eine aktivierte chemische Verteidigung diskutiert,<sup>[20]</sup> deren zugrunde liegenden chemischen Reaktionen hier untersucht werden sollen.

- Zunächst sollte der Vergleich von metabolischen Profilen intakter und verwundeter *D. dichotoma* mit verschiedenen Analysemethoden ohne Fokussierung auf vorher festgelegte Verbindungsklassen darüber Aufschluss geben, welche Stoffwechselprozesse beteiligt sind.
- Die verwundungsaktivierte Freisetzung flüchtiger Substanzen und biogener Gase aus *D. dichotoma* erforderte die Entwicklung einer effektiven GC/MS-basierenden Methode zu deren Identifizierung und Quantifizierung.
- Die durch Verwundung freigesetzten Metaboliten sollten durch Fütterungsexperimente auf ihr chemisches Verteidigungspotential gegenüber Herbivoren untersucht werden.
- Da eine identifizierte flüchtige Komponente durch eine enzymkatalysierte Spaltung von Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP) entsteht, wurde eine direkte Bestimmung dieses Vorläufers notwendig. Es wurde eine LC/MS-basierende Methode entwickelt, um DMSP in marinen Mikro- und Makroalgen zu identifizieren und zu quantifizieren. Daran schlossen sich Untersuchungen an, welche die ökologische Rolle dieser Komponente in der chemischen Verteidigung klären sollte.
- Durch Jasmonsäure (JA) kann die Aktivierung der chemischen Verteidigung in höheren Pflanzen induziert werden. Zur Untersuchung, ob durch JA auch in *D. dichotoma* Verteidigung induziert werden kann, stellte sich zunächst die Frage, ob JA in Dictyotales vorkommt. Des Weiteren sollte die Rolle der JA in der induzierten Verteidigung durch Induktionsexperimente und nachfolgendes metabolisches Profiling auf der Stufe der Sekundärmetabolitenproduktion untersucht werden. Im

Anschluss sollten Bioassays mit induzierter *D. dichotoma* durchgeführt werden, um das chemische Verteidigungspotential behandelter Alge zu untersuchen.

- Die an *D. dichotoma* erarbeiteten Konzepte zur Untersuchung von aktivierten und induzierten Verteidigungsstrategien sollte durch Reihenuntersuchungen von anderen Braunalgen auf ihre Universalität überprüft werden.

Die Rotalge *Gracilaria chilensis* ist die Hauptressource für die Agarproduktion in Chile. Die mit Infektionen durch Epiphyten verbundenen Probleme führten zu Untersuchungen der Interaktionen bei Befall der Alge durch Epiphyten. Die mechanische Verwundung der Rotalge resultiert in einer Freisetzung von Arachidonsäure, 8*R*-Hydroxyeicosatetraensäure (8-HETE) und 7*S*,8*R*-Dihydroxyeicosatetraensäure (7,8-di-HETE), wobei die hydroxylierten Fettsäuren eine Rolle in der chemischen Verteidigung von *G. chilensis* spielen.

- Da die Bildung von 7,8-di-HETE, im Gegensatz zur 8-HETE, nicht durch Phospholipase A kontrolliert wird, sollten andere mögliche Quellen für die Substanz durch LC/MS-basierende Methoden nachgewiesen werden.
- Zur Untersuchung einer induzierten Verteidigung durch bisher noch unbekannte Hormone in *G. chilensis* sollten Inkubationsexperimente durchgeführt werden. Weiterhin sollte eine Methode entwickelt werden, um eine Resistenz der Rotlage gegen Epiphyten zu induzieren.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Aktivierte chemische Verteidigung von *Dictyota* spp.

Eine Arbeit von Cetrulo und Hay aus dem Jahr 2000 untersucht die Verbreitung der aktivierten chemischen Verteidigung in marinen Makroalgen.<sup>[20]</sup> Algen aus tropischen und temperierten Gewässern wurden hinsichtlich der Zusammensetzung ihrer Sekundärmetaboliten vor und nach mechanischer Verwundung und deren Einfluss auf verschiedene Herbivore untersucht. Beim qualitativen dünnschichtchromatographischen Vergleich der Metabolitenzusammensetzung der Extrakte intakter und verwundeter Algen zeigten 14 der 42 untersuchten Arten signifikante Veränderungen. Parallel dazu wurden Bioassays mit der Seeigelart *Lytechinus variegata*, und mit den Fischen *Sparisoma aurifrenatum*, *S. viride* und *Diplodus holbrooki* durchgeführt. Für die Herstellung des Futters wurden die jeweiligen Algenproben intakt extrahiert, beziehungsweise direkt vor der Extraktion mechanisch verwundet. In den Versuchen wurden die Herbivore vor die Wahl zwischen dem Futter mit Extrakten von einer intakten Alge und dem Futter mit Extrakten von mechanisch verwundeten Algenproben derselben Art gestellt. Bei über 70 % der Algenarten konnten Unterschiede im Fraßverhalten der Herbivore auf Futter mit Extrakten der intakten und verwundeten Algen detektiert werden. Sechs Algenspezies wiesen ein erhöhtes Verteidigungspotential nach mechanischer Verwundung auf. Abbildung 11 zeigt, welche Nahrung von dem jeweiligen Herbivor bevorzugt gefressen wurde, wobei signifikante Unterschiede in der Futterwahl rot gekennzeichnet sind.<sup>[20]</sup> Es ist deutlich zu erkennen, dass das künstliche Futter, welches mit Extrakten der intakten Algenprobe von *D. menstrualis* versetzt wurde, signifikant mehr konsumiert wird als das Futter, welches Extrakte der mechanisch verwundeten Alge enthielt. Die zugrunde liegenden chemischen Reaktionen, die die Freisetzung von potentiellen Verteidigungsmetaboliten bewirken, welche für die Veränderungen im Fraßverhalten verantwortlich sind, wurden jedoch nicht aufgeklärt.



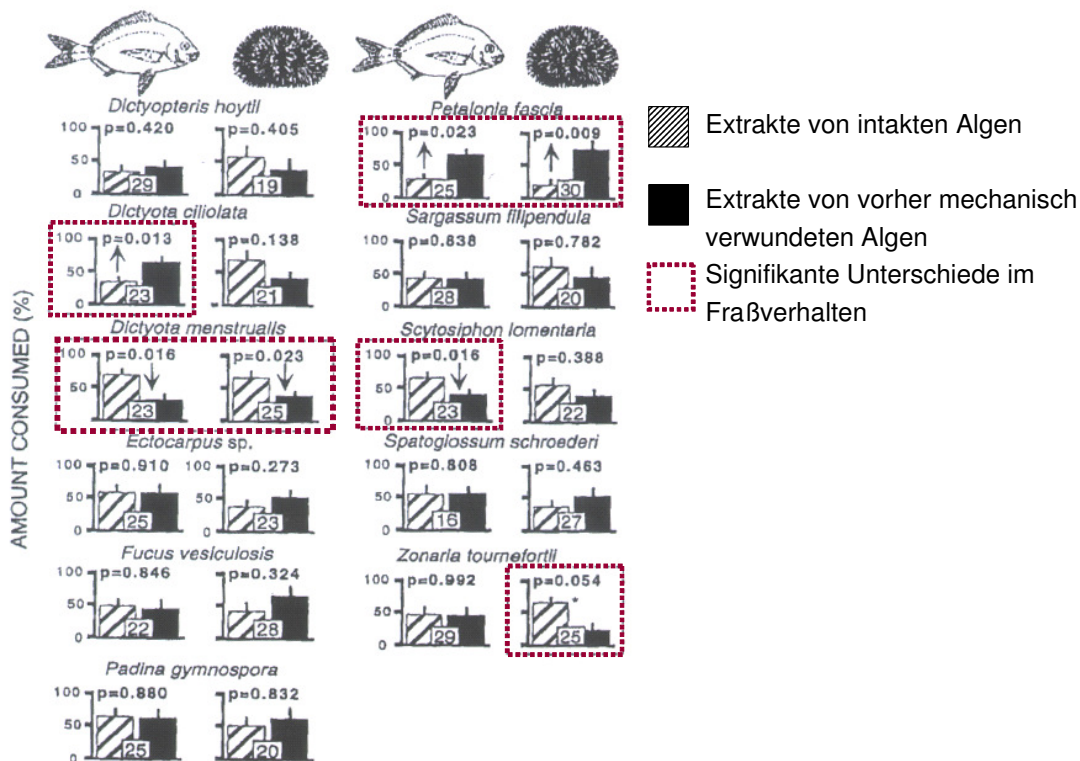


Abbildung 11: Bioassays mit Fischen und Seeigeln als Herbivoren und verschiedenen Braunalgenextrakten von Cetrulo und Hay.<sup>[20]</sup>

Über eine konstitutive Verteidigung der Dictyotales (z.B. Terpene 18 – 21) gibt es zahlreiche Studien.<sup>[132, 133, 134, 135, 136]</sup> Eine aktivierte chemische Verteidigung der Dictyotales muss jedoch nicht nur auf das Vorhandensein dieser oder ähnlich strukturierter Metaboliten basieren, möglicherweise tragen noch andere z.B. nichtterpenoide Substanzen in der Alge zur Erhöhung des chemischen Verteidigungspotentials bei. Aus diesem Grund wurden die Prozesse, welche durch mechanische Verwundung ausgelöst werden, in der Braunalge *D. dichotoma* in der vorliegenden Arbeit durch Vergleich von metabolischen Profilen mit verschiedenen Analysemethoden ohne Fokussierung auf vorher festgelegte Verbindungsklassen untersucht.

### 3.1.1 Kultivierung

Um Untersuchungen an Dictyotales durchführen zu können, ist es notwendig, sie für längere Zeit vor Ort zu halten und damit ausreichend Biomasse für chemische und biochemische Untersuchungen zur Verfügung zu haben. Während des Transportes der Algen von Roscoff, Frankreich, in das Labor in Deutschland durften die Algen nicht allzu

großem Stress ausgesetzt werden, da eine Regeneration der verwundeten *D. dichotoma* nicht möglich war. Daher mussten für den Transport einzelne Thalli in feuchten Zellstoff eingewickelt und in locker gepackten sowie gekühlten Plastikbeuteln verschickt werden. Unter Bedingungen die in Temperatur, Salinität und Lichtverhältnissen ihrem natürlichen Umfeld nachempfunden sind, konnten die so aus Roscoff eingeführten Algen in Aquarien mit künstlichem Seewasser im Labor bis zu einem halben Jahr gehalten werden. Eine Temperatur von 15 °C mit einer Photoperiode 14 h Licht/10 h Dunkelheit erwies sich als erfolgreichste Kulturbedingung. Durch regelmäßige Anreicherung des Mediums mit den Nährstofflösungen 3 und 4 (Kapitel 6.3.2.1) 24 Stunden vor dem Austausch des Mediums wurden die Algen optimal versorgt.

Etwas schwieriger war die Haltung von *D. menstrualis* aus Nordcarolina, USA, die für vergleichende Studien benötigt wurde. Unter der Voraussetzung, dass die Algen intakt im jeweiligen Labor ankamen, konnte die Kultur unter Verwendung der für *D. dichotoma* etablierten Parameter (15 °C, Photoperiode 14 h Licht/10 h Dunkelheit und Nährstoffzugabe 24 Stunden vor dem Austausch des Mediums) für mehrere Wochen stabil gehalten werden. Die Kultivierung dieser Braunalge gelang jedoch nicht über wenige Monate hinaus.

### 3.1.2 Sekundärstoffwechseluntersuchungen

#### 3.1.2.1 GC/LC-Analysen

Das chemische Verteidigungspotential gegenüber Fraßfeinden steigt nach der Gewebeerstörung in verschiedenen *Dictyota* spp..<sup>[20]</sup> Zur Identifizierung der aktivierten Verteidigungsmetaboliten wurden zunächst intensive Untersuchungen zum Sekundärstoffwechsel in der Braunalge *D. dichotoma* durchgeführt, indem die Struktur, das Vorkommen und die Verteilung von Sekundärmetaboliten in Extrakten von intakten Algenproben mit Extrakten von vorher mechanisch verwundeten Thalli verglichen wurden. Die intakten Algenproben wurden zunächst mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, um die enzymatische Aktivität zu unterdrücken, zu einem feinem Pulver zerstoßen und sofort extrahiert. Verschiedene Lösungsmittel wurden als Extraktionsmittel verwendet, um möglichst den gesamten Polaritätsbereich abzudecken. Für gaschromatographische Analysen mit gekoppelter Massenspektroskopie (GC/MS) wurden die organischen Lösungsmittel Ethanol, Chloroform, Dichlormethan und die Extraktionsmethode nach Bligh und Dyer<sup>[148]</sup> bezüglich ihres Extraktionserfolges getestet. Beim Vergleich der metabolischen Profile in den erhaltenen Chromatogrammen konnte festgestellt werden, dass der Extraktionserfolg der Metaboliten in *D. dichotoma* weitgehend unabhängig von dem jeweiligen Lösungsmittel war (Anhang). Bei den flüssigkeitschromatographischen

Analysen (LC/UV/MS) erfolgte die Extraktion mittels Methanol, Methanol/Wasser oder Methanol/Essigsäure (Anhang).

Für Untersuchungen verwundungsaktivierter enzymatisch katalysierter Prozesse in *D. dichotoma* wurden verschiedene Zeitreihen durchgeführt. Die Zeitspanne zwischen dem mechanischen Verwunden der Thalli bis zur weiteren Aufarbeitung des Algenhomogenisates betrug von 2 min bis zu 48 Stunden. Während durch das Schockgefrieren der Thalli mit flüssigem Stickstoff die Enzymaktivität nur reversibel unterdrückt wird, kommt es bei einer Überführung der Alge für zwei Minuten in kochendes Wasser zu einer irreversiblen Enzyminaktivierung. Bei längeren Zeiträumen bis zu 48 h zwischen der mechanischen Verwundung und der Extraktion von *D. dichotoma* wurde die Enzymaktivität in den Kontrollen mit intakter *D. dichotoma* durch Kochen ausgeschaltet. Sowohl die Proben von intakten als auch die verwundeten Algen wurden unter den gleichen Bedingungen extrahiert und analysiert.

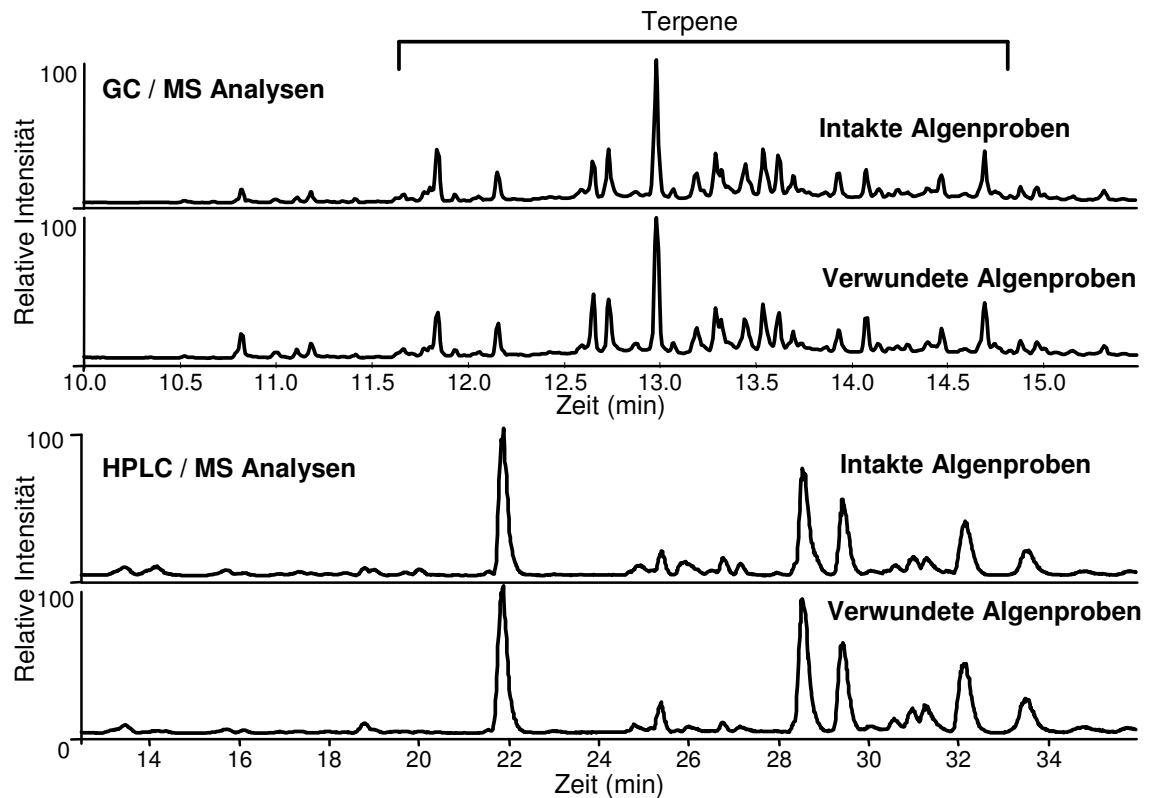
Da eine mechanische Wundreaktion während des Einsammelns oder des Transportes der Algenproben nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden so genannte Clipping- (Verschnitt)-Experimente direkt im Feld durchgeführt. Ca. 20 % der einzelnen Thalli von *D. dichotoma* wurden durch mechanisches Stanzen verwundet. Nach 48 Stunden wurden neben intakten Algenproben auch von der verwundeten *D. dichotoma* ein intakter Teil der Alge vom verwundeten getrennt, jeweils in Aluminiumfolie eingewickelt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um weitere enzymatische Aktivitäten zu unterdrücken.

Zur Untersuchung möglicher Fotoreaktionen im organischen Extrakt nach der mechanischen Verwundung, wurde auch eine Probenreihe in abgedunkelte Probenbehälter überführt.

Des Weiteren wurden Extraktionen intakter und verwundeter Algenproben aus dem Labor von Juni 2003 bis Januar 2004 einmal im Monat durchgeführt, um eventuelle saisonale Schwankungen berücksichtigen zu können. Auch die verschiedenen Kulturbedingungen (Temperatur, Licht und Nährstoffzugabe) für *D. dichotoma* wurden einbezogen.

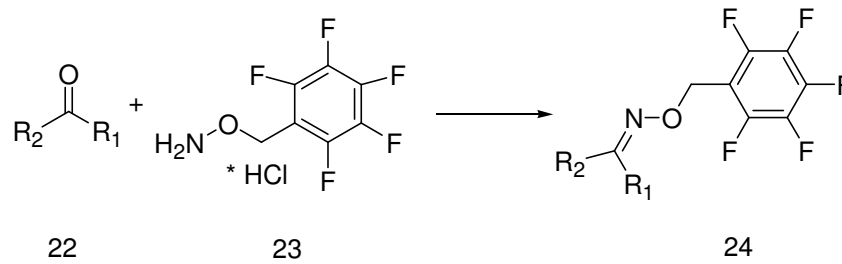
Nach der Extraktion fanden massenspektroskopische Analysen statt, wobei auch verschiedene Ionisierungsarten, wie EI und CI oder auch ESI und APCI, verglichen wurden. Für eine statistische Absicherung wurden folgende Kriterien für die Stoffwechseluntersuchungen intakter und verwundeter Algenproben befolgt. Bei jeder Analyse fand eine dreifache Replikation des Verwundungsprotokolls und der Extraktionen statt. Beim qualitativen und quantitativen Vergleich der Sekundärmetaboliten in Chromatogrammen intakter und mechanisch verwundeter Algenproben wurden alle Peaks größer 5 % miteinbezogen. Die statistische Absicherung der Daten erfolgte über die Berechnung der Standardabweichung.

Abbildung 12 zeigt zwei exemplarische Beispiele für die gaschromatischen als auch flüssigchromatographischen Untersuchungen mit gekoppelter Massenspektroskopie. In den Profilen konnten keine qualitativen oder quantitativen verwundungsaktivierten Veränderungen der Sekundärmetabolitenzusammensetzung von *D. dichotoma* festgestellt werden.



**Abbildung 12: Exemplarisches Beispiel für den Vergleich von GC/MS und HPLC/MS Untersuchungen (ohne Derivatisierung) mit intakten und verwundeten *D. dichotoma* Proben (5 min nach Verwundung, Extraktionsmittel: Dichlormethan).**

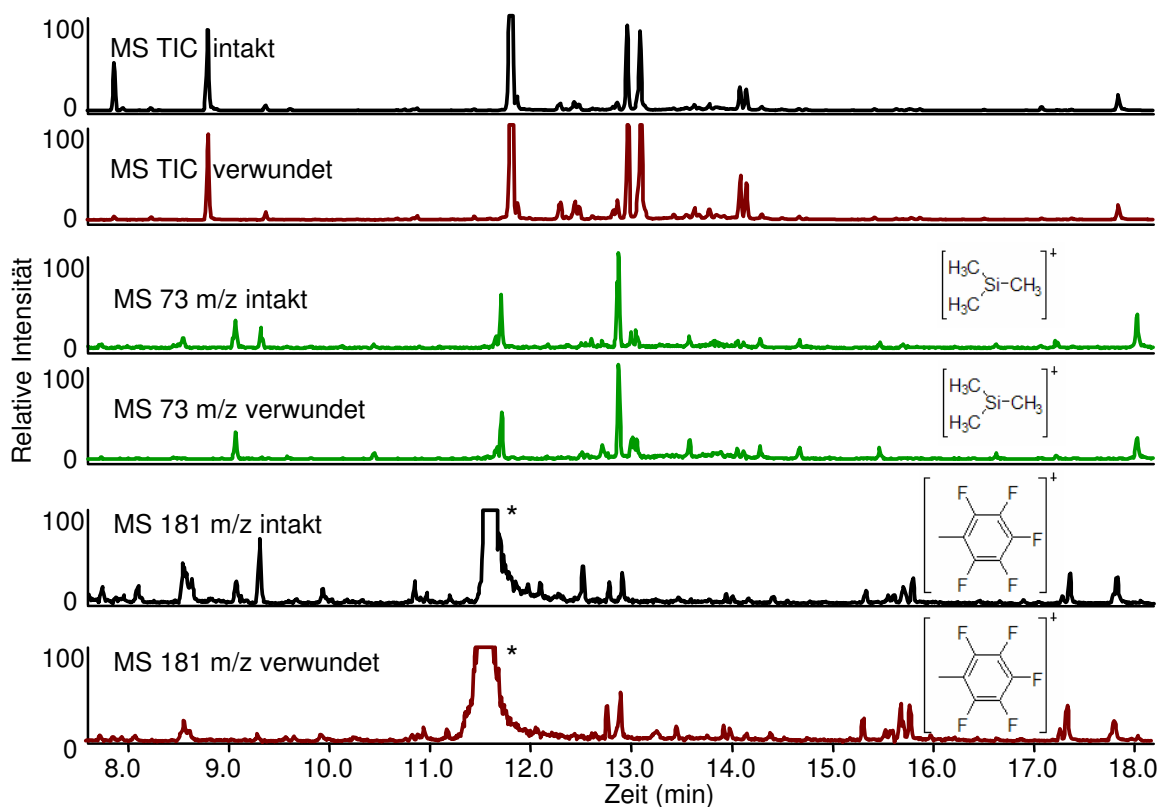
Zusätzlich wurden die Proben zur massenspektroskopischen Untersuchung nach gaschromatographischer Trennung auch mit verschiedenen Derivatisierungsreagenzien behandelt. Dadurch werden bestimmte Sekundärmetabolitengruppen GC-gängig gemacht, aber auch in einigen Fällen die Nachweisgrenzen erhöht. Die Extrakte wurden mit O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminhydrochlorid (PFBHA x HCl) (23), mit N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-2,2,2-trifluoracetamid (MSTFA) und/oder Diazomethan behandelt. Die Derivatisierung von Aldehyden und Ketonen (22) mit PFBHA liefert stabile Oxime (24) (Abb. 13), welche mit GC/MS mit hoher Empfindlichkeit detektiert werden können (Abb. 12).<sup>[149, 150, 151]</sup>



**Abbildung 13: Bildung von PFB-Oximen durch Derivatisierung von Oxogruppen mit PFBHA.**

Das Silylierungsmittel MSTFA derivatisiert unter anderem aliphatische Alkohole, Phenole und Karbonsäuren. Diazomethan wurde eingesetzt, um organische Säuren in die korrespondierenden leichter flüchtigen Methylester zu überführen.

Trotz der Überführung polarer, schwer flüchtiger oder leicht zersetzlicher Substanzen in besser chromatographierbare Derivate konnten keine signifikanten Unterschiede in der Sekundärmetabolitenzusammensetzung zwischen intakter und mechanisch verwundeter *Dictyota* spp. nachgewiesen werden (Abb. 14 und Anhang).

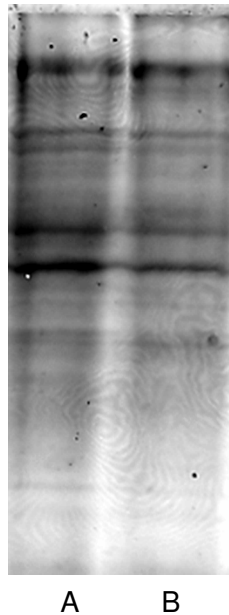


**Abbildung 14: Exemplarisches Beispiel für den Vergleich von derivatisierten GC/MS Proben (PFBHA x HCl (23) und MSTFA) mit intakten und verwundeten *D. dichotoma* Proben (5 min nach Verwundung). Einzelne in den Chromatogrammen beobachtbare Abweichungen sind nicht statistisch reproduzierbar. Das Sternchen kennzeichnet eine Verunreinigung durch das Derivatisierungsreagenz (PFBHA x HCl).**

Zusammenfassend konnte sowohl beim Vergleich von Extrakten intakter und verwundeter *D. dichotoma* als auch bei *D. menstrualis* mittels massenspektroskopischer Untersuchungen festgestellt werden, dass sich die Struktur und der Gehalt der Terpene in den Extrakten, deren Signale über Retentionszeiten und charakteristische Fragmente zugeordnet wurden, nicht durch verwundungsaktivierte Prozesse verändern. Es gibt zahlreiche Studien über den Nachweis und die Identifizierung terpenoider Sekundärmetaboliten der Braunalgen *Dictyota* spp.,<sup>[130, 152, 153, 154, 155, 156]</sup> deren Rolle in der aktivierten chemischen Verteidigung durch die verschiedenen Analysemethoden geklärt werden sollte. Durch mechanische Verwundung kommt es jedoch zu keiner Hochregulierung der durch die verwendeten Analysemethoden erfassten Sekundärmetaboliten. Dies lässt vermuten, dass diese Metaboliten nicht an der aktivierten Verteidigung von Dictyotales beteiligt sind. Terpene der *Dictyota* spp. Braunalgen (18 – 21) können das Fraßverhalten von Herbivoren negativ beeinflussen,<sup>[132, 133, 134, 135, 136]</sup> ihre Produktion und Umsetzung in *D. dichotoma* wird jedoch durch mechanische Verwundung nicht beeinflusst. Bei diesen terpenoiden bekannten fraßhemmenden Substanzen scheint es sich um eine konstitutive chemische Verteidigung zu handeln. Auch die zum Teil reaktiven Aldehyde und Ketone die nicht zwingend terpenoiden Ursprungs sein müssen, werden nicht durch verwundungsaktivierte Vorgänge freigesetzt, wie es von anderen Makroalgen bekannt ist.<sup>[22, 157]</sup> In der Literatur wird auch die verwundungsaktivierte Freisetzung von freien Fettsäuren als Verteidigungsmechanismus diskutiert.<sup>[158]</sup> Der Gehalt dieser Verbindungen und auch der von anderen reaktiven Oxylipinen wird nicht von einer Wundreaktion beeinflusst. Unter Verwendung verschiedener Extraktionsmittel über den gesamten Polaritätsbereich, verschiedener Derivatisierungsreagenzien und verschiedener Zeiten, die für die Antwort auf Verwundung erlaubt wurden, konnte also nicht nachgewiesen werden, dass die Produktion der erfassten Primär- und Sekundärmetaboliten durch mechanische Verwundung der Alge beeinflusst wird.

Da in der Algenmatrix eine Vielzahl an Proteinen vorhanden ist, zu deren Erfassung die hier verwendeten massenspektrometrischen Methoden nicht ausreichen, wurden zur Untersuchung einer möglichen Wundreaktion in *D. dichotoma* proteinspezifische Analysemethoden eingesetzt. Bei der Gelelektrophorese werden die auf das Gel geladenen Peptide und Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Um das Proteinmuster einer intakten Alge zu erhalten, wurden die enzymatischen Aktivitäten durch kurzes Aufkochen vor der Aufarbeitung zerstört, was die Erfassung der in der Alge vorliegenden Proteine vor eventuellen Transformationen durch Wundreaktionen

ermöglichte. Zur Untersuchung der Wundreaktionen in *D. dichotoma* wurde nach dem mechanischen Verwunden der Thalli 10 min und 48 Stunden gewartet, bevor die weitere Aufarbeitung, wie für die intakten Proben, erfolgte.



**Abbildung 15: Repräsentative SDS-Page von Proteinextrakten aus *D. dichotoma*; A: *D. dichotoma* gekocht; B: *D. dichotoma* 10 min nach Verwundung. (48 h-Gel siehe Anhang)**

*D. dichotoma* enthält reaktive Aldehyde, die mit Proteinen aus der Algenmatrix reagieren können.<sup>[159]</sup> Über Naturstoffe, die eine  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Aldehydstruktur besitzen, sind Beispiele zur Reaktion mit Aminen und Proteinen bekannt, aber auch 1,4-ständige *bis*-Aldehyde (wie z.B. 20), können mit Proteinen reagieren.<sup>[157, 160]</sup> Sowohl die Bildung einfacher Addukte von Sekundärmetaboliten an Peptide und Proteine als auch Oligomerisierung und co-Polymerisierung geschieht über nucleophile Aminosäurereste. Im Vergleich der Proteinzusammensetzung von intakten Algen und solchen, die nach der Verwundung extrahiert wurden, zeigten sich jedoch keine Unterschiede im Proteinmuster, weder nach 10 min noch nach 48 h nach Verwundung (Abb. 15). Cimino *et al.* konnten nachweisen, dass die Reaktivität von 1,4-Dialdehyden mit primären Aminen abhängig von der Entfernung der Carbonylgruppe zum Stickstoff der Amine in einem hypothetischen Zwischenprodukt ist.<sup>[161]</sup> Der mittelgroße Ring von (20) sollte zwar eingeschränkt flexible Konformationen erlauben, die zur Adduktbildung führen, doch selbst wenn diese sterische Voraussetzung erfüllt ist, kann die Spannung im Ring eine kovalente Bindung mit den entsprechenden Rezeptor eines Proteins verhindern.<sup>[161]</sup>

### 3.1.2.2 Flüchtige Substanzen

Nach dem Transport, bei Lagerung und nach Verwundung der *D. dichotoma* und *D. menstrualis* Algenproben wurde ein intensiver unangenehmer Geruch wahrgenommen. Dieser wurde mit zunehmender Schädigung und der daraus resultierenden schlechten Verfassung der Algen stärker, was die Vermutung nahe legt, dass bei Stress flüchtige Verbindungen freigesetzt werden. Diese Befunde motivierten Untersuchungen über die Produktion von Gasen als Grundlage für die Verteidigungsstrategie der Alge. Biogene Gase wie Kohlenwasserstoffe, organische Halogene, Ammoniak, Methylamine und DMS werden von einer Vielzahl von marinen Mikro- und Makroalgen produziert.<sup>[53, 54, 55, 77]</sup> Ihre Bedeutung in der chemischen Verteidigung von marinen Organismen wurde in den letzten Jahren untersucht und in verschiedenen Beispielen konnte ein Einfluss von flüchtigen Bestandteilen auf das Abwehrpotential gegen Herbivore nachgewiesen werden.<sup>[57, 58]</sup> Zur Identifizierung und anschließenden Quantifizierung der flüchtigen Bestandteile von *D. dichotoma* wurden verschiedene Methoden erprobt.

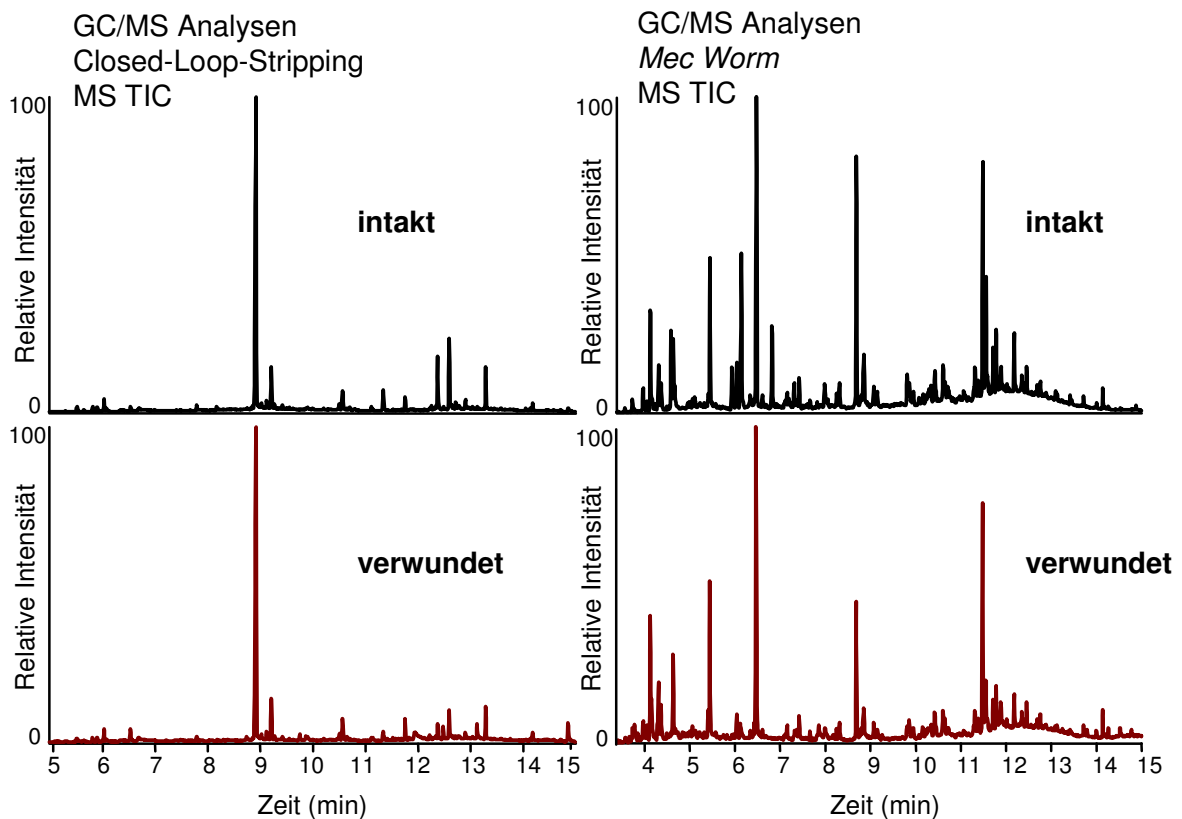
#### 3.1.2.2.1 Closed-Loop-Stripping/Mec-Worm

Zunächst kam zur Untersuchung der flüchtigen Bestandteile ein, auf Grob und Zürcher zurückgehendes, Closed-Loop-Stripping-Verfahren (CLS) zum Einsatz.<sup>[162]</sup> Diese Methode wurde entwickelt, um flüchtige organische Verbindungen (volatile organic compounds VOCs) in Wasserproben zu detektieren und zu bestimmen. Doch auch für Untersuchungen terpenoider und nichtterpenoider leichtflüchtiger Verbindungen in Pflanzenmaterial hat sich diese schonende Extraktionsmethode durchgesetzt.<sup>[163, 164]</sup> In einem geschlossenen Luftkreislauf werden sowohl intakte und vorher mechanisch verwundete Thalli von *D. dichotoma* in künstlichem Seewasser gehalten. Während einer 24stündigen Anreicherungsphase, wird ein mit flüchtigen Verbindungen der Alge beladener Luftstrom durch einen Aktivkohlefilter geleitet, wo die Analyten adsorbiert werden. Anschließend wird der Filter mit Dichlormethan eluiert und das Eluat direkt mit GC/MS analysiert. Diese Methode wurde für intakte und verwundete Algen in Seewasser angewendet.

Da die gewählten Verwundungsprotokolle nicht direkt den Prozess eines langsamen Befraßes durch Herbivore imitiert, wurde eine weitere Methode zur kontinuierlichen Verwundung der Alge erprobt. Mit dem Roboter *Mec Worm*<sup>[165]</sup> kann eine kontinuierliche Verletzung festgelegter Areale der *D. dichotoma* Thalli erreicht werden. Somit wurde ein Angriff durch langsam fressende Fraßfeinde über 48 Stunden auch bezüglich der physikalischen Eigenschaften imitiert. Während der gesamten Laufzeit des Experiments wurden auch hier die flüchtigen Substanzen, welche durch die Verwundung freigesetzt werden, in einem Aktivkohlefilter absorbiert und nach Eluierung mit organischen



Lösungsmitteln massenspektrometrisch untersucht. Es musste während des Experiments in regelmäßigen Abständen frisches Wasser zugegeben werden. Die Untersuchung der intakten Alge fand unter den gleichen Bedingungen bei ausgeschaltetem Gerät statt. Die Extraktionsmethoden und die GC/MS-Analysen gaben jedoch keinen Aufschluss über die nach der mechanischen Verwundung von *D. dichotoma* freigesetzten flüchtigen Substanzen, da auch hier keine Unterschiede in der Verteilung und dem Gehalt der Sekundärmetaboliten festgestellt werden konnten (Abb. 16).



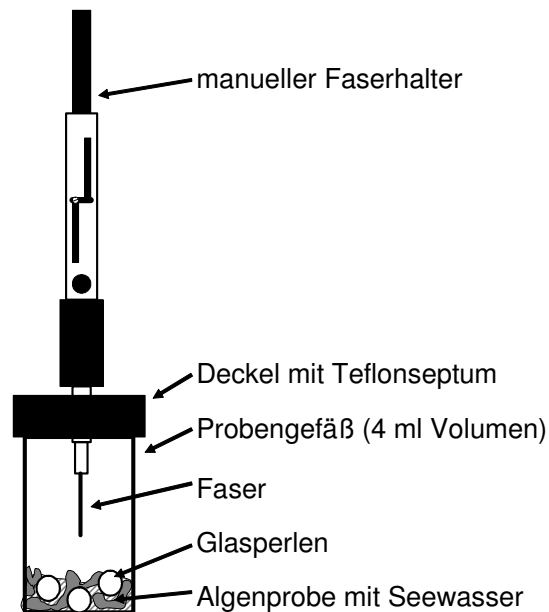
**Abbildung 16: Exemplarisches Beispiel für die Analyse flüchtiger Bestandteile mit GC/MS intakter und verwundeter *D. dichotoma* Proben. Einzelne in den Chromatogrammen beobachtbare Abweichungen sind nicht statistisch reproduzierbar.**

Aufgrund der Eluierung des Aktivkohlefilters mit organischen Lösungsmitteln und deren Totzeit bei den gaschromatographischen Untersuchungen ist die Analyse hochflüchtiger Substanzen nicht möglich, da Gase in der massenspektroskopischen Detektierung am Anfang jeder Messung ausgeblendet werden.

### 3.1.2.2.2 Festphasenmikroextraktion (SPME)

#### 3.1.2.2.2.1 Methodenentwicklung

Für eine direkte lösemittelfreie Methode zur Untersuchung flüchtiger Bestandteile wurde eine auf Festphasenmikroextraktion beruhende Methode entwickelt. SPME (solid phase micro extraction) ist eine schnelle und effiziente Technik, um flüchtige organische Substanzen aus einem breiten Spektrum von Matrizen zu extrahieren und mittels GC/MS zu identifizieren.<sup>[166, 167, 168]</sup> Die Extraktion erfolgt durch eine Polymerschicht, die auf einer Glasfaser aufgebracht ist. Diese Faser ist in die Kanüle einer modifizierten Spritze untergebracht und kann bei Bedarf exponiert werden. Die Desorption der extrahierten flüchtigen Komponenten erfolgt direkt im Injektor eines Gaschromatographen und können durch nachfolgende massenspektroskopische Analysen identifiziert werden. Der Aufbau der Festphasenmikroextraktion ist in Abbildung 17 dargestellt.



**Abbildung 17: Aufbau einer Festphasenmikroextraktion (SPME).**

Diese Extraktionsmethode hat gegenüber dem CLS die Vorteile, dass die Adsorption der Gase durch eine wenige mm lange Faser direkt über der Probe erfolgt. Dadurch kann das Gefäßvolumen klein gewählt werden und es kommt nur zu geringen Verdünnungseffekten. Auch Verunreinigungen durch das Lösungsmittel werden ausgeschlossen und eine massenspektrometrische Detektion ohne Ausblendung der flüchtigen, bei der CLS durch Lösungsmittel überlagerten, Signale ist möglich. Des

Weiteren ist diese Methode apparativ nicht so aufwendig und die Extraktion kann in relativ kurzen Zeitabständen von 20 min erfolgen.

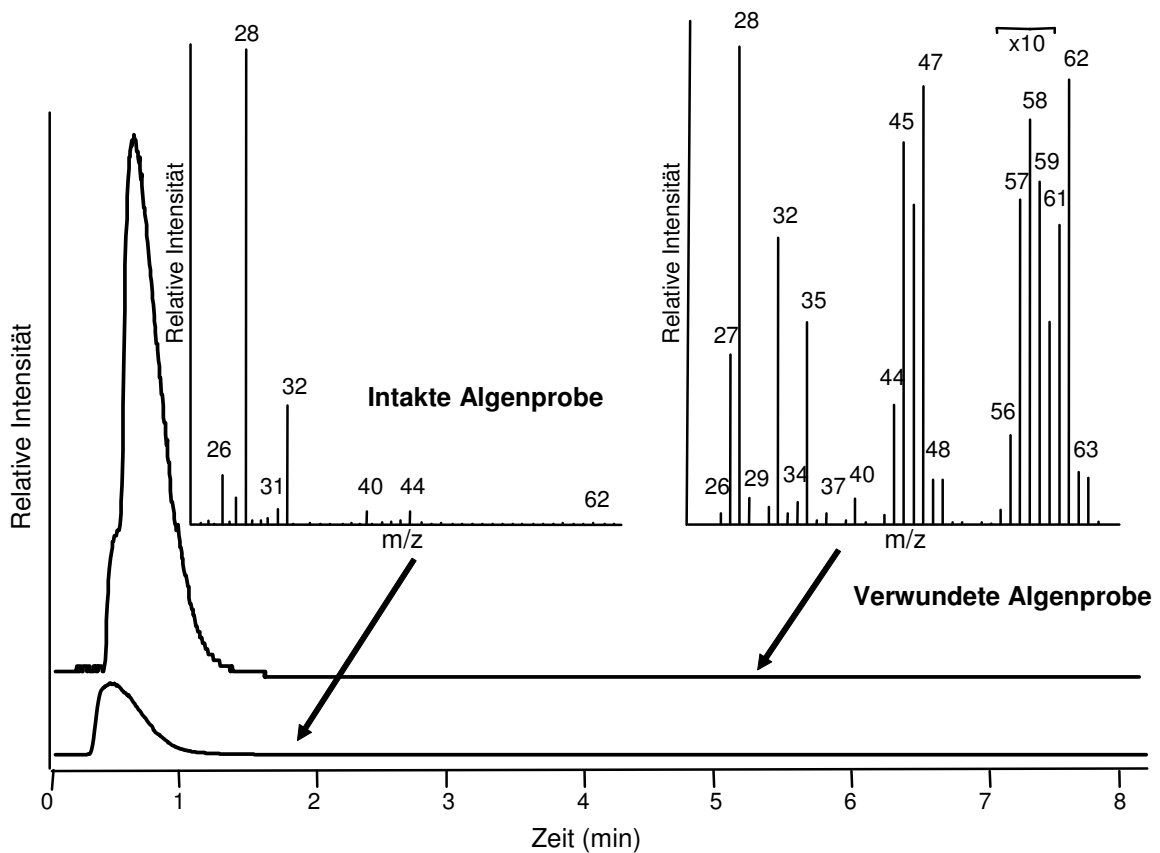
Für die Extraktion zahlreicher Substanzklassen flüchtiger Verbindungen gibt es verschiedene polymere Fasern unterschiedlicher Polarität. Bei der Extraktion von Standards, wie Bromethan, Bromoform, anderen halogenierten flüchtigen Verbindungen, Trimethylamin (TMA) und Triethylamin (TEA), aber auch bei der Extraktion intakter und verwundeter Algenproben wurden folgende Fasern verwendet (Tab. 1).

Anwendungsgebiet	Beschichtungsart
für Gase und niedermolekulare Verbindungen	75 µm Carboxen/Polydimethylsiloxan
für flüchtige Verbindungen	100 µm Polydimethylsiloxan (PDMS)
für unpolare hochmolekulare Verbindungen	7 µm Polydimethylsiloxan
für unpolare mittelflüchtige Verbindungen	30 µm Polydimethylsiloxan
für Alkohole und polare Verbindungen	70 µm Carbowax/Divinylbenzen

**Tabelle 1: Übersicht über Faserbeschichtungen und ihren Einsatz in der Analytik der Algenproben.**

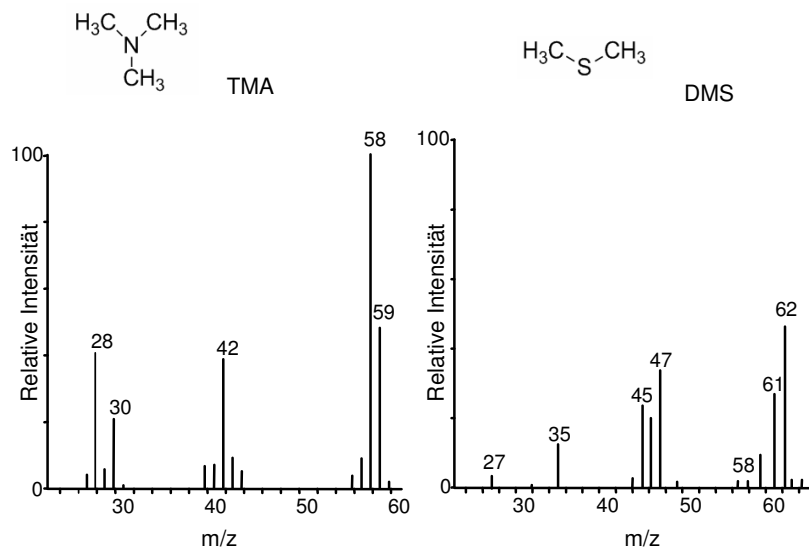
Auch hier konnte mit PDMS-Fasern keine verwundungsaktivierte Freisetzung terpenoider und nichtterpenoider leichtflüchtiger Verbindungen festgestellt werden. Beim Faservergleich konnte mit der Carboxen/Polydimethylsiloxanbeschichtung ein signifikanter Unterschied zwischen intakten und mechanisch verwundeten Algenproben festgestellt werden. Es kam nach Verwundung der Braunalge *D. dichotoma* zu einer erhöhten Freisetzung flüchtiger niedrigmolekularerer Komponenten ( $m/z < 65$ ) (Abb. 18). Herbivorie wurde dabei durch mechanische Verwundung der Thalli simuliert. Bei der Methodenentwicklung konnte festgestellt werden, dass die besten Ergebnisse, unter Verwendung einer SPME-Faser mit ummantelten Carboxen/Polydimethylsiloxan, mit einem Probenvolumen von ca. 200 mg *D. dichotoma* in einem 4-ml-GC-Probengefäß und einer Extraktionsdauer von 20 min bei Raumtemperatur erzielt wurden. Der jeweilige Extraktionserfolg von Standards sowie die Peakschärfe waren entscheidend für dieses Ergebnis. Die Extraktion erfolgte direkt über der Algenprobe in einem geschlossenen System. Damit keine Verluste durch Diffusion der Gase auftreten, wurden die Proben vor dem Verwunden durch vortexen mit Glasperlen mit einem Septum verschlossenen und dann direkt nach Durchstoßen des Septums mit dem Faserhalter untersucht. Abbildung 18 zeigt das Chromatogramm des Extrakts einer intakten im Vergleich zum Extrakt einer

mechanisch verwundeten Alge. Im Massenspektrum ist eine deutliche Erhöhung von Fragmenten  $< 65 m/z$  im verwundeten Extrakt zu finden.



**Abbildung 18:** GC/MS der SPM-Extraktionen von intakten und verwundeten *D. dichotoma* Proben. Die eingefügten Spektren zeigen das zusammengefasste Massenspektrum (0.3 – 1.3 min).

Die durch Verwundung freigesetzten Komponenten sind hoch flüchtig, so dass sie selbst bei 40 °C nicht auf der GC-Säule retendiert werden. Dadurch erfolgt eine Detektierung dieser Komponenten nur als Summe von Substanzgemischen im MS. Bei der Dekonvolution wurde aufgrund ihrer typischen Fragmentationen eine Mischung von Trimethylamin (TMA) und Dimethylsulfid (DMS) in den Extrakten der verwundeten *D. dichotoma* Proben identifiziert (Abb. 19).



**Abbildung 19: Fragmentierungsmuster von TMA und DMS im MS.**

Diese Messungen zeigten auch, dass keine interferierenden Signale bei  $m/z = 59$  und  $m/z = 62$  beobachtet werden, was die Quantifizierung anhand dieser Ionen erlaubt. Untermauert wurde diese Annahme durch hochaufgelöste Massenspektren (TMA gemessen:  $59,0732 m/z$ , berechnet:  $59,0735 m/z$ ; DMS gemessen:  $62,0189 m/z$ , berechnet:  $62,0190 m/z$ ). Während in den intakten Proben kaum oder nur Spuren dieser flüchtigen Substanzen zu finden waren, konnte reproduzierbar eine eindeutig erhöhte Freisetzung nach dem Zerstören der Thalli festgestellt werden.

Es ist bekannt, dass flüchtige Amine und DMS in marinen Makroalgen vorkommen.<sup>[48, 54, 64, 65]</sup> Während DMS als ein fraßhemmender Sekundärmetabolit in der Literatur beschrieben wurde,<sup>[26, 57]</sup> gab es bisher nur die Hypothese, dass Amine in der chemischen Verteidigung eine Rolle spielen können.<sup>[64, 66]</sup>

### 3.1.2.2.2 Quantifizierung von TMA und DMS

Die Verwendung von SPME für die Extraktion und Quantifizierung von TMA aus Urinproben wurde bereits von Mills et al. beschrieben<sup>[167]</sup> und auch der Gebrauch für die Extraktion von Seewasserproben ist bekannt.<sup>[169]</sup> Des Weiteren gibt es in der Literatur beschriebene Beispiele für die Extraktion von DMS unter Verwendung einer SPME-Methode.<sup>[85]</sup> Diese Methoden wurden so adaptiert, dass direkt aus der Matrix der verwundeten Algen quantifiziert werden konnte. Die Extraktionen der flüchtigen Komponenten der Alge wurden durch Adsorption an der Faser durchgeführt und nach 20 min direkt im Injektor eines Gaschromatographen desorbiert. Die gekoppelte massenspektroskopische Detektion erlaubte eine Quantifizierung der beiden Substanzen (DMS und TMA) ohne deren Basislinientrennung im Chromatogramm. Die flüchtigen

Stoffe wurden im MS durch die repräsentativen Molekülionen und deren charakteristische Fragmentationen identifiziert und anhand des Molekülions quantifiziert. Die Kalibrationsgeraden wurden mit käuflich erhältlichen Reinsubstanzen bei drei verschiedenen Konzentrationen unter Verwendung der Ionenspur des jeweiligen Molekülpeaks dreifach repliziert (TMA 59  $m/z$ ; DMS 62  $m/z$ ). Mit dieser Methode war die Kalibrierung für TMA in künstlichem Seewasser im Bereich von 1 bis 38,6  $\mu\text{g/ml}$  linear. Die Quadrate der Korrelationskoeffizienten ( $r^2$ ) der Kalibrierungsgeraden lagen zwischen 0,78 und 0,98. Für die Kalibrierung von DMS konnte eine Linearität im Konzentrationsbereich von 0,5 bis 12,5  $\mu\text{g/ml}$  festgestellt werden, mit  $r^2$ -Werten zwischen 0,84 und 0,99. Durch diesen linearen Bereich der Kalibrationsgeraden wurde eine Quantifizierung von TMA und DMS in marinen Algenproben ermöglicht. Aufgrund des Alterungsprozesses der verwendeten Fasern, Verschleißerscheinungen und Kontaminationen der Chromatographiesäule kam es zu großen Schwankungen zwischen den, sich über mehrere Monate ausdehnenden, Messreihen (Kalibrationsgleichungen siehe Anhang). Dies machte eine Kalibrierung von TMA und DMS vor jeder neuen Messreihe notwendig. Quantifizierungen in mechanisch verwundeter *D. dichotoma* von der Atlantischen Küste in Roscoff, Frankreich, ergaben Konzentrationen von bis zu 50  $\mu\text{g}$  DMS pro Gramm Alge und bis zu 170  $\mu\text{g}$  TMA pro Gramm Alge (Tab. 2). Trotz der relativ großen Schwankungen im Konzentrationsbereich des TMAs in den intakten Algenproben, konnte für jede Probe eine erhöhte Freisetzung der flüchtigen Komponenten nach mechanischer Verwundung detektiert werden.

Trimethylamin (TMA)		
Mechanisch verwundete <i>Dictyota dichotoma</i>		intakte <i>Dictyota dichotoma</i>
Juni 2005 3 – 5 Wochen kultiviert Atlantische Küste, Roscoff	70 – 170 µg/g Alge	0 – 50 µg/g Alge
November 2003 1 – 2 Wochen kultiviert Atlantische Küste, Roscoff	80 – 150 µg/g Alge	
Dimethylsulfid (DMS)		
Mechanisch verwundete <i>Dictyota dichotoma</i>		intakte <i>Dictyota dichotoma</i>
Juni 2005 3 – 5 Wochen kultiviert Atlantische Küste, Roscoff	5 – 10 µg/g Alge	0 – 1,5 µg/g Alge
November 2003 1 – 2 Wochen kultiviert Atlantische Küste, Roscoff	30 – 50 µg/g Alge	

**Tabelle 2: Quantifizierung von Trimethylamin und Dimethylsulfid in intakten und mechanisch verwundeten *D. dichotoma* Proben von der Atlantischen Küste in Roscoff, Frankreich.**

Zwischen den Messreihen konnte in *D. dichotoma* eine starke Variabilität in der Freisetzung von DMS nach Verwundung der Thalli festgestellt werden. Während im späten Frühling relativ geringe Mengen an DMS (bis zu 10 µg DMS pro Gramm Alge) detektiert werden konnten, wurden im Herbst Konzentrationen bis zu 50 µg DMS pro Gramm Alge nach der mechanischen Verwundung freigesetzt. Es kann vermutet werden, dass es sich bei diesen Schwankungen um eine saisonale Abhängigkeit handelt, da ähnliche Jahreszeitabhängigkeiten auch in unabhängigen Vorversuchen festgestellt wurden (Daten nicht gezeigt). Prinzipiell sind saisonale Unterschiede im Vorkommen und in der Konzentrationen von Metaboliten in Meeresalgen oft beobachtet.<sup>[170, 171]</sup>

Da in der Literatur die Koexistenz verschiedener morphologisch ähnlicher Arten der Dictyotales diskutiert wird,<sup>[121, 123, 124, 125, 126, 127]</sup> wurden zusätzlich Proben von *D.*

*menstrualis* (Morehead City, USA) auf die Freisetzung möglicher Verteidigungsmetaboliten nach der mechanischen Verwundung untersucht. Wie auch bei der verwandten Braunalge *D. dichotoma* konnte eine erhöhte Freisetzung von TMA und DMS nach der mechanischen Verwundung der Thalli nachgewiesen werden. Die Konzentration an DMS betrug bis zu 0,10 ng DMS/g Alge in den intakten Algenproben und bis zu 1,41 ng DMS/g Alge in den verwundeten Algenproben. Die Konzentration an TMA betrug bis zu 45 ng TMA/g Alge in den intakten Algenproben und bis zu 275 ng TMA/g Alge in den verwundeten Algenproben. Diese deutlich niedrigeren Konzentrationen der flüchtigen Komponenten legen die Vermutung nahe, dass es sich um eine artspezifische Reaktion handelt. Es wurde generell auch bei den anderen Untersuchungen eine unterschiedliche Chemie der Sekundärmetaboliten dieser beiden Arten gefunden, was sich offensichtlich auch bei den biogenen Gasen wieder findet.

Die Einfachheit der Methode und die kleinen benötigten Probenvolumina erlaubten eine schnelle und effektive Untersuchung der Verbreitung dieser Verwundungsreaktion. Mit der entwickelten SPME-Methode wurden verschiedene frisch gesammelte Makroalgen, wie die marinen Braunalgen *Colpomenia peregrina*, *Dictyopteris* spp., *Fucus vesiculosus*, *Halopteris* spp., *Himantalia elongata*, *Laminaria saccharina*, *Sargassum muticum* *Pylaiella* spp., die Rotalge *Gracilaria chilensis* und die Grünalge *Ulva* spp., aber auch eine Diatomeenkultur von *Thalassosera rotula*, auf eine Freisetzung der flüchtigen Komponenten nach der Simulation von Herbivorie untersucht. Es konnte jedoch nur in den Makroalgen *F. vesiculosus* ( $0,08 \pm 0,01 \mu\text{g DMS/g Alge}$ ) und *Pylaiella* spp. ( $30,94 \pm 23,45 \mu\text{g DMS/g Alge}$ ) eine Erhöhung des DMS-Gehaltes nach Verwundung festgestellt werden. In den anderen untersuchten Algenproben konnte keine eindeutig erhöhte Freisetzung von TMA oder DMS nach der mechanischen Verwundung detektiert werden.

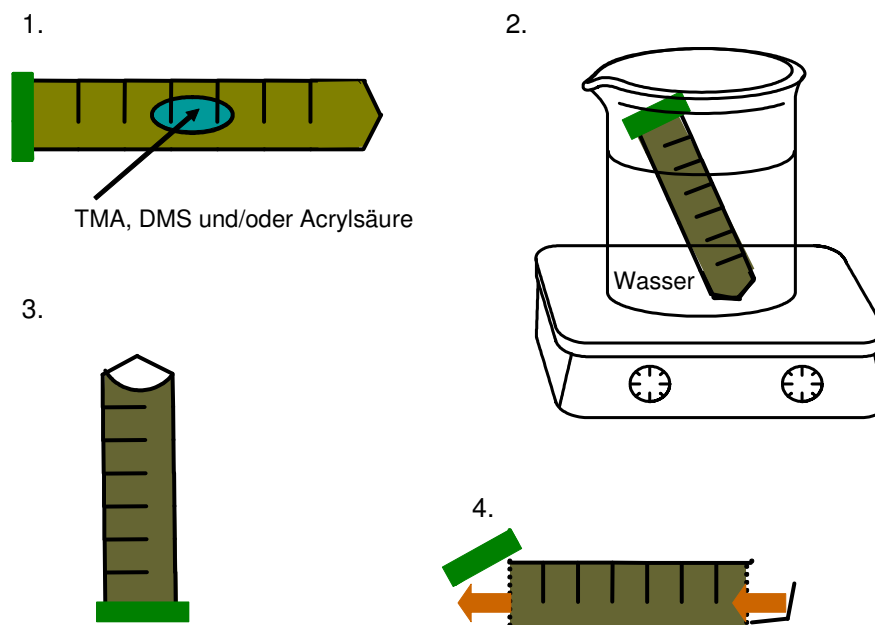
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nur bei den Braunalgen *D. dichotoma* und *D. menstrualis* eine verwundungsaktivierte Freisetzung der Mischung von TMA und DMS detektiert werden konnte. Diese Reaktion scheint spezifisch für die hier untersuchten *Dictyota* spp. zu sein, da sie bei einer repräsentativen Auswahl von Makroalgen nicht universell beobachtet wird.

### 3.1.3 Fütterungsexperimente

Um die Bedeutung der flüchtigen Metaboliten TMA und DMS sowie der biosynthetisch verbundenen Acrylsäure in der aktivierten chemischen Verteidigung der untersuchten Algen zu überprüfen, wurde künstliches Futter auf Agarbasis hergestellt, welches eine oder auch mehrere der identifizierten Komponenten beinhaltet.



Eine besondere Schwierigkeit in der Durchführung der Fütterungsexperimente lag in der Flüchtigkeit der potentiellen Verteidigungsmetaboliten und in dem damit verbundenen Verlust während der Futterzubereitung und über die Dauer der Futtermischungsversuche. Agar erstarrt bei ca. 50 °C, wodurch die direkte Zugabe der flüchtigen Stoffe TMA und DMS (Siedepunkt TMA 30 °C, DMS 37 °C) nicht ohne große Verluste möglich war. Um dieses Problem zu umgehen und eine homogene Mischung des Futters zu gewährleisten, wurde die Herstellung in verschließbaren Probegefäßen durchgeführt (Kapitel 6.8.1.1). Dadurch wurde der Verlust von TMA und DMS während der Futterherstellung durch die Gasphase während der notwendigen Erhitzung des Agars weitgehend vermieden. Abbildung 20 zeigt schematisch die Herstellung des künstlichen Futters für die Fütterungsexperimente mit TMA, DMS und Acrylsäure.



**Abbildung 20: Herstellung des künstlichen Futters für die Fütterungsexperimente mit TMA, DMS und Acrylsäure. 1) Injektion von TMA, DMS und Acrylsäure mit einer Spritze in die Luftblase nach Erkalten des Agars mit Futteralge; 2) Erhitzen des geschlossenen Falcontubes im Wasserbad; 3) Nach Homogenisierung durch Schütteln Futtermischung erkalten lassen; 4) Öffnen des Falcontubes (Kapitel 6.8.1.1)**

Da weiterhin die Konzentrationen der flüchtigen Komponenten TMA und DMS im Futter sowohl von der Zeit des Experimentes als auch von der Größe der Agarstücke abhängig sind, wurden in Vorversuchen die Wiederfindungsraten der flüchtigen Verbindungen nach der Fütterungszeit von 25 min gemessen. Während der Dauer der Fütterungsexperimente ging aufgrund der hohen Dampfdrücke von TMA und DMS ein beträchtlicher Anteil dieser flüchtigen Metaboliten in die Gasphase über. Nur noch 50 – 70 % des in das Futter

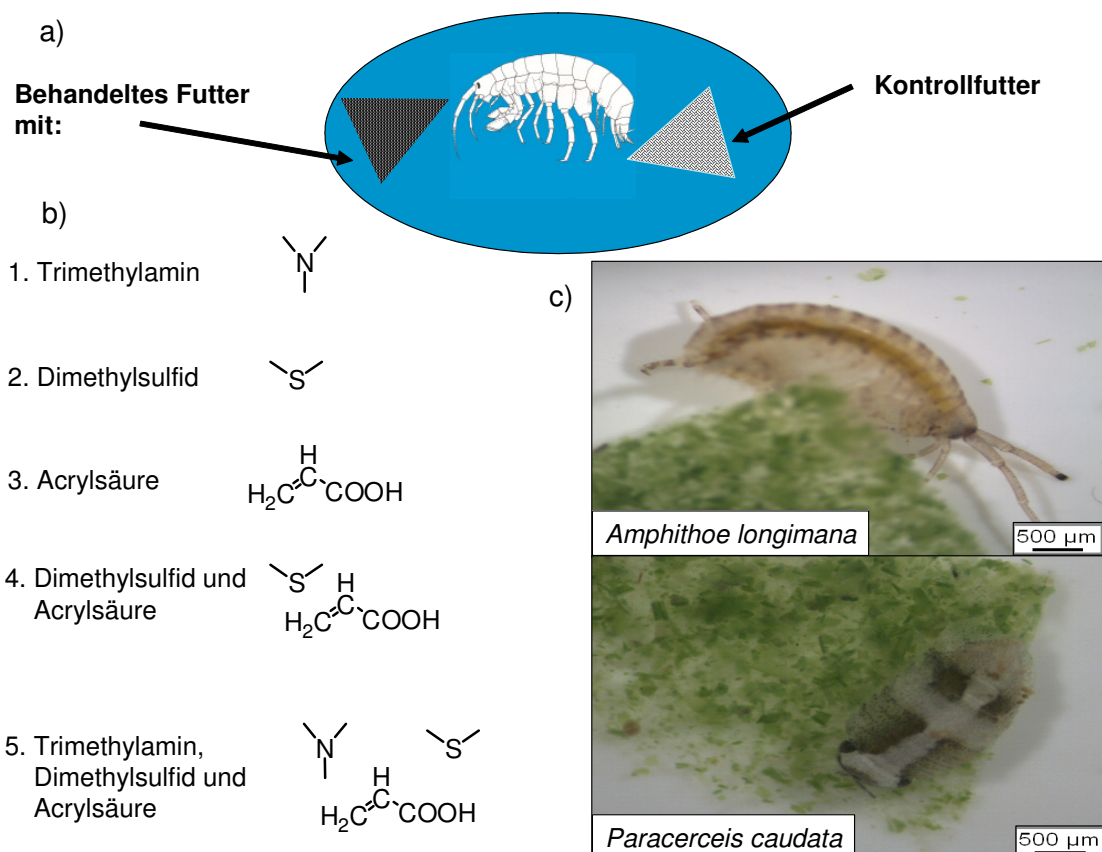
eingebrachten TMA und DMS wurden nach der Analyse des Fraßverhaltens der Amphipoden und Isopoden auf dem künstlichen Futter wieder gefunden.

Die genaue lokale Konzentration der durch Fraß freigesetzten Stoffe, sowie der Gehalt dieser potentiellen Verteidigungsmetaboliten, dem die Flohkrebse direkt ausgesetzt sind, kann durch die hier verwendete chemische Analytik nicht ermittelt werden. Auch die relativen Mengen und der absolute Gehalt kann innerhalb der Alge, wie von anderen Metaboliten bekannt, stark variieren.<sup>[21, 137, 172, 173]</sup> Weiterhin können große Unterschiede in dem Auftreten und der Konzentration von Sekundärmetaboliten zwischen Algen auftreten, die in verschiedenen Habitaten leben oder auch nur wenige Meter voneinander entfernt wachsen.<sup>[3, 125, 126, 127, 174]</sup> Aus diesen Gründen wurden für die Bioassays TMA- und DMS-Konzentrationen über drei Größenordnungen verwendet, um mögliche ökologische Szenarien zu erfassen. Unter Berücksichtigung der Freisetzung der flüchtigen Komponenten während der Zubereitung und Versuchsdauer entsprechen die eingesetzten 40 µg DMS/ml Agar und 300 µg TMA/ml Agar (ca. 0,002 % des Feuchtgewichtes DMS und ca. 0,015 % des Feuchtgewichtes TMA im Futter) in etwa den nachgewiesenen natürlichen Konzentrationen der in *D. dichotoma* durch mechanische Verwundung freigesetzten flüchtigen Stoffe. Die Konzentration der biosynthetisch verwandten, nichtflüchtigen Acrylsäure lag in demselben Bereich.

Die Zugabe von 1 ml 1 N Natronlauge zu der verwundeten Algenprobe führte zu einem starken Anstieg an TMA und DMS in der Gasphase (siehe Kapitel 3.2.1), was auf ein möglicherweise höheres Potential dieser flüchtigen Metaboliten hindeutet. Es kann also durch Fraßtätigkeit des Versuchstieres zu potentiell höheren Konzentration der möglichen Verteidigungsmetaboliten kommen. Daher wurden zusätzlich Versuche mit der zehnfachen sowie hundertfachen Konzentration an TMA, DMS und Acrylsäure durchgeführt. Bei diesen Fütterungsversuchen waren bis zu 1,5 % TMA und 0,2 % DMS (% des Feuchtgewichtes) im künstlichen Futter vorhanden.

In den Fütterungsexperimenten wurden als Versuchstiere Amphipoden und Isopoden eingesetzt, die an der Atlantischen Küste von Nordamerika auf der Braunalge *D. menstrualis* zu finden sind. Die verwendeten Flohkrebsarten *Amphithoe longimana* und *Paracerceis caudata* sind weit verbreitet und für Versuche unter kontrollierten Bedingungen im Labor geeignet.<sup>[136, 175, 176, 177]</sup> Obwohl bekannte Dictyole (18 – 21) einen starken Einfluss auf die Futterwahl von Fischen und Seeigeln haben,<sup>[136]</sup> beeinflussen diese Verbindungen das Fraßverhalten der beiden Flohkrebsarten nur gering. Diese Flohkrebse bevorzugen dennoch das Futter, das aus dem Extrakt der intakten *Dictyota* spp. Probe gewonnen wird signifikant, gegenüber dem Extrakt aus der verwundeten Alge. Werden *A. longimana* und *P. caudata* unter Laborbedingungen vor die Wahl zwischen der Grünalge *Enteromorpha intestinalis* und der Braunalge *D. menstrualis* gestellt,

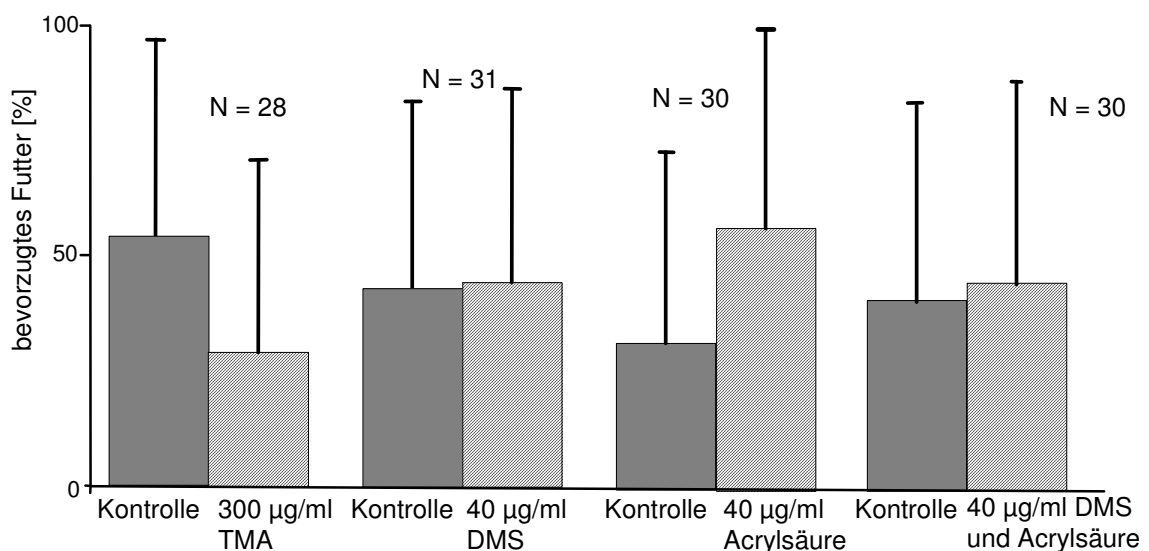
bevorzugen beide Flohkrebsarten die Grünalge.<sup>[177]</sup> Da diese Fraßfeinde offensichtlich von anderen Verteidigungsmetaboliten als den bekannten Terpenen abgeschreckt werden, stellen sie exzellente Versuchstiere für die Untersuchung der Abwehreigenschaften der identifizierten flüchtigen Komponenten, TMA und DMS, und der biosynthetisch verbundenen Acrylsäure dar. Abbildung 21 zeigt den Versuchsaufbau für die durchgeführten Fütterungsexperimente.



**Abbildung 21:** a) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der Fütterungsexperimente mit den zwei Flohkrebsarten *A. longimana* und *P. caudata*, b) verwendete Komponenten und Mischungen, c) Die Flohkrebse auf der künstlichen Futterquelle.

Nach der Zugabe der Versuchstiere in das jeweilige Gefäß wurde über die Dauer des Experimentes (25 min) alle fünf Minuten notiert, welches Futter (Kontrolle oder behandeltes Futter mit Zugabe der möglichen Verteidigungsmetaboliten) die Flohkrebse bevorzugten. Es ergaben sich so fünf Messpunkte mit denen die Aufenthaltspräferenz der Krebse festgestellt werden konnte. Während der Versuchzeit ist zwar eine quantitative Aussage der Fraßaktivität der Flohkrebse nicht möglich, doch Versuche anderer Gruppen zeigten, dass der Aufenthaltsort der Flohkrebse sehr wahrscheinlich mit dem übereinstimmt, wo sie auch fressen (siehe <sup>[177, 178]</sup>).

Sowohl die einzelnen Komponenten als auch die Mischung der Metaboliten DMS und Acrylsäure führten in den Konzentrationen, die nach dem mechanischen Verwunden von *D. dichotoma* gemessen wurden, zu keinem signifikanten Unterschied in der Aufenthaltspräferenz der beiden untersuchten Flohkrebsarten. Abbildung 22 zeigt exemplarisch die relative Aufenthaltshäufigkeit der Flohkrebsart *A. longimana* auf den unterschiedlichen Futterquellen. Dabei sind jeweils die Kontrollproben den behandelten Futterproben, die mit TMA, DMS, Acrylsäure oder der Mischung von DMS und Acrylsäure versetzt wurden, gegenübergestellt. Die Konzentrationen entsprachen dabei den durch mechanische Verwundung freigesetzten und durch SPME quantifizierten Mengen in *D. dichotoma*.



**Abbildung 22: Fütterungsexperimente mit Amphipoden für einzelne Komponenten und einem Mix aus DMS und Acrylsäure, mit Standardabweichung. Die Prozentzahl gibt an, wie oft sich die einzelnen Versuchstiere während der Versuchsdauer auf dem jeweiligen Futter befinden (5 Messpunkte = 100 %, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder).**

Nur bei Konzentrationen, die zehn- bis hundertfach über der natürlichen Konzentration der eingesetzten Komponenten lagen, konnte zum Teil eine signifikante Vermeidung des behandelten Futters für beide verwendeten Flohkrebsarten festgestellt werden (siehe Anhang). Während erhöhte DMS-Konzentrationen keinen Einfluss auf die Futterwahl der

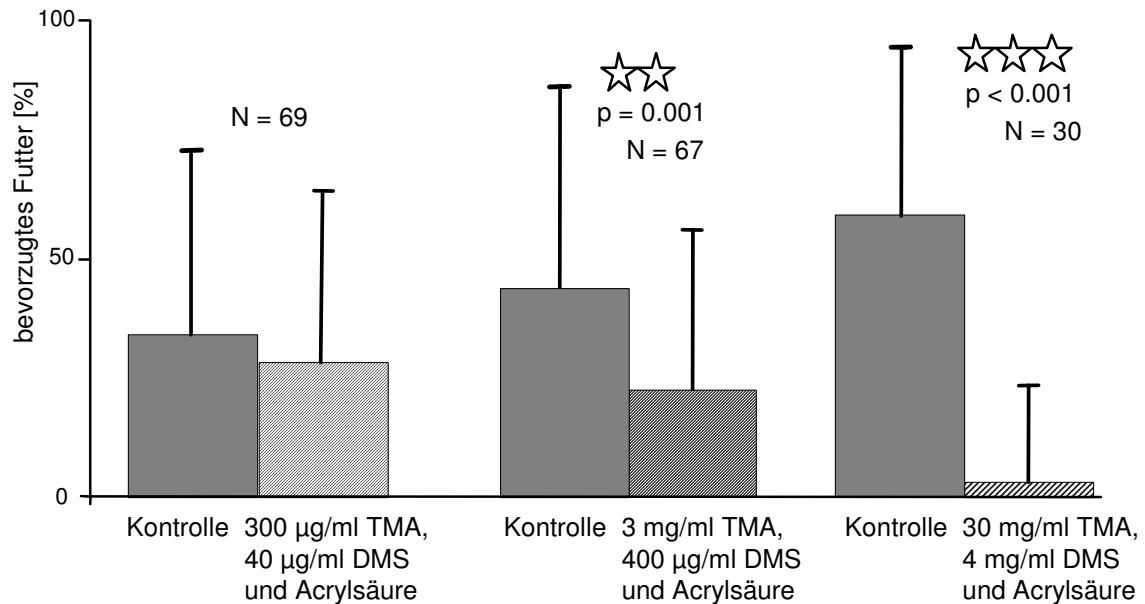
Amphipoden hatten, wirkte sowohl die hundertfache Konzentration an Acrylsäure als auch die hundertfache Konzentration der Mischung aus DMS und Acrylsäure signifikant ( $p \leq 0,05$ ) abschreckend auf *A. longimana*. Die aktiven DMS Konzentrationen liegen im selben Konzentrationsbereich, in dem diese Metaboliten auch abwehrend auf Seeschnecken wirken.<sup>[57]</sup>

Bei dem flüchtigen TMA reichte die zehnfache Konzentration aus, um einen signifikanten Unterschied im Verhalten der Amphipoden bezüglich ihrer Futterwahl feststellen zu können.

Während TMA auch in hohen Konzentrationen keinen negativen Einfluss auf die Isopoden *P. caudata* zu haben schien, wirkten sowohl die hohen Konzentrationen der einzelnen Substanzen DMS und Acrylsäure als auch die hundertfache Konzentration der Mischung aus beiden signifikant ( $p \leq 0,005$ ) abschreckend (Anhang).

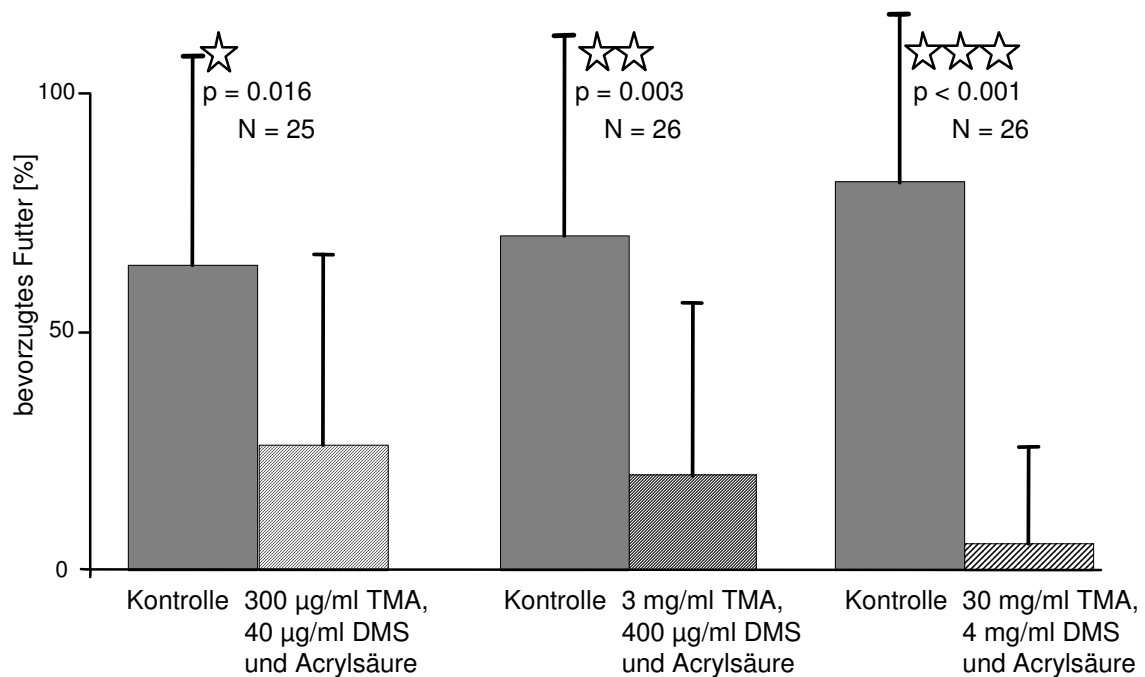
Die natürlichen Konzentrationen der einzelnen oder auch teilweise gemixten Komponenten, TMA, DMS und Acrylsäure und auch die Mischung von DMS und der simultan biosynthetisierten Acrylsäure haben also keinen Einfluss auf das Fraßverhalten der Amphipoden und Isopoden.

Jedoch werden bei dem Verwunden der *D. dichotoma* Thalli nicht die einzelnen individuellen Komponenten freigesetzt, sondern viel eher ist es eine Mischung dieser drei Metaboliten. Synergetische Effekte dieser Mischung könnten zu einem wesentlich höheren Verteidigungspotential führen und damit die Alge erfolgreich gegen Herbivorie verteidigen. Bioassays mit einer Mischung aller drei Komponenten TMA, DMS und Acrylsäure in drei verschiedenen Konzentrationen zeigten deutlich, dass es bei den Isopoden *P. caudata* erst bei höheren Konzentrationen zu einem negativen Effekt im Fraßverhalten kommt, was mit den Ergebnissen der Einzelkomponentenuntersuchungen vergleichbar ist (Abb. 23).



**Abbildung 23: Verhalten der Isopoden *P. caudata* bei der Futterwahl in Experimenten mit den drei Komponenten TMA, DMS und Acrylsäure (die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder).**

Im Gegensatz zu den Isopoden kommt es bei den Amphipoden *A. longimana* schon in der niedrigsten Konzentration der drei gemischten potentiellen Verteidigungsmetaboliten zu synergetischen Effekten (Abb. 24). Das Zusammenspiel der Metaboliten, die in der verwundeten Braunalge *D. dichotoma* gemeinsam freigesetzt werden, veranlasst die Flohkrebsart *A. longimana* sich einen anderen Aufenthaltsort zu suchen. Bei der Wahl zwischen dem auf Agar basierenden künstlichen Futter mit oder ohne mögliche Verteidigungsmetaboliten, bevorzugen die Amphipoden signifikant ( $p \leq 0,016$ ) das Kontrollfutter. Dieser signifikante Effekt konnte für alle eingesetzten Konzentrationen beobachtet werden (Wilcoxon-Paar-Test, Abb. 24).



**Abbildung 24: Verhalten der Amphipoden *A. longimana* bei der Futterwahl in Experimenten mit allen Komponente (die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder).**

Die Ergebnisse zeigen, dass die Mischung der flüchtigen Substanzen TMA und DMS, sowie der nichtflüchtigen Acrylsäure, welche nach Zerstörung der Zellen von *Dictyota* spp. freigesetzt werden, als eine aktivierte chemische Verteidigung angesehen werden kann. Weiter wird hier gezeigt, dass aquatische Herbivore in der Lage sind Mischungen biogener Gase wahrzunehmen und daraufhin Futterquellen zu vermeiden, die solche flüchtigen Bouquets freisetzen. Hier konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass dabei das Zusammenwirken von drei Metaboliten entscheidend für den abschreckenden Erfolg gegenüber der Flohkrebsart *A. longimana* ist und somit eine komplexe Stoffmischung durch die aquatischen Herbivoren nachgewiesen wird. Es ist bekannt, dass die Wahrnehmung flüchtiger Stoffe die Futterauswahl aquatischer Herbivore beeinflussen kann.<sup>[179]</sup> Generell können chemische Verteidigungsmetaboliten in der direkten Verteidigung synergistisch wirken,<sup>[180, 181]</sup> ob dabei allerdings ein Signalcharakter der Bouquets beteiligt ist, ist nicht bekannt. Auch über das Zusammenwirken von chemischen und physikalischen Verteidigungsstrategien in aquatischen Herbivor/Algen Interaktionen wird berichtet.<sup>[180, 181]</sup>

## 3.2 Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP)

DMSP wird von Phytoplankton, Makroalgen und anderen Wasserpflanzen produziert und dient ihnen als Antioxidationsmittel und Kryoprotektiva (Schutz bei Kälte), aber auch dazu den internen osmotischen Druck zu kontrollieren.<sup>[53, 67, 71, 76]</sup> Auch gilt DMSP als Hauptvorläufer von DMS, welches durch die enzymatische Spaltung durch DMSP-lyase neben dem zweiten Spaltprodukt Acrylsäure in Mikro- und Makroalgen freigesetzt wird (Abb. 6).<sup>[67, 70, 74, 77]</sup>

### 3.2.1 Basisch medierte Spaltung des DMSP in DMS und Acrylsäure

Da die Spaltung von DMSP auch durch Basen mediiert werden kann,<sup>[73]</sup> ist es möglich DMSP mittels SPME indirekt nach Zugabe einer 1 N Natriumhydroxidlösung über das freigesetzte DMS nachzuweisen. Somit können allerdings nur indirekte Rückschlüsse auf das potentiell im Algengewebe enthaltene DMSP gezogen werden.<sup>[83]</sup> Im Rahmen einer Reihenuntersuchung wurden neben *D. dichotoma* weitere Makroalgen (die marinen Braunalgen *Colpomenia peregrina*, *Dictyopteris* spp., *Fucus vesiculosus*, *Halopteris* spp., *Himanthalia elongata*, *Laminaria saccharina*, *Sargassum muticum* *Pylaiella* spp., die Rotalge *Gracilaria chilensis* und die Grünalge *Ulva* spp.) und eine Kultur der Diatomee *T. rotula* auf die Freisetzung von TMA oder DMS nach Zugabe von 1 ml 1 N Natriumhydroxidlösung in das geschlossene Probensystem untersucht. Dabei konnte bei allen Proben ein starker Anstieg des DMS- und TMA-Gehaltes in der Gasphase über der Algenprobe festgestellt werden, der jedoch aufgrund der resultierenden hohen Konzentrationen und der daraus resultierenden Absättigung der SPME-Faser nicht mit dem verwendeten Extraktionsprotokoll quantifiziert werden konnte. Dieser Anstieg lässt jedoch auf einen hohen DMSP-Gehalt in diesen marinen Makro- und Mikroalgen schließen. Die meisten Algen verfügen somit wahrscheinlich über einen relativ hohen (> 13 µg/g) internen DMSP-Gehalt, der allerdings nur in seltenen Fällen verwundungsaktiviert gespalten wird. Bei *D. dichotoma*, *Fucus* spp. und *Pylaiella* spp. wird das interne DMSP nach Verwundung nicht quantitativ umgesetzt.

Ein substantielles Problem der indirekten gaschromatographischen Methoden zum Nachweis von DMSP ist, neben der Übersättigung der Faser, eine möglicherweise zu hohe Konzentrationsangabe von DMSP in marinen Organismen, da DMS auch aus anderen biologischen Vorläufern gebildet werden kann (Abb. 7).<sup>[89, 90, 91]</sup> Um diese Probleme zu vermeiden und auch um eine universelle Methode zum Nachweis dieses zentralen Metaboliten in marinen Organismen zu entwickeln, wurde eine UPLC/UV/MS-Methode für den direkten Nachweis von DMSP entwickelt.



## 3.2.2 Identifizierung und Quantifizierung

### 3.2.2.1 Synthese und Derivatisierung von DMSP und [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-DMSP

Das zur Methodenentwicklung benötigte und als Futterzusatz bei Bioassays verwendete DMSP wurde, wie von Chambers et al. beschrieben<sup>[182]</sup> synthetisiert und als Hydrochlorid gefällt (bis zu 90 % Ausbeute). Die Reaktionsbedingungen stellten einen niedrigen pH-Wert ( $\leq 1$ ) sicher, durch den eine Hydrolyse des synthetisierten DMSP während der Aufreinigung ausgeschlossen werden konnte. Das Reaktionsprodukt DMSP x HCl wurde durch NMR und LC/MS mit einer Reinheit von über 95 % bestätigt. Das trockene feste DMSP x HCl konnte bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  für mehr als vier Wochen stabil gelagert werden.

Als interner Standard für LC/MS Analysen verschiedener Algenproben wurde [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-DMSP synthetisiert, da hier bezüglich Extraktion und Derivatisierung höchstmögliche Identität und Vergleichsicherheit zum Analyten erreicht wird. Die Molekülionen ( $M^+$  349  $m/z$ ) des DMSP in der Probe und des markierten [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-DMSP ( $M^+$  355  $m/z$ ) können ohne Interferenzen zur Auswertung herangezogen werden. Die Synthese des deuterierten [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-DMSP erfolgte mit deuteriertem [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-DMS nach dem gleichen Protokoll, das zur DMSP-Synthese zur Anwendung kam. Auch hier erfolgte eine Reinheitsüberprüfung durch NMR-Messungen ( $\geq 90\%$ ).

DMSP hat keine starke UV-Absorption und aufgrund der chromatographischen Eigenschaften des geladenen Zwitterions kann es bei herkömmlichen HPLC-Methoden ohne vorherige Aufreinigung zu starken Interferenzen mit zur gleichen Zeit co-eluierenden Verunreinigungen kommen. So wird in verschiedenen Studien eine vorgeschaltete Ionenchromatographie als Reinigungsschritt verwendet,<sup>[90]</sup> aber auch eine Kapillarelektrophorese für die direkte Quantifizierung von DMSP ist bekannt.<sup>[183]</sup> Um eine generelle Methode unter Verwendung einer allgemeinen Analysenlaboreinrichtung zu entwickeln, wurde 1-Pyrenyldiazomethan (25) (PDAM) als Derivatisierungsreagenz für den Säurerest am DMSP (7) verwendet (Abb. 25). Die Probe wurde dazu zur Trockne eingedampft, in 100  $\mu\text{l}$  Methanol aufgenommen und mit einem Überschuss an PDAM bei Raumtemperatur derivatisiert (Kapitel 6.7.1 und 6.7.2).

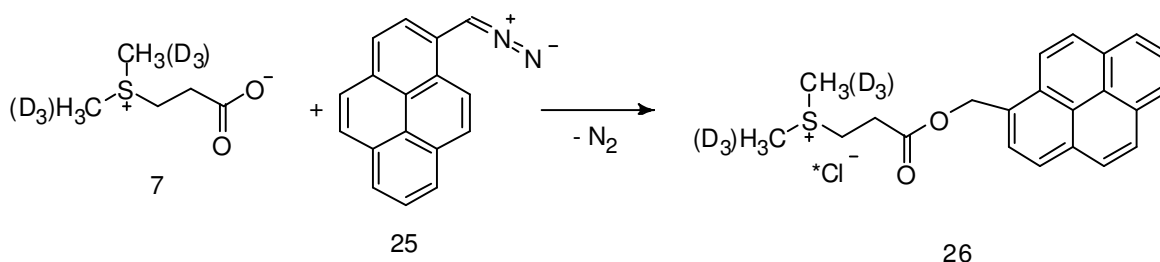


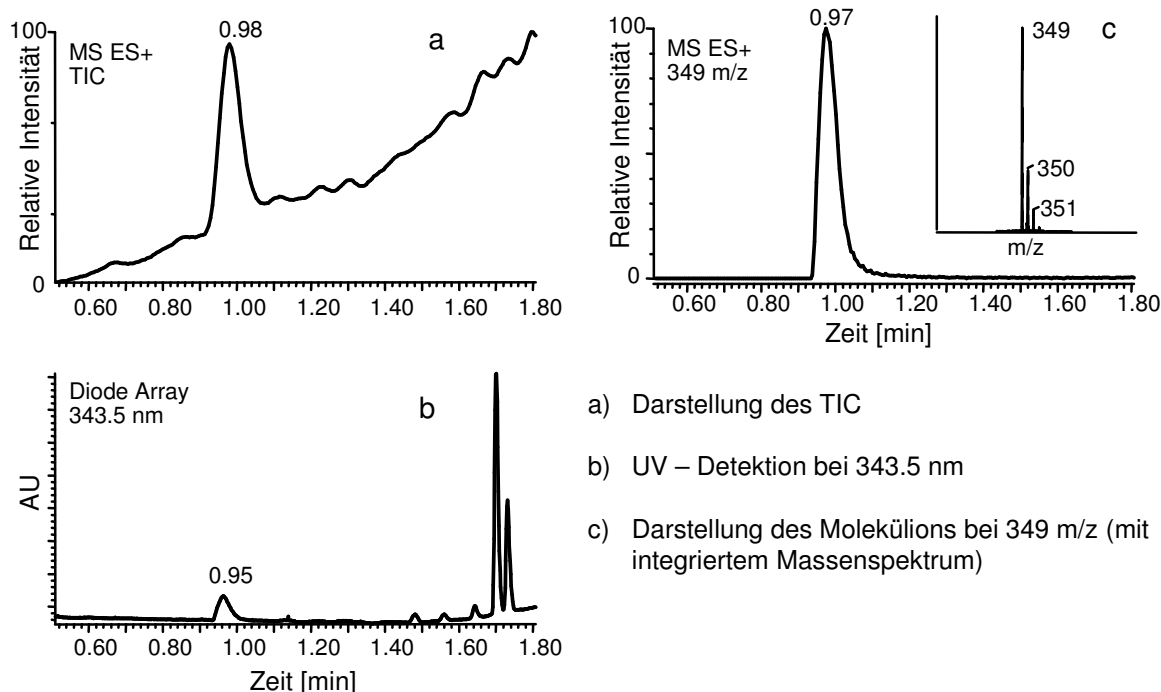
Abbildung 25: Derivatisierung der Säuregruppe von DMSP mit 1-Pyrenyldiazomethan (25).

Nach der Derivatisierung des stark polaren DMSP mit dem großem hydrophoben Pyrenylrest des PDAM, ist das Produkt sehr gut für die Trennung unter Umkehrphasenbedingungen auf einer C<sub>18</sub>-UPLC oder HPLC Säule geeignet. Weiterhin hat das Derivatisierungsprodukt eine starke UV-Absorption mit einem Maximum bei 343.5 nm. Zusätzlich würde ein Fluoreszenzdetektor die Sensitivität der Methode stark erhöhen, jedoch stand uns dieses Gerät während unserer Untersuchungen nicht zur Verfügung. In den frisch derivatisierten UPLC/MS Proben wurden ca. 1 – 2 % PDAM derivatisierte Acrylsäure gefunden (im Bezug auf derivatisiertes DMSP), hierbei kann es sich um das Hydrolyseprodukt von PDAM-DMSP (26) oder das Derivatisierungsprodukt von in Spuren vorhandener Acrylsäure handeln. Die Stabilität der derivatisierten Proben in verschiedenen Lösemitteln (Methanol, Methanol + 0,01 % Essigsäure und Methanol + 0,1 % Essigsäure) ist für 92 h bei einer Lagerungstemperatur von 10 °C gewährleistet. Nach dieser Zeit wurden in allen drei Proben über 90 % des PDAM-DMSP wieder gefunden. Bei einer Lagerung bei 4 °C ist PDAM-DMSP (26) mehr als 90 Tage stabil.

### 3.2.2.2 Methodenentwicklung

Für die Bestimmung von DMSP wurde eine chromatographische Trennung für das derivatisierte Produkt auf einer Acquity™ Ultrapformance LC mit einem 2996 PDA Detektor entwickelt. Für die Quantifizierung von DMSP in Algenproben wurde zunächst eine externe Kalibrierungskurve mit PDAM-DMSP aufgenommen. Nur wenn eine massenspektroskopische Detektierung möglich ist, kann alternativ dazu das PDAM-[<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-DMSP als interner Standard verwendet werden, da eine Trennung des DMSP und des [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-DMSP chromatographisch nicht möglich ist. Das Gemisch der mobilen Phase wurde mit den Kriterien Sensitivität, Retention und Peakform optimiert. Die Trennung von anderen PDAM-derivatisierten Verbindungen in Extrakten von Algen war ein weiteres Kriterium für die Analyse. Die besten Ergebnisse wurden mit einem Gemisch aus Wasser und einem organischen Eluent erzielt, welche jeweils 0.1 % Essigsäure enthielten. Acetonitril als organischer Eluent ergab die besten Ergebnisse bezüglich der Peakschärfe und Retention. Es kam jedoch zu einer Verschleppung der Analyten auf die darauf folgenden Messungen, die sich in der schlechten Löslichkeit der Derivate in der Probenaufgabenspritze oder in der Probenaufgabenschleife begründen könnte. Als ein besseres organisches Lösungsmittel, mit weit weniger Verschleppungseffekten der Derivate, erwies sich eine 8:2 Mischung aus Methanol und Tetrahydrofuran, welche 0,1 % Essigsäure enthielt. Um eine mögliche Verschleppung der Derivate auf die sich anschließenden Messungen zu umgehen, wurde bei Proben, in denen eine höhere Konzentration an derivatisiertem DMSP zu erwarten war, eine Injektion mit reinem Methanol zwischen zwei DMSP-Injektionen durchgeführt. Diese Methode zeigte, dass erst

ab einer Konzentration von über 6 mM DMSP in der Probe eine Verschleppung der Derivate zu beobachten ist. Die Analyse unter HPLC-Bedingungen fand ebenfalls mit dem beschriebenen Lösemittelgemisch H<sub>2</sub>O/MeOH/THF/HAc als mobile Phase statt. Während das Detektionslimit (Signal-Noise-Wert  $\geq 10$ ) für beide Trennmethode mit 590 nM ähnlich ist, ist die UPLC-Analyse mit einer Dauer von ca. 5 Minuten (einschließlich der notwendigen Gleichgewichtseinstellung der Säule nach jeder Analyse), um ein Vielfaches schneller, als eine Analyse unter HPLC Bedingungen, die normalerweise eine Laufzeit von bis zu 30 Minuten hat. Abbildung 26 zeigt ein typisches Chromatogramm für die UPLC-Trennung des synthetisierten DMSP nach Derivatisierung mit PDAM mit gekoppelter UV- und MS-Detektion.



**Abbildung 26: UPLC Trennung von 100 ng PDAM-DMSP.**

Der lineare Bereich und das Detektionslimit der entwickelten UPLC/UV/MS-Methode wurden jeweils für MS-Messungen und UV-Detektion bestimmt. Bei der Bestimmung des Verhältnisses der Fläche des  $[M^+]$ -Signals des PDAM-DMSP im MS zur eingesetzten Konzentration wurde eine Linearität in einem Bereich von 2,93  $\mu$ M bis 2,93 mM erreicht. Das Detektionslimit (Signal-Noise-Wert  $\geq 10$ ) ist 590 nM, was einer Konzentration von 1 ng pro Injektion PDAM-DMSP entspricht. Bei wiederholter Injektion pro Konzentration waren die Quadrate der Korrelationskoeffizienten ( $r^2$ ) größer 0,99. Mittels

Detektion im UV-Bereich kann ein Linearitätsbereich von 29,3 µM bis 11,72 mM erreicht werden, wenn die Peakflächen des UV-Signals bei 343,5 nm im Verhältnis zur eingesetzten Konzentration betrachtet wurden. Die  $r^2$  Werte waren auch hier, bei vierfacher Replizierung, größer 0,99. Mit der Verwendung beider Detektoren ist es möglich einen weiten linearen Bereich von fast vier Größenordnungen bei der Analyse von DMSP in marinen Organismen zu gewährleisten. Der Einsatz eines Fluoreszenzdetektors könnte wahrscheinlich das Detektionslimit bis auf wenige pg PDAM-DMSP pro Injektion steigern, wie es schon für andere mit PDAM derivatisierte Karbonsäuren beschrieben wurde.<sup>[184]</sup>

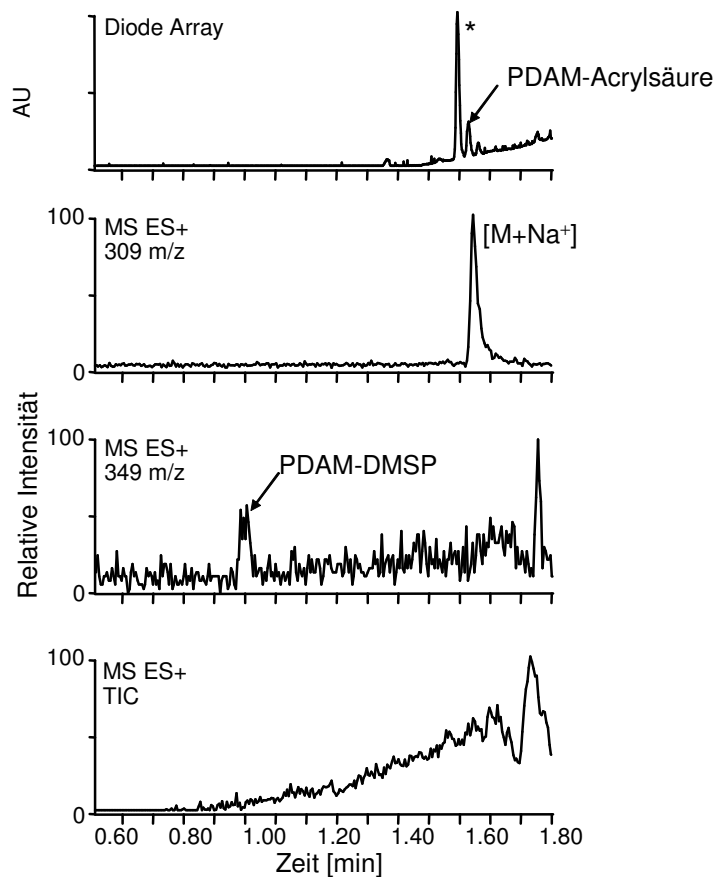
### 3.2.2.3 Untersuchung von Mikro und Makroalgen auf den DMSP-Gehalt

#### 3.2.2.3.1 Extraktionsmethoden

Verschiedene Protokolle wurden schon getestet, um DMSP z.B. aus Zuckerrohr oder Makroalgen zu extrahieren.<sup>[183]</sup> Entsprechend publizierter Extraktionsprotokolle wurden für die Quantifizierung von DMSP in der marinen Braunalge *D. dichotoma* drei verschiedene organische Lösemittel als Extraktionsmittel getestet.<sup>[183]</sup> Nach dem Schockgefrieren der Thalli mit flüssigem Stickstoff, um die enzymatische Aktivität zu unterdrücken, erfolgte die Extraktion mit a) Methanol, b) 5 %iger Perchlorsäure oder c) Methanol:Chloroform:Wasser (12:5:1). Während die beiden Prozeduren a) und c), wie schon in der Literatur beschrieben,<sup>[183]</sup> gute Resultate erzielten, konnte bei der Extraktion mit 5 %iger Perchlorsäure nur ein geringer Extraktionserfolg verzeichnet werden.<sup>[183]</sup> Dieser geringe Extraktionserfolg wurde auch dann beobachtet, wenn die Neutralisation der Perchlorsäure mit Kaliumkarbonat im Extrakt vermieden und somit basenmedierte DMSP-Spaltung ausgeschlossen wurde.

Zur Unterdrückung der Enzymaktivität in *D. dichotoma*, die zu einer enzymatischen Spaltung von DMSP in DMS und Acrylsäure während der Extraktion führen würde, wurden drei verschiedene Methoden getestet. Die Thalli wurden a) mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, b) gekocht oder c) mit 500 µl einer 1 N Salzsäure versetzt. Nur die Aufarbeitung nach dem Protokoll a) führte zu zufriedenstellenden Ergebnissen, wohingegen bei b) und c) nur sehr wenig DMSP in den Algenproben nachgewiesen werden konnte, während ein hoher Anteil des Hydrolyseproduktes PDAM-Acrylsäure detektiert wurde. Abbildung 27 zeigt das Chromatogramm der derivatisierten Acrylsäure, das als Spaltprodukt von DMSP x HCl nach Derivatisierung mit PDAM detektiert wird. Im Massenspektrum ist der  $[M+Na^+]$ -Peak (309  $m/z$ ) detektierbar und die Zuordnung des Signals im UV bestätigt. Die eindeutige Identifizierung erfolgte über den Vergleich mit käuflich erhältlicher Acrylsäure.

Bei der Extraktion der Algen wird eine mögliche Hydrolyse während der Probenvorbereitung und Derivatisierung durch Verwendung des internen Standards [ $^2\text{H}_6$ ]-DMSP berücksichtigt. Als Konsequenz wurde für die Bestimmung von DMSP in marinen Makroalgen diese Methode optimiert.



**Abbildung 27: UPLC Analyse nach Zugabe von 1 ml 1 N NaOH-Lösung zu 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DMSP x HCl und anschließender Derivatisierung mit PDAM. Das Sternchen kennzeichnet eine Verunreinigung durch das Derivatisierungsreagenz.**

Trotz konsequenter Optimierung der Extraktionsmethode für DMSP aus Algen konnte eine Hydrolyse des PDAM-DMSP, während der Vorbereitung und Lagerung der Proben, nicht vollständig unterdrückt werden. In vergleichenden Untersuchungen bei der Quantifizierung von DMSP in *D. dichotoma*, wobei zum einen die erstellte Kalibrierungsgerade und zum anderen eine Einpunktkalibrierung mittels des synthetisierten internen Standards verwendet wurde, konnte festgestellt werden, dass während der Probenvorbereitung bis zu 50 % des DMSP hydrolysiert wird. Dies kann wahrscheinlich auf eine nicht vollständige Unterdrückung der DMSP-Lyaseaktivität zurückgeführt werden. Nach dem Schockgefrieren durch flüssigen Stickstoff ist deshalb eine möglichst schnelle Aufarbeitung der Probe erforderlich, da die Enzyminaktivierung

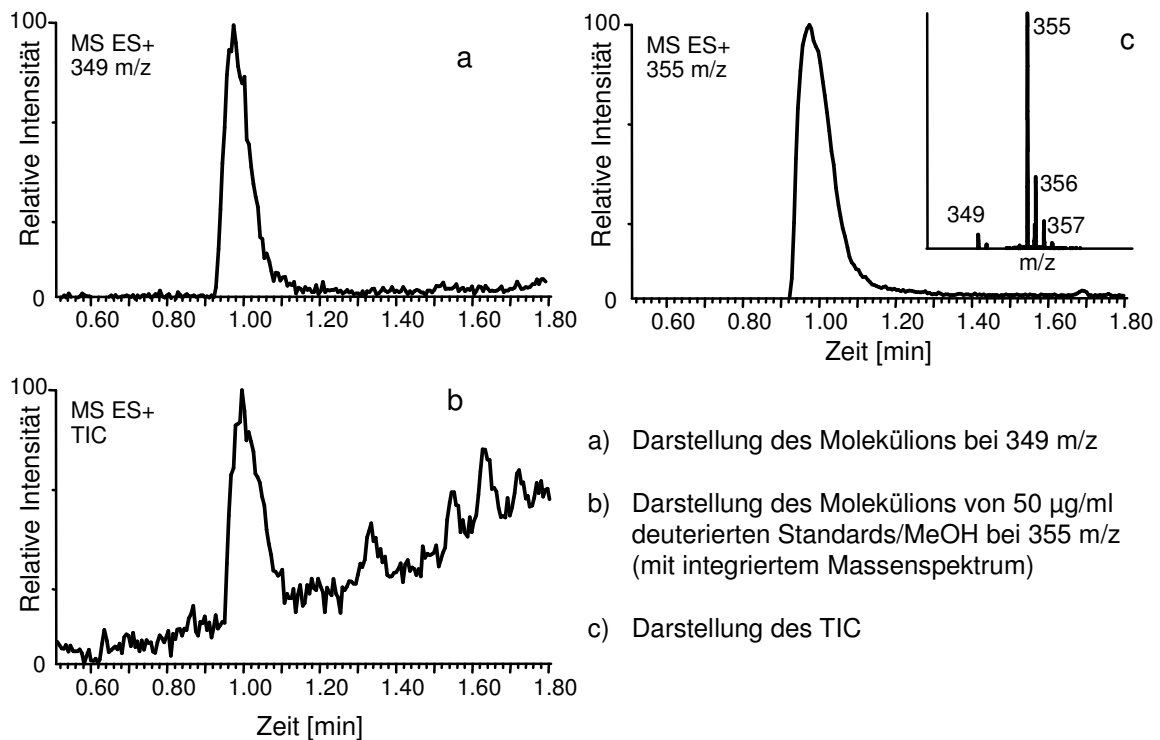
mit flüssigem Stickstoff reversibel ist. Die Zugabe des deuterierten internen Standards vor der Extraktion der Alge erlaubt aber die Ergebnisse um eine eventuelle Hydrolyse zu korrigieren, da [ $^2\text{H}_6$ ]-DMSP ebenfalls Substrat für eine DMSP-Lyase ist.

### 3.2.2.3.2 Quantifizierung von DMSP in marinen Mikro- und Makroalgen

Für die Bestimmung von DMSP in Makroalgen wurden im Sommer 2006 die Braunalgen *D. dichotoma* und *D. menstrualis* und vergleichend die Grünalge *Ulva* spp. untersucht. Die Identifizierung von PDAM-DMSP in *D. dichotoma* wurde durch hochaufgelöste Massen gesichert (gemessen: 349,1260  $m/z$ ; berechnet: 349,1257  $m/z$ ). Die Quantifizierung von DMSP in den *Dictyota* spp., unter Zuhilfenahme des internen Standards [ $^2\text{H}_6$ ]-DMSP ergaben  $71,95 \pm 13,93 \mu\text{g DMSP/g Alge}$  (Feuchtgewicht) für *D. dichotoma*, was einem Anteil von 7,2 ‰ des Feuchtgewichtes entspricht, und  $281,90 \pm 121,39 \mu\text{g DMSP/g Alge}$  (Feuchtgewicht) für *D. menstrualis*, was einem Anteil von 28,2 ‰ des Feuchtgewichtes entspricht. Obwohl *D. menstrualis* mehr DMSP enthält als die mit ihr verwandte Braunalge *D. dichotoma*, wurde in Kapitel 3.1.2.2.2 gezeigt, dass diese Alge durch eine mechanische Verwundung mehr DMS (bis zu  $50 \mu\text{g/g DMS/Alge}$ ) freisetzt als *D. menstrualis* (bis zu  $1,41 \text{ ng/g DMS/Alge}$ ). Dies führt zu der Annahme, dass in der dictyotaleanen Braunalge *D. menstrualis* weniger DMSP-Lyaseaktivität vorhanden ist.

In der Grünalge *Ulva* spp. konnte ein Gehalt von 0,2 ‰ DMSP des Feuchtgewichtes quantifiziert werden ( $1,99 \pm 0,17 \text{ mg DMSP/g Alge}$ ). Auch hier scheint bei der mangelnden verwundungsaktivierten DMS-Freisetzung nicht DMSP, sondern die Lyaseaktivität limitierend zu sein. Die für *Ulva* bestimmten Werte stimmen mit indirekt bestimmten Konzentrationen an DMSP aus der Literatur überein.<sup>[26, 83]</sup>

Die marine ubiquitäre Mikroalge *Emiliania huxleyi*, die im Plankton aller Ozeane zu finden ist und zur Ordnung der Coccolithophorales gehört, enthält DMSP. Sie stellt einen idealen Modellorganismus dar, um den globalen Schwefelkreislauf, aber auch die Rolle von Schwefelverbindungen, insbesondere von DMSP, in der chemischen Verteidigung zu untersuchen.<sup>[55, 58, 77]</sup> Die meisten DMSP-Bestimmungen in *E. huxleyi* erfolgten durch indirekte Methoden,<sup>[55, 185]</sup> die jedoch wiederum nur indirekte Informationen über den DMSP-Gehalt liefern können. In dieser Studie wurde der DMSP-Gehalt der Mikroalge direkt mit der entwickelten Methode bestimmt. Nach dem Aufkonzentrieren der Zellen durch Zentrifugieren, auf  $98.000 \pm 10.000$  Zellen in  $100 \mu\text{l}$  künstlichem Seewasser, und dem Extrahieren dieser Suspension nach Bligh und Dyer<sup>[148]</sup> konnten  $10,8 \pm 3,3 \text{ pg/Zelle DMSP}$  in *E. huxleyi* quantifiziert werden (Abb. 28).

*Emiliana huxleyi* plus IS

**Abbildung 28: Nachweis von DMSP in der marinen Mikroalge *E. huxleyi* plus 10 µg [ $^2\text{H}_6$ ]-DMSP pro Probe.**

Die hier bestimmten DMSP-Konzentrationen liegen in einem ähnlichen Bereich, wie er in der Literatur angegeben ist.<sup>[55, 185]</sup> Wolfe *et al.* zeigten, dass es zu starken Schwankungen im DMSP-Gehalt pro Zelle von *E. huxleyi* in Abhängigkeit der untersuchten Kultur kommen kann.<sup>[55]</sup> Da die gefundenen DMSP-Gehalte in *E. huxleyi* verhältnismäßig hoch sind, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hier um einen Stamm mit hoher DMSP-Lyaseaktivität handelt. Aufgrund der hohen Schwankungen des natürlichen DMSP-Gehalts könnte aber nur ein abschließender direkter Methodenvergleich zeigen, ob aufgrund der indirekten Bestimmung in anderen Untersuchungen keine signifikante Überbewertung von DMSP stattgefunden hat.

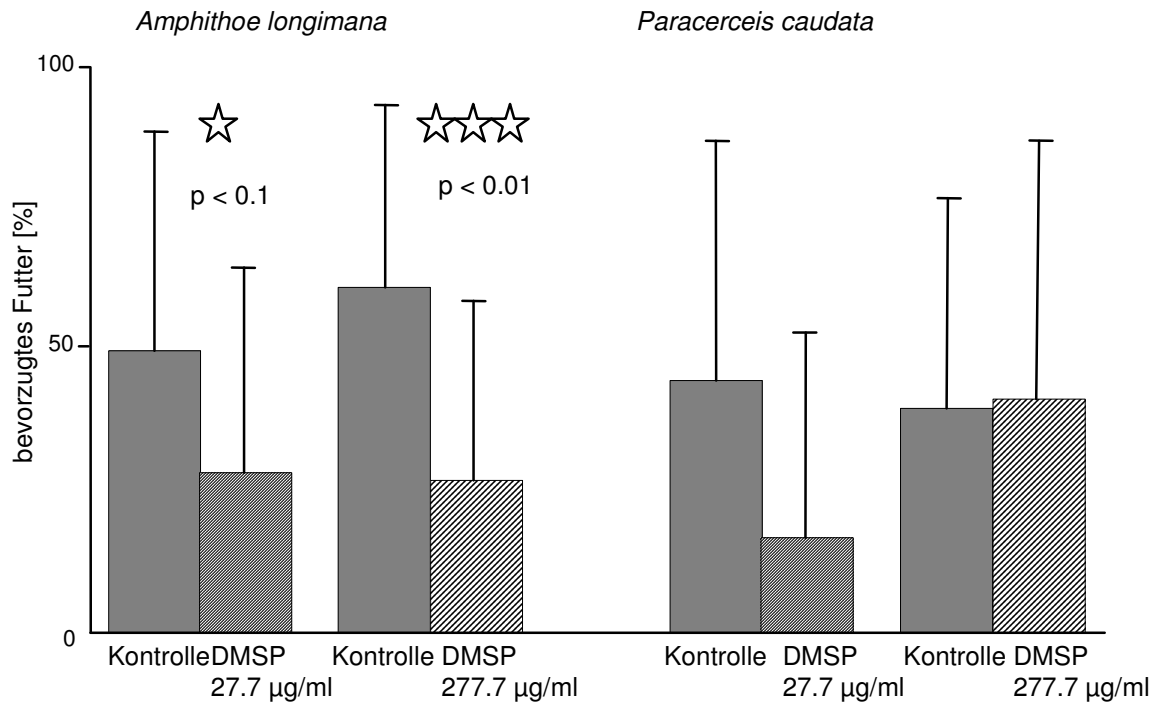
### 3.2.3 Fütterungsexperimente

Verschiedene Grünalgenarten enthalten hohe Konzentrationen an DMSP, welches Herbivore abwehrt.<sup>[26, 57, 78]</sup> DMSP-Quantifizierungen unter Verwendung der *Enteromorpha* spp. die zur Bereitung des künstlichen Futters für die Bioassays verwendet wurde, ergaben einen DMSP-Gehalt von ~ 7,4 % des Trockengewichts.

Doch auch in den Braunalgen *D. dichotoma* und *D. menstrualis* wird das DMSP durch eine mechanische Verwundung nur teilweise in DMS und Acrylsäure gespalten (Kapitel 3.1.2.2.2.2). Daraus ergibt sich die Frage, welche Rolle das DMSP in der chemischen Verteidigung der Dictyotalen Algen spielt. Zur Klärung wurden Bioassays mit den in vorhergehenden Versuchen untersuchten Flohkrebsarten *A. longimana* und *P. caudata* durchgeführt.

Die Diäten für Untersuchungen des Fraßverhaltens der Flohkrebse in Abhängigkeit der enthaltenen DMSP-Konzentration wurden aus reinem Agar hergestellt, um erhöhte DMSP-Grundgehalte aus der sonst im künstlichen Futter miteingearbeiteten *Enteromorpha* zu vermeiden. Der Agar wurde mit definierten Mengen DMSP versetzt, nach dem Erkalten wurden Stücke herausgeschnitten und in die Versuchsgefäße überführt. Kontrollproben wurden nach dem gleichen Protokoll ohne Zugabe von DMSP hergestellt. Die DMSP-Gehalte in *D. dichotoma* und *D. menstrualis* wurden im künstlichen Futter imitiert (27,7 µg/ml und 277,7 µg/ml), um auch eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit für das Verteidigungspotential von DMSP zu berücksichtigen. Für statistische Untersuchungen der Futtermessungen wurden die Standardabweichung sowie der Wilcoxon-Paar-Test herangezogen. Während der Fütterungsexperimente (Dauer 1 h) wurde alle fünf Minuten notiert, auf welcher künstlichen Futterquelle sich das Versuchstier aufhielt. Während es in den durchgeführten Futterwahlexperimenten mit den Isopoden *P. caudata* zu keinen signifikanten Veränderungen im Verhalten kam, bevorzugten die Amphipoden *A. longimana* signifikant das Kontrollfutter ohne Zusatz von DMSP (Abb. 29).



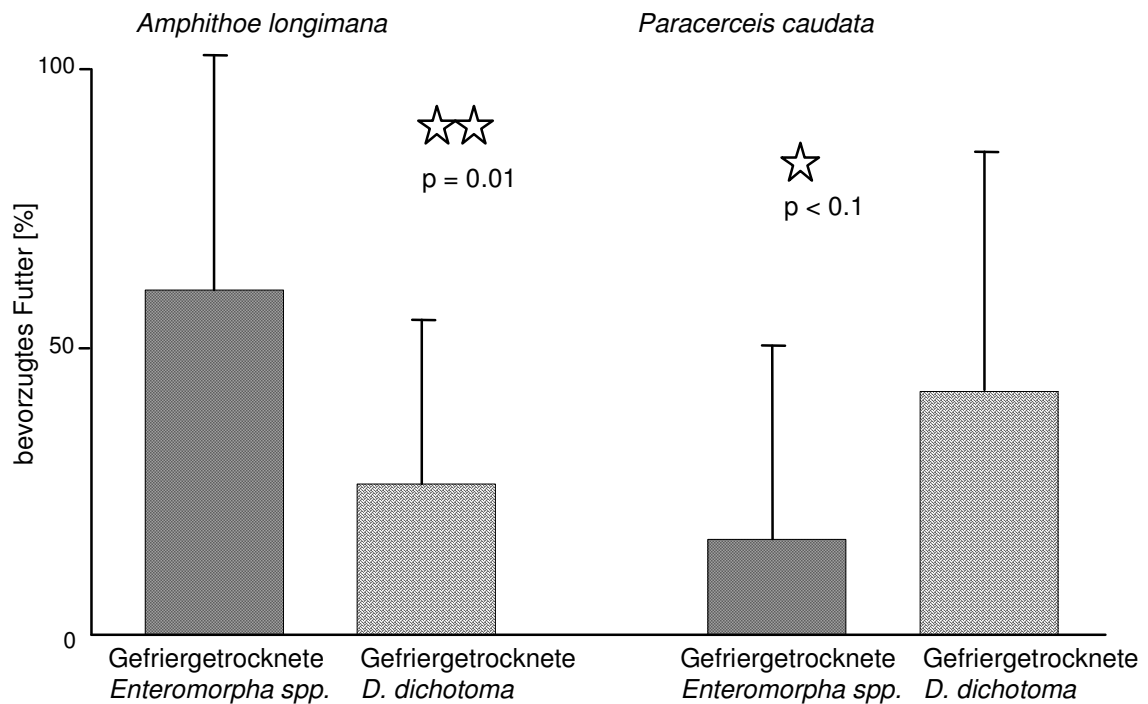


**Abbildung 29:** Verhalten der Flohkrebse bei der Futterwahl in Experimenten mit verschiedenen Konzentrationen an DMSP in künstlichem Futter (die Fehlerbalken basieren auf der Standardabweichung).

Dieser Effekt deutet auf ein konstitutives chemisches Verteidigungspotential von Dimethylsulfoniumpropionat gegenüber ausgewählten Herbivoren von Dictyotales hin.<sup>[78]</sup>

### 3.2.4 Rolle als Verteidigungsmetaboliten

Um die Bedeutung von DMSP in der chemischen Verteidigung im Vergleich zu anderen Sekundärmetaboliten zu untersuchen, wurden direkte Choice-Assays mit gefriergetrockneter *Enteromorpha* spp. (DMSP-Gehalt ~ 7,4 % des Trockengewichts) und gefriergetrockneter *D. dichotoma* (DMSP-Gehalt ~ 0,15 % des Trockengewichts) durchgeführt.



**Abbildung 30: Verhalten der Flohkrebse bei der Futterwahl in Experimenten mit gefriergetrockneter *Enteromorpha* spp. und *D. dichotoma* (die Fehlerbalken basieren auf der Standardabweichung).**

Wie in Abbildung 30 zu erkennen ist, bevorzugt die Amphipode *A. longimana* signifikant die Grünalge *Enteromorpha* spp., obwohl diese mehr DMSP enthält. Dies scheint zunächst den oben genannten Resultaten zu widersprechen, da bei diesen Futtersuchen festgestellt wurde, dass DMSP eine abwehrende Rolle gegenüber diesen Herbivoren spielt. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass diese Amphipoden bei einer Wahl zwischen der *Enteromorpha* spp. und der Braunalge *D. menstrualis*, die erstere bevorzugen.<sup>[177]</sup> Trotz des permanent vorhandenen potentiellen Verteidigungsmetaboliten (DMSP), der in *Enteromorpha* spp. in weit höheren Konzentrationen zu finden ist, wird diese Makroalge bei der Futterwahl bevorzugt. Ausschlaggebend könnten andere potentere Verteidigungsmetaboliten der Dictyotales sein. Die in dieser Alge gefundenen dominanten Terpene (18 – 21) sind bekannt dafür diese Flohkrebsart abzuwehren.<sup>[21, 136, 177]</sup>

Zusammenfassend kann daraus geschlossen werden, dass diese Terpene oder andere Metaboliten, vermutlich das wesentlich höhere konstitutive Verteidigungspotential gegenüber der Flohkrebsart *A. longimana* haben. Unter natürlichen Bedingungen, in

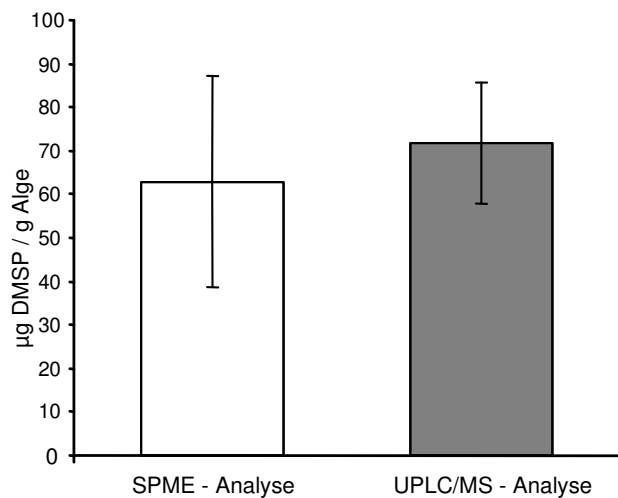
denen die Enzymaktivität der Makroalgen nicht unterdrückt wird, setzt die Verwundung der Braunalgen zusätzlich eine dynamische Verteidigungsreaktion durch die verwundungsaktivierte enzymatisch katalysierte Freisetzung von TMA, DMS und Acrylsäure (Kapitel 3.1.3) in Gang.

Die Flohkrebsart *P. caudata*, die ebenfalls die Wahl zwischen künstlichem Futter aus gefriergetrockneter *Enteromorpha* spp. und *D. dichotoma* hatte, bevorzugte die gefriergetrocknete Braunalge (Abb. 30). Gegenüber *P. caudata* hat die Grünalge das höhere konstitutive Verteidigungspotential. Der hier wesentlich höhere DMSP-Gehalt ist nicht der ausschlaggebende Grund, da dieser Metabolit keinen Einfluss auf das Fraßverhalten der Isopoden hatte (Abb. 29). Und auch die in Dictyotales bekannten Dictyole<sup>[177]</sup> haben keinen Einfluss auf *P. caudata*. Im Gegensatz zu den hier durchgeführten Versuchen, zur Untersuchung des chemischen konstitutiven Verteidigungspotentials der Makroalgen, nach Einbettung der Extrakte in künstliches Futter, gibt es auch Studien über die Futterpräferenz dieser Flohkrebsart mit intakten Algenproben.<sup>[177]</sup> Die Isopoden bevorzugten eindeutig die Grünalge *Enteromorpha* spp., wenn sie vor die Wahl zwischen der frischen Grünalge und der frischen Braunalge *D. menstrualis* gestellt werden.<sup>[177]</sup> Da in dieser Studie weder Hinweise auf eine konstitutive noch auf eine aktivierte chemische Verteidigung zu finden sind, liegt es nahe zu spekulieren, dass strukturelle Unterschiede des Algengewebes für die bevorzugte Wahl der intakten Grünalge verantwortlich sein können.

### 3.2.5 Methodenvergleich: SPME und UPLC/UV/MS

Wie bereits beschrieben kann die enzymatische Spaltung von DMSP in Dimethylsulfid (DMS) und Acrylsäure auch basenmediert geschehen.<sup>[73]</sup> Aus diesem Grund sind meist indirekte Methoden, wie GC/MS, zum Nachweis von DMSP in der Literatur zu finden.<sup>[68, 69, 83, 84, 85, 86, 87, 88]</sup> Da DMS aber auch aus einer Vielzahl anderer biologischer Vorläufer gebildet werden kann (Abb. 7),<sup>[89, 90, 91]</sup> kommt es durch diese indirekten Methoden möglicherweise zu einer hohen Konzentrationsangabe von DMSP in marinen Algen. Mit der in dieser Arbeit beschriebenen UPLC/UV/MS Methode ist es nun möglich, DMSP direkt in marinen Algen zu identifizieren und zu quantifizieren. Da in der Braunalge *D. dichotoma* das flüchtige DMS mittels SPME nachgewiesen werden konnte, ist es nun möglich diese beiden Methoden miteinander zu vergleichen, um Rückschlüsse auf DMSP als Vorläufer des nach der mechanischen Verwundung freigesetzten DMS ziehen zu können. Saisonale und geographische Schwankungen vom DMSP-Gehalt in der untersuchten Makroalge wurden ausgeschlossen, indem für den Vergleich Thalli von *D. dichotoma* aus der gleichen Kultur entnommen und zeitgleich untersucht wurden. Durch

die Zugabe von 1 ml 1 N Natronlauge in ein 4 ml-GC-Probengefäß mit *D. dichotoma* kam es zu einer starken Freisetzung von DMS. Zur Quantifizierung wurden bei diesen Untersuchungen jeweils geringe Mengen Algenprobe (ca. 10 mg) vorgelegt, um eine Signalsättigung zu vermeiden. Nach Extraktion (20 min bei Raumtemperatur) ergab sich ein indirekt bestimmter DMSP-Gehalt in *D. dichotoma* von  $62,95 \pm 24,10$   $\mu\text{g DMSP/g Alge}$  (Feuchtgewicht), während die direkte Quantifizierung von DMSP unter Verwendung der entwickelten UPLC/UV/MS-Methode  $71,95 \pm 13,93$   $\mu\text{g DMSP/g Alge}$  (Feuchtgewicht) ergab (Abb. 31).



**Abbildung 31: Methodenvergleich SPME/GC/MS und UPLC/MS bei der Quantifizierung des DMSP in *D. dichotoma*.**

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass das DMSP in der marinen Braunalge *D. dichotoma* der Hauptvorläufer des freigesetzten DMS ist, da die DMSP-Konzentrationen, die durch die verschiedenen Nachweismethoden bestimmt wurden, im Rahmen der Fehlergrenzen übereinstimmen (UPLC/UV/MS: 7,2 ‰ des Feuchtgewichtes; SPME/GC/MS: 6,3 ‰ des Feuchtgewichtes).

### 3.3 Phytohormone

Phytohormone wie z.B. Jasmonsäure (JA) oder Methyljasmonat (MeJA) regulieren innerhalb der Pflanze Stoffwechselprozesse. Sie können chemische Verteidigung, die nach wiederkehrender mechanischer Verwundung, der Wahrnehmung von Elizitoren aus Herbivoren oder durch den Angriff durch Pathogene erfolgt, induzieren.<sup>[93, 100, 101, 102]</sup>

JA und MeJA konnten auch in Algen identifiziert werden<sup>[107, 108]</sup> und es wurde beobachtet, dass MeJA das Wachstum von Mikroalgenkulturen positiv beeinflusst.<sup>[110]</sup> Bei Gaben von Jasmonsäure wurde auch die Primärmetabolitenproduktion und das Wachstum von einzelligen Grünalgen beeinflusst.<sup>[109]</sup> In diesen Studien ist aber nicht klar erkennbar, ob es sich hierbei um hormonelle Einflüsse der Metaboliten oder um generelle Stressreaktionen auf externe Gabe organischer Verbindungen handelt. Trotz intensiver Untersuchungen gibt es nur einzelne Berichte über die Rolle von JA und MeJA als Regulatoren in der chemischen Verteidigung mariner Makroalgen,<sup>[29, 111]</sup> doch der zugrunde liegende Mechanismus ist noch weitgehend ungeklärt.

Die Braunalgen *Dictyota* spp. produzieren eine Vielzahl an Sekundärstoffwechselprodukten, insbesondere Terpene (18 – 21). Die Terpenbiosynthese wird in höheren Pflanzen durch JA reguliert, was zur Produktion von Stoffen mit chemischem Verteidigungspotential führen kann.<sup>[186, 187, 188, 189, 190]</sup> Daraus ergibt sich die Frage, ob JA oder MeJA auch einen Einfluss auf die Terpenbiosynthese der Dictyotales und deren chemisches Verteidigungspotential haben kann.

#### 3.3.1 Vorkommen und Rolle von Jasmonsäure in *D. dichotoma*

##### 3.3.1.1 Ionenaustausch-Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion zur Identifizierung von Oxylipinen in der Braunalge *D. dichotoma* wurde nach dem von Birgit Schulze am MPI für chemische Ökologie, Jena, entwickelten Protokoll durchgeführt.<sup>[191]</sup> Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer *in situ* Bildung von stabilen PFB-Oximen durch den Einsatz von PFBHA als Derivatisierungsreagenz gleich zu Beginn der Aufbereitung der Proben. Durch Methylierung mit Diazomethan wird die Extraktion abgeschlossen. Neben für Dictyotales charakteristischen freien Fettsäuren<sup>[124, 192, 193, 194, 195, 196, 197]</sup> konnte trotz einer Nachweisgrenze von 1 pg derivatisierte JA/ $\mu$ l Injektionsvolumen keine JA in *D. dichotoma* identifiziert werden (Abb. 32).<sup>[191]</sup> Die hier durchgeführte Analytik erfasst allerdings kein MeJA. Da diese Verbindung allerdings in CLS- und SPME-Experimenten (Kap. 3.1.2.2) erfasst worden wäre, kann man ein erhöhtes Vorkommen des Methylesters auch

ausschließen. Der Nachweis der Fettsäuren erfolgte durch den Einsatz einer externen Fettsäuremethylesterstandardmischung über die Retentionszeiten.

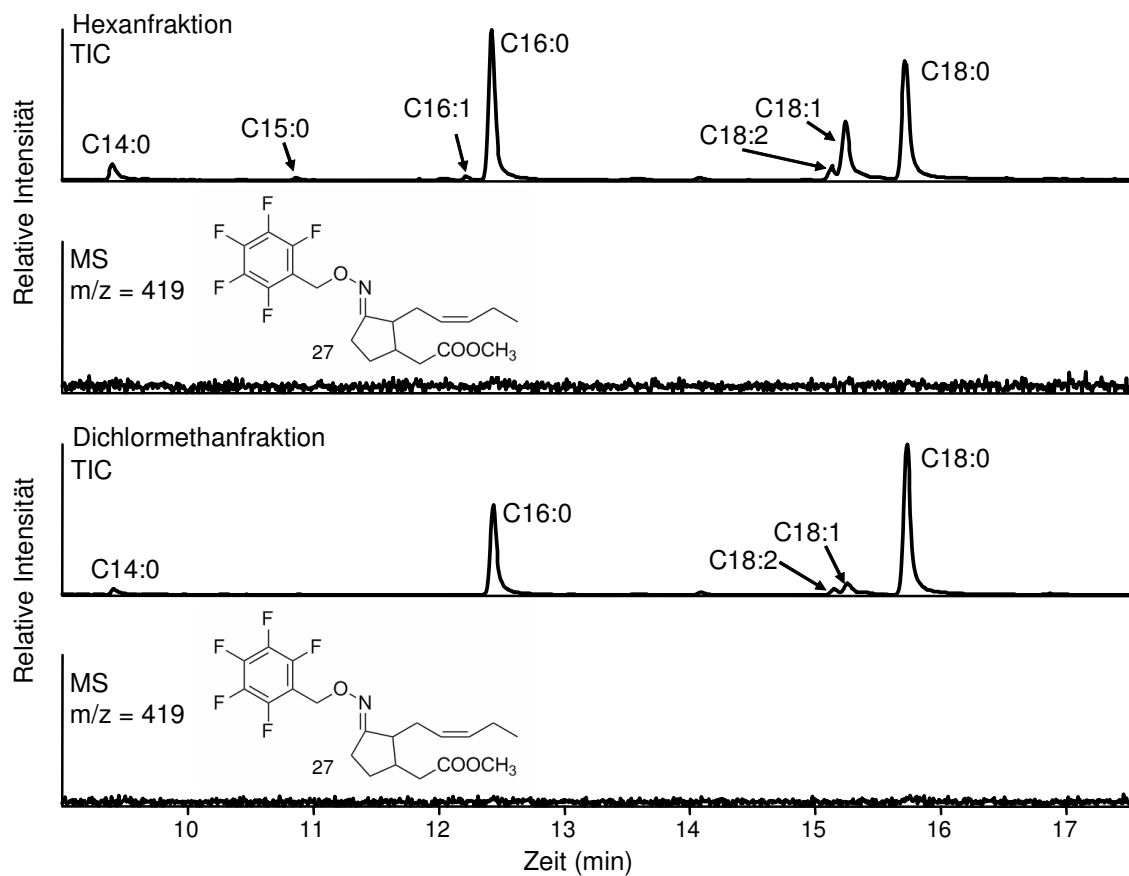


Abbildung 32: Freie Fettsäuren in *D. dichotoma*, angereichert durch Festphasenextraktion. Ionenspur von derivatisierter Jasmonsäure (27).

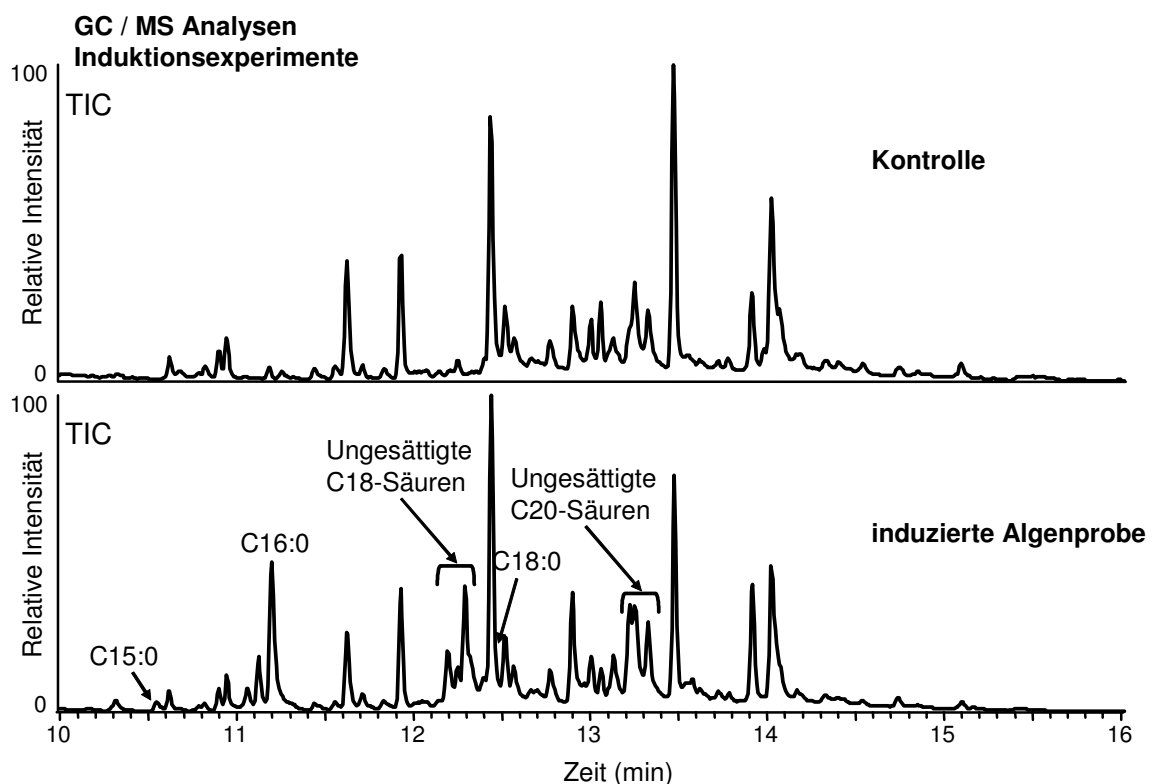
### 3.3.1.2 Induktionsexperimente

#### 3.3.1.2.1 *D. dichotoma*

Obwohl in intakten *D. dichotoma* keine Jasmonsäure nachgewiesen werden konnte, stellt sich die Frage, ob die Induktoren JA und MeJA die Biosynthese möglicher Verteidigungsmetaboliten beeinflussen können. Aus höheren Pflanzen ist bekannt, dass nach Herbivorie die JA-Level signifikant hochreguliert werden und somit erst hormonell aktive Konzentrationen erreicht werden.<sup>[189]</sup> Da für die oben beschriebenen JA Extraktionen allerdings intakte unbefallene *D. dichotoma* genommen wurden, ist nicht auszuschließen, dass unter Stressbedingungen JA und MeJA eine Rolle spielen. Für Studien über den potentiellen Einfluss von JA in induzierten Verteidigungsreaktionen in der marinen Braunalge *D. dichotoma*, wurden verschiedene Induktionsexperimente durchgeführt. Die zentrale Frage dabei war, ob verschiedene Elizitoren, wie JA oder

MeJA, einen Einfluss auf den Sekundärstoffwechsel und damit auch auf das Verteidigungspotential haben. Als Kontrolle wurde die lipophile, hormoninaktive LEA eingesetzt. Die Elizitoren wurden zunächst in Methanol gelöst und in einzelne Probenbehälter mit künstlichem Seewasser gegeben. Die Induzierung wurde durch Zugabe von Thalli der Braunalge gestartet und erfolgte in verschiedenen Konzentrationen (10, 100, 500 und 1000 µg Elizitor/ml künstliches Seewasser). Des Weiteren wurden verschiedene Induktionszeiten getestet (2, 12, 24, 48 und 72 Stunden). Danach wurden die *D. dichotoma* Proben vorsichtig mit Seewasser gewaschen, gewogen und für die sich anschließenden GC/MS Analysen extrahiert.

Eine signifikante Veränderung in dem metabolischen Profil der terpenoiden Sekundärmetaboliten von *D. dichotoma* war, trotz höherer Konzentrationen der Elizitoren, nach der Stimulierung der Braunalge nicht reproduzierbar beobachtbar. Eine Induzierung der Biosynthese von Sekundärmetaboliten in *D. dichotoma* ist durch die getesteten Pflanzenhormone nicht möglich (Abb. 33).



**Abbildung 33: Exemplarisches Beispiel für den GC/MS-Vergleich von induzierten derivatisierten *D. dichotoma* Proben (1 mg/ml JA/Seewasser, 48 h) mit Kontrollproben.**

Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit JA, MeJA aber auch mit LEA zu einer Hochregulierung verschiedener freier Fettsäuren (Abb. 33). Während bei niedrigen

Konzentrationen (100 µg Elizitor/ml Seewasser) keine signifikanten Unterschiede feststellbar waren, kam es bei erhöhtem Stress für die Alge, ab Konzentrationen von 500 µg/ml, zu einer signifikanten Steigerung des Gehalts an freien Fettsäuren in *D. dichotoma* (Abb. 33). Die Reaktion der Braunalge fand bei diesen hohen Konzentrationen erst nach 24 Stunden statt. Die Belastung durch die Phytohormone führte bei einer Konzentration ab 1 mg Elizitor/ml Seewasser zur Depigmentierung und bei einer Behandlungsdauer von mehr als 48 Stunden zum Absterben. Nach der Behandlung mit MeJA ( $\geq 500$  µg/ml) konnten zwar die meisten freien Fettsäuren nachgewiesen werden, jedoch war hier der Stress für *D. dichotoma* am größten, was sich durch die starke Depigmentierung der Thalli nach mehr als 48 Stunden bemerkbar machte. Aufgrund der einsetzenden Seneszenz wurde von einer Quantifizierung der freien Fettsäuren für die Induktionsexperimente mit einer Versuchsdauer von 72 Stunden abgesehen.

Eine Behandlung der *D. dichotoma* Proben mit höheren Konzentrationen ( $\geq 500$  µg/ml) der Elizitoren JA, MeJA und LEA führte zu einer statistisch signifikanten Freisetzung der Fettsäuren C16:0, C16:1 und C18:1 (Tab. 3). Ein Anstieg der gesättigten Fettsäuren, Laurinsäure (C12:0), Myristinsäure (C14:0), Stearinsäure (C18:0), Arachinsäure (C20:0) und Behensäure (C22:0) und der ungesättigten Fettsäuren, LEA (C18:3), Stearidonsäure (C18:4), Arachidonsäure (C20:4), sowie Eicosapentaensäure (C20:5, EPA) wurde nach einer Induktionsdauer von mehr als 24 h beobachtet, konnte aber nicht statistisch signifikant reproduziert werden (Anhang).



	<b>Palmitinsäure (C16:0)</b>	<b>Palmitoleinsäure (C16:1)</b>	<b>Ölsäure (C18:1)</b>
	FAME/ <i>D. dichotoma</i>	FAME/ <i>D. dichotoma</i>	FAME/ <i>D. dichotoma</i>
	[µg/g]	[µg/g]	[µg/g]
<b>Kontrolle</b>	0,20 – 1,42	0,00 – 0,27	0,00 – 0,88
<b>Behandlung mit JA</b> ≥ 500 µg/ml Elizior/Medium ≥ 24 h Induktionsdauer	1,77 – 24,96	1,75 – 135,26	1,71 – 33,94

<b>Kontrolle</b>	0,42 – 1,42
<b>Behandlung mit MeJA</b> ≥ 500 µg/ml Elizior/Medium ≥ 24 h Induktionsdauer	2,39 – 7,76

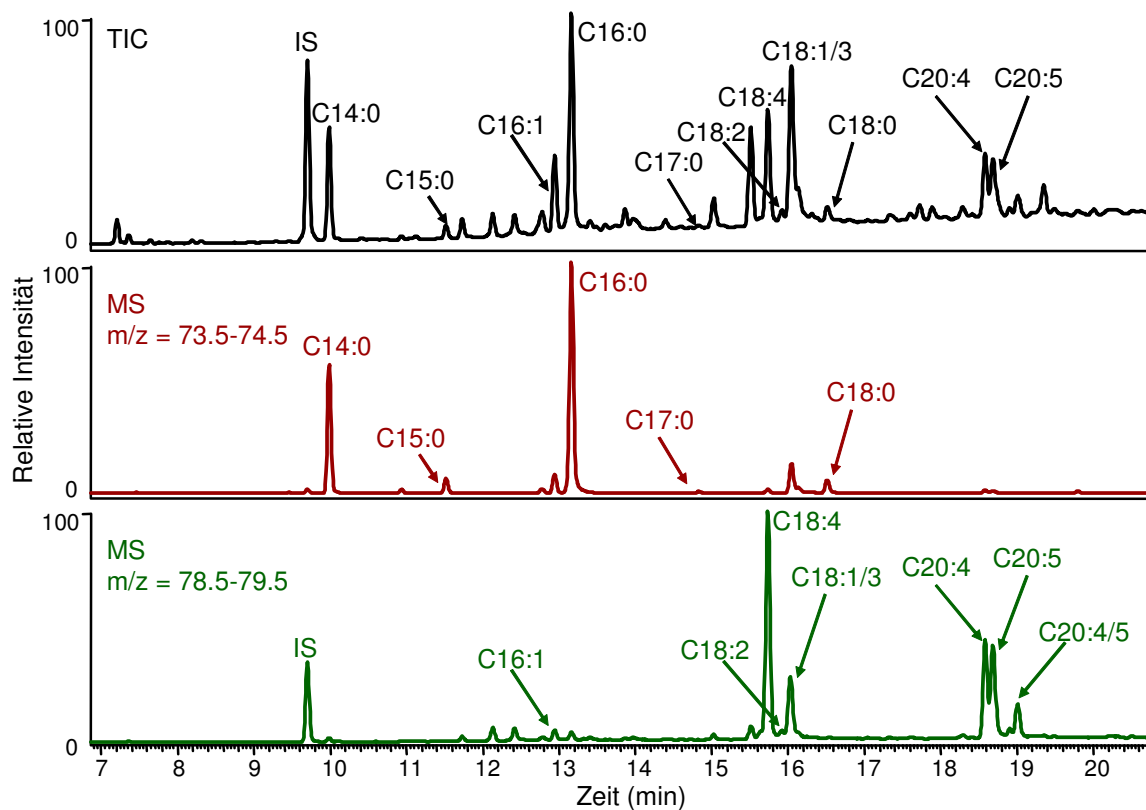
<b>Kontrolle</b>	0,20 – 1,42	0,00
<b>Behandlung mit LEA</b> ≥ 500 µg/ml Elizior/Medium ≥ 24 h Induktionsdauer	0,63 – 32,58	95,20 – 168,51

**Tabelle 3: Fettsäuren in *D. dichotoma*, die durch die Behandlung mit JA, MeJA und LEA hochreguliert wurden, bei hohen Konzentrationen (≥ 500 µg/ml) und ausreichender Induktionsdauer (≥ 24 h).**

Die Ergebnisse zeigen, dass Induktionen von *D. dichotoma* mit den Elizitoren JA und MeJA keine hormoninduzierte spezifische Veränderung im metabolischen Profil hervorrufen, da auch die hormonell inaktive LEA, die vergleichbare physikalische Eigenschaften zu JA hat, ähnliche Reaktionen bewirkt. Die hohen Konzentrationen von lipophilen Verbindungen (≥ 500 µg/ml) und die lange Induktionsdauer (≥ 24 h) bedeuten Stress für die Alge, welcher wahrscheinlich auf Grund von Membranschädigungen eine Hochregulierung der freien Fettsäuren zur Folge hat. Da durch mechanische Verwundung keine Veränderung des Gehalts an freien Fettsäuren hervorgerufen werden kann (Kapitel 3.1.2), liegt die Vermutung nahe, dass durch eine unspezifische Änderung der Lipophilie des Mediums Membranstress zur Freisetzung von Fettsäuren führt.

### 3.3.1.3 Umesterung der Fettsäuren in *D. dichotoma*

Eine effektive Methode für den Nachweis der gesamten in *D. dichotoma* enthaltenen Fettsäuren stellt die Umesterung der Fettsäuren durch Acetylchlorid/Methanol (Kapitel 6.4.4.1), mit anschließender GC/MS Analyse dar (Abb. 34). [ $^2\text{H}_{27}$ ]-Myristinsäure wurde als interner Standard verwendet und der Identitätsnachweis der Fettsäuren erfolgte mit einer externen Fettsäuremethylesterstandardmischung über die Retentionszeiten.



**Abbildung 34:** Nachgewiesene Fettsäuremethylester in *D. dichotoma* nach Umesterung mit Acetylchlorid/Methanol.

In der Braunalge *D. dichotoma*, die an der atlantischen Küste in der Nähe von Roscoff, Frankreich, gesammelt wurde, konnte eine Vielzahl an gesättigten und ungesättigten Fettsäuren, wie Myristinsäure (C14:0), Pentadecansäure (C15:0), Palmitinsäure (C16:0), Palmitoleinsäure (C16:1), Heptadecansäure (C17:0), Stearinsäure (C18:0), Ölsäure (C18:1), Linolsäure (C18:2), LEA (C18:3), Octadecatetraensäure (C18:4), Arachidonsäure (C20:4) sowie Eicosapentaensäure (C20:5, EPA) identifiziert werden (Abb. 34), wobei keine Isomere unterschieden wurden.

Bei Induktionsexperimenten mit JA, MeJA und LEA wurden bei hohen Konzentrationen ( $\geq 500 \mu\text{g/ml}$ ) und ausreichender Induktionsdauer ( $\geq 24 \text{ h}$ ) Palmitinsäure (C16:0), Palmitoleinsäure (C16:1) und Ölsäure (C18:1) signifikant hochreguliert (Tab. 3). Die Untersuchung der Gesamtfettsäuren zeigt, dass diese Verbindungen nicht so dominant sind, dass eine unselektive Freisetzung von Fettsäuren aus Lipiden für diese Reaktion verantwortlich gemacht werden kann. Untersuchungen über die Verteilung der Fettsäuren in den einzelnen Lipiden von *D. dichotoma* zeigten, dass die Palmitoleinsäure (C16:1 n-6) hauptsächlich in den Glycolipiden und in den Betainlipiden zu finden ist,<sup>[124]</sup> jedoch ist diese Fettsäure auch in den meisten anderen Lipidklassen enthalten.<sup>[193]</sup> Das Lipid mit den meisten gesättigten Fettsäuren ist das Sulfolipid Sulfochinovosyldiacylglycerol (SQDG), in welchem hohe Anteile von Palmitinsäure (C16:0) und Myristinsäure (C14:0), aber auch C18:1 nachgewiesen wurden.<sup>[124, 129]</sup> Diacylglycerylhydroxymethyltrimethyl- $\beta$ -alanin (DGTA) macht einen Grossteil der Lipide in *D. dichotoma* aus. Es zeichnet sich durch einen höheren Gehalt an PUFAs aus und dessen Bestandteile sind die Fettsäuren C16:0, C16:1, C18:1, C18:2 und C20:4.<sup>[124, 129, 193, 194]</sup> Da die durch JA, MeJA und LEA freigesetzten Fettsäuren in verschiedenen Lipiden nachgewiesen wurden, kann aufgrund der hier durchgeführten Experimente für den Anstieg von C16:0, C16:1 und C18:1 keine spezifische Lipase verantwortlich gemacht werden.

### 3.3.2 Weitere marine Braunalgen

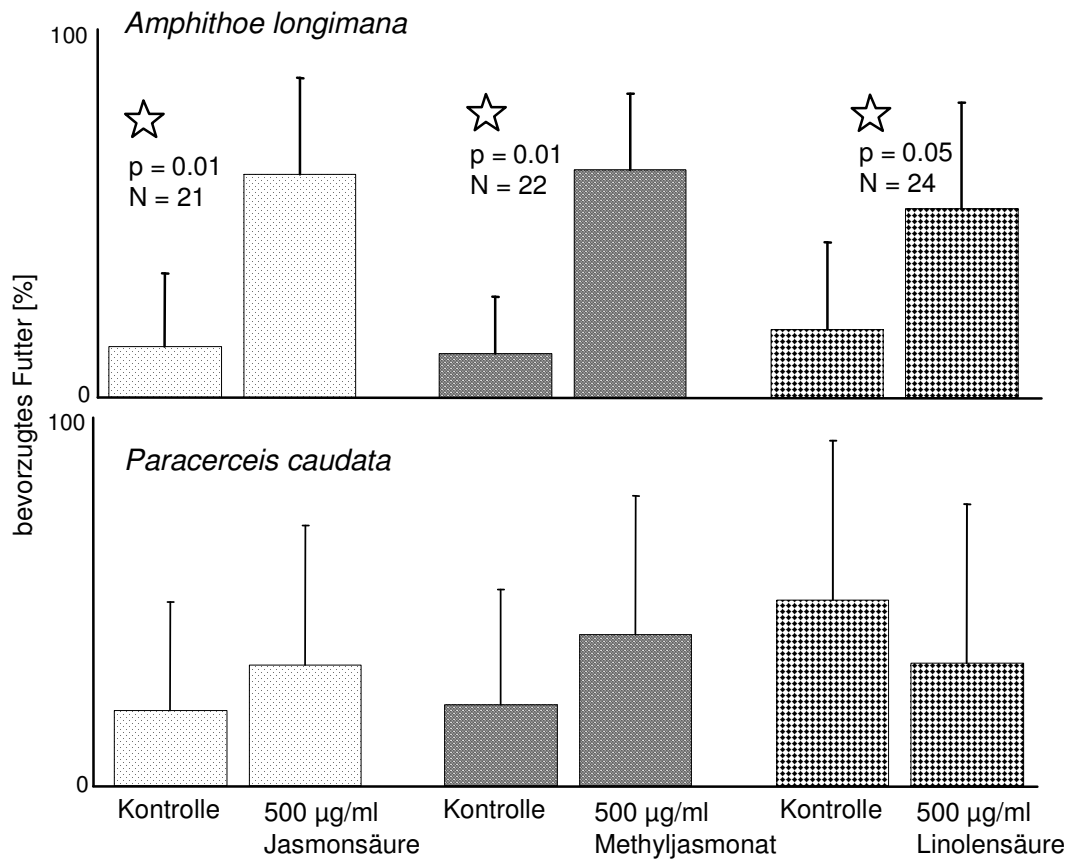
In marinen Rot- und Grünalgen wurden JA und MeJA nachgewiesen<sup>[107, 108]</sup> und ihre Rolle in der induzierten chemischen Verteidigung diskutiert.<sup>[29, 111]</sup> Um zu sehen, ob diese Verbindung nur bei *Dictyota spp.* keine Rolle spielt oder generell nicht in Braunalgen verbreitet ist, wurden verschiedene andere Braunalgen mit JA und MeJA induziert (500  $\mu\text{g}$  Elizitor/ml künstliches Seewasser, 12 und 24 Stunden) und die lipophile, hormoninaktive LEA (500  $\mu\text{g/ml}$  künstliches Seewasser, 12 und 24 Stunden) wurde als Kontrolle eingesetzt. Die Makroalgen *E. fasciculatus*, *C. peregrina*, *F. vesiculosus*, *H. elongata*, *L. saccharina* und *S. muticum*, die ebenfalls in dem Habitat der Braunalge *D. dichotoma* vorkommen, wurden behandelt.

Es konnte, wie auch schon bei *D. dichotoma*, keine Veränderungen in der Struktur und Verteilung der Sekundärmetaboliten durch Behandlung mit diesen Verbindungen induziert werden. Mit Ausnahme von *S. muticum* wurden allerdings teilweise erhöhte Gehalte an verschiedenen freien Fettsäuren nach der Induktion detektiert (Tabelle im Anhang). In *E. fasciculatus* wurde beispielsweise die ungesättigte Linolsäure (C18:2) nach 24 Stunden Induktionszeit mit JA und MeJA um ein dreifaches hochreguliert und mit LEA wurde ein dreifacher Anstieg der Laurinsäure (C12:0) nachgewiesen. Durch Inkubationsexperimente der Braunalge *L. saccharina* mit JA und LEA wurde die Palmitinsäure (C16:0) stark

hochreguliert, während die Induktion mit MeJA keine Veränderung zur Folge hatte. Bei den durchgeführten Experimenten kam es zu starken Schwankungen bei der Quantifizierung der hochregulierten Fettsäuren, was wiederum für eine unspezifische Freisetzung von Fettsäuren nach Stress und nicht für eine spezifische hormoninduzierte Reaktion spricht.

### 3.3.3 Fütterungsexperimente

Obwohl keine hormonelle Aktivität der bekannten Phytohormone bei *D. dichotoma* festgestellt werden konnte, stellt die Freisetzung von Fettsäuren prinzipiell eine Möglichkeit der chemischen Verteidigung dar.<sup>[158]</sup> Der Einfluss der Behandlung von *D. dichotoma* Proben mit JA, MeJA und LEA auf das Fraßverhalten von Herbivoren stand deshalb im Interesse der folgenden Fütterungsexperimente. Für diese Versuche wurden mit induzierten und nicht induzierten gefriergetrockneten *D. dichotoma* Proben Futterwahlexperimente durchgeführt. Zunächst wurden Proben von *D. dichotoma* mit den Elizitoren Jasmonsäure, Methyljasmonat und Linolensäure in einer Konzentration von 500 µg/ml für 30 Stunden behandelt. Anschließend wurden diese Algenproben sowie die mit MeOH behandelten *D. dichotoma* Proben gefriergetrocknet, zu einem feinen Pulver zerstoßen und wie oben beschrieben zu Diäten für die Versuchstiere weiterverarbeitet. Nach Zugabe der Amphipoden *A. longimana* oder Isopoden *P. caudata* in das jeweilige Gefäß mit behandeltem und unbehandeltem Futter wurde über die Dauer des Experimentes (60 min) alle fünf Minuten notiert, welches Futter (Kontrolle oder induzierte *D. dichotoma*) die Flohkrebse bevorzugten. Die Amphipoden zeigten für alle drei Elizitorbehandlungen (JA, MeJA und LEA) eine signifikante Präferenz für das künstliche Futter aus induzierter *D. dichotoma* ( $P \leq 0,05$ , Wilcoxon-Paar-Test, Abb. 35, oben). Daraus kann geschlossen werden, dass durch die Behandlung keine chemische Verteidigung induziert wird und dass die freien Fettsäuren keine fraßhemmenden Einflüsse auf diesen Herbivoren haben. Es kann sein, dass die hochregulierten Fettsäuren das künstliche Futter attraktiver machen. Eventuell signalisieren sie gestresstes Gewebe und damit eine Futteralge deren Verteidigung geschwächt ist. Im Verhalten der Isopoden *P. caudata* dagegen konnten keine eindeutigen Unterschiede während dieser Futterwahlversuche festgestellt werden (Abb. 35, unten).

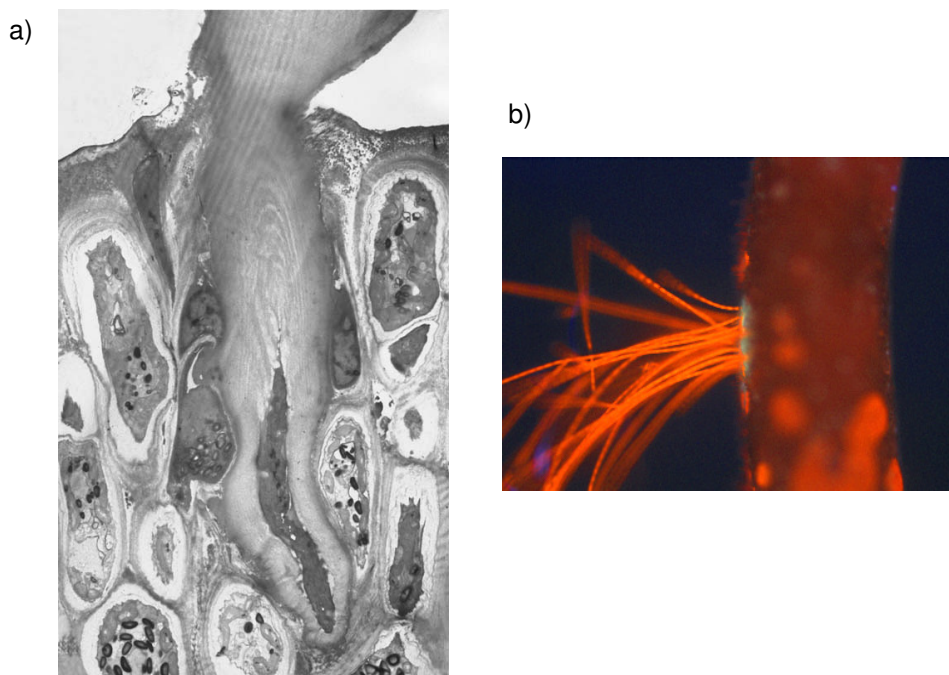


**Abbildung 35: Futterwahlexperimente mit Amphipoden (oben) und Isopoden (unten) mit induzierten gefriergetrockneten Proben von *D. dichotoma* (die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder).**

Im Gegensatz zu der in der Literatur vertretenen Annahme, dass Jasmonsäure und die verwandten Oxylipine eine natürliche Antwort von Makroalgen auf Herbivorie oder den Angriff von Krankheitserregern mediiert,<sup>[29, 110, 111]</sup> findet sich bei der untersuchten *D. dichotoma* keine induzierte Verteidigung. Arnold et al. konnten eine durch MeJA induzierte, der durch Herbivorie ausgelösten ähnliche, Hochregulierung der Phlorotanninproduktion in *F. vesiculosus* innerhalb von 10 – 14 Tage zeigen,<sup>[111]</sup> doch wurde hier kein allgemein gültiger Mechanismus für die Wirkung von Phytohormonen gezeigt.

### 3.4 Rotalge *Gracilaria chilensis*

Die Besiedelung von *G. chilensis* durch epiphytische und endophytische Algen, wie z.B. die Grünalge *A. operculata*, hat einen negativen Effekt auf die Qualität des aus der Rotalge hergestellten Agars. Während es über die Ansiedlung, Anlagerung und Keimung von epiphytischen Algensporen Studien gibt,<sup>[142, 143]</sup> ist über die frühen chemischen und biochemischen Prozesse während der Besiedlung der Wirtspflanze wenig bekannt. Eine Vielzahl von Metaboliten in Makroalgen können die Kolonisierung durch andere Algen beeinflussen und komplexe Wechselwirkungen können während eines Ansiedlungsprozesses in den Algen stattfinden.<sup>[144, 145, 146]</sup> In dieser Arbeit wurden Untersuchungen bezüglich der, durch Lipasen gesteuerten, verwundungsaktivierten Verteidigung der marinen Alge *G. chilensis* durchgeführt.

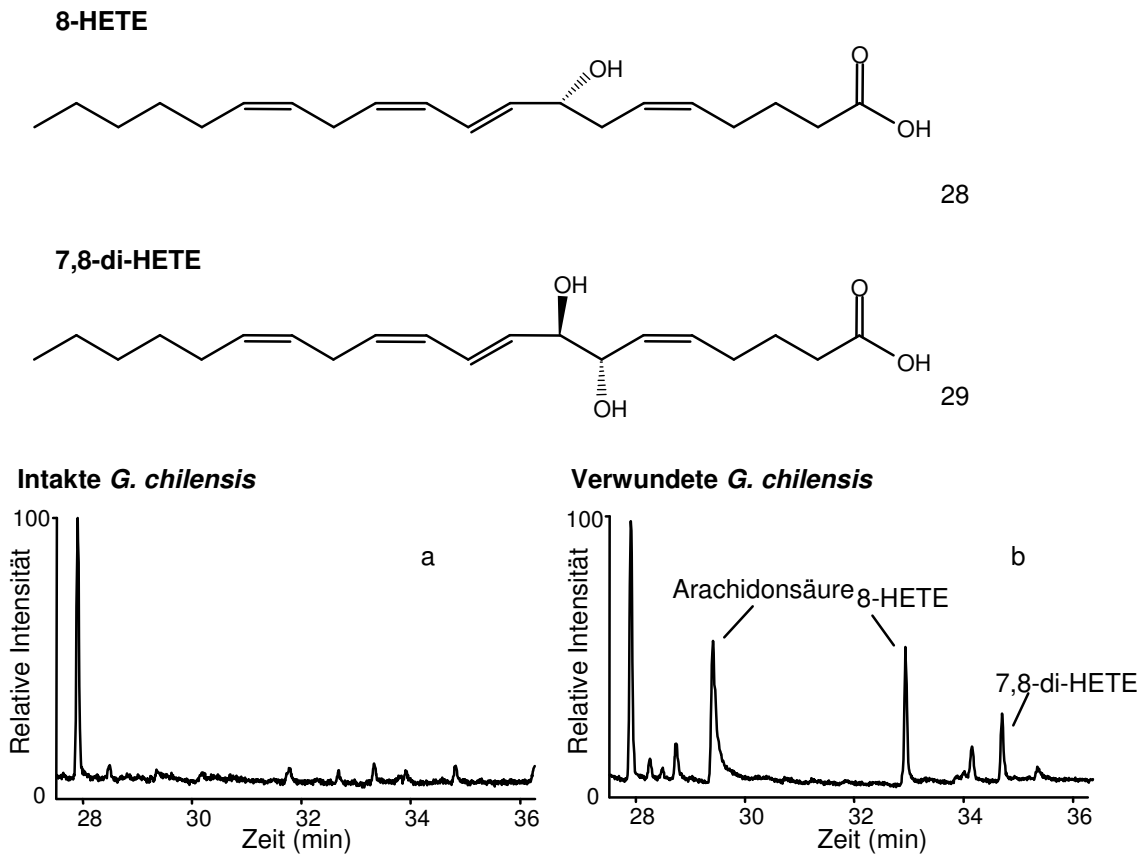


**Abbildung 36: Darstellung der Besiedelung von *G. chilensis* durch Epiphyten. Quelle a) elektronenmikroskopische Aufnahme von P. Leonardi,<sup>[198]</sup> b) Epifluoreszenz-Aufnahme von F. Weinberger, Station de Biologique, Roscoff, Frankreich**

#### 3.4.1 Verwundungsaktivierte Verteidigung in *G. chilensis*

Verwundungsaktivierte Reaktionen im Sekundärmetabolismus der Rotalge *G. chilensis*, wurden unter Verwendung eines in der Arbeitsgruppe von Prof. Pohnert entwickelten Extraktionsprotokolls untersucht.<sup>[199]</sup> Die mechanische Verwundung der Rotalge führt zu einer erhöhten Produktion von Arachidonsäure, 8*R*-Hydroxyeicosatetraensäure (8-HETE)

und 7*S*,8*R*-Dihydroxyeicosatetraensäure (7,8-di-HETE) (Abb. 37). Diese Verbindungen konnten durch den Vergleich mit synthetischen Standards oder durch Aufreinigung und anschließenden NMR-basierte Strukturaufklärung identifiziert werden (Abb. 37).<sup>[199]</sup>



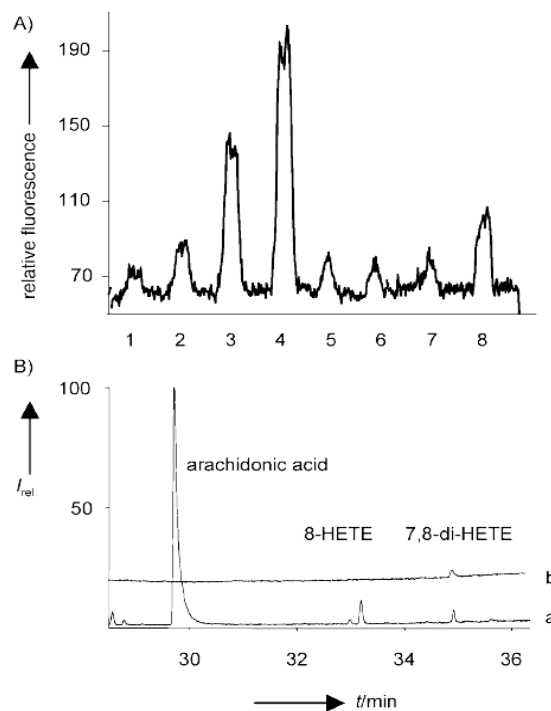
**Abbildung 37:** Oben: Darstellung der 8*R*-Hydroxyeicosatetraensäure (8-HETE 28) und 7*S*,8*R*-Hydroxyeicosatetraensäure (7,8-di-HETE 29); Unten: Verwundungsaktivierte Freisetzung von Arachidonsäure und den hydroxylierten Fettsäuren (GC/MS Analyse derivatisierter Extrakte von *G. chilensis*); a) Extrakt schockgefrorener Alge; b) Extrakt der Algenprobe 5 min nach mechanischer Verwundung.

### 3.4.2 Einfluss von Lipasen auf die oxolipinvermittelte verwundungsaktivierte Verteidigung

In verschiedenen marinen Rotalgen sind neben C<sub>20</sub>-Fettsäuren auch die von ihnen abgeleiteten Oxylipine identifiziert worden.<sup>[118, 119]</sup> Während 8-HETE in vielen Rotalgen nachgewiesen werden konnte, sind dihydroxylierte Fettsäuren nicht sehr weit verbreitet, 7,8-di-HETE wurde nur in *G. chilensis* nachgewiesen.

Gespeicherte Lipide können durch verwundungsaktivierte Spaltung in freie Fettsäuren umgewandelt werden. Aus diesen freien Fettsäuren können durch Lipoxygenase

abhängige Prozesse hydroxylierte und vicinal dihydroxylierte Metabolite gebildet werden.<sup>[200, 201]</sup> In verwundeten *G. chilensis* Proben konnte Phospholipase A<sub>2</sub> Aktivität nachgewiesen werden.<sup>[199]</sup> Phospholipasen A<sub>2</sub> sind Enzyme des Phosphoglycerid-Abbaus. Das Enzym aus der Familie der Esterasen, katalysiert die hydrolytische Spaltung von Phospholipiden am zweiten Kohlenstoff-Atom ( $\beta$ -C-Atom) des Glycerids. Dabei kommt es bei *G. chilensis* zur Freisetzung von Arachidonsäure (C20:4). Eine Verwundung der Algen in Gegenwart eines Phospholipase A<sub>2</sub> Inhibitors verhinderte fast vollständig die Freisetzung von Arachidonsäure und auch die Produktion von 8-HETE während 7,8-di-HETE trotzdem nachgewiesen werden konnte (Abb. 38).<sup>[199]</sup>

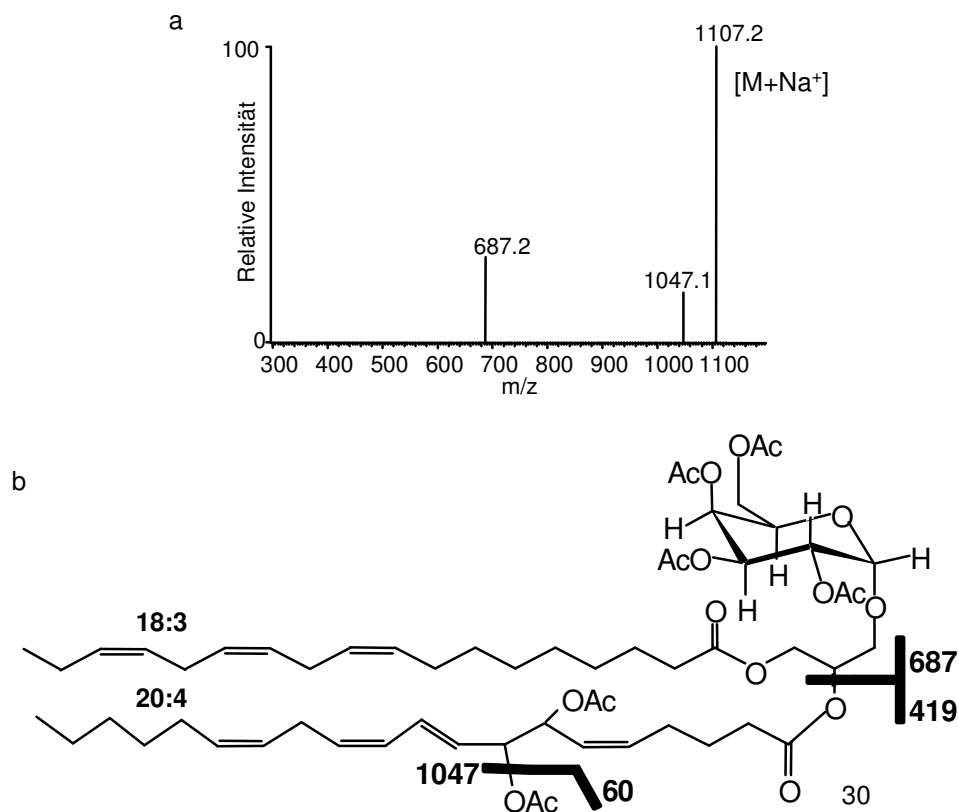


**Abbildung 38: A) Darstellung der Phospholipasetätigkeit nach dem Verwunden von *G. chilensis* nach Gabe von BODIPY Fluoreszenz auf Dünnschichtchromatogrammen. Probe 1 – 4: 0, 2, 5 und 10 Minuten nach Verwundung; Probe 5 und 6: gekochte Kontrollen 0 und 20 Minuten nach Inkubation; Probe 7 und 8: 0 und 20 Minuten nach Verwundung in Anwesenheit des Phospholipase-Inhibitors Methylarachidonylfluorophosphat (MAFP). B) Effekt des Phospholipase-Inhibitors Aristolochiasäure auf die verwundungsaktivierte Freisetzung von Arachidonsäure und Oxylipine (a = Kontrolle; b = Alge in Gegenwart von Aristolochiasäure verwundet).<sup>[199]</sup>**

Auch nach Applikation von [<sup>2</sup>H<sub>8</sub>]-Arachidonsäure konnte neben [<sup>2</sup>H<sub>8</sub>]-8-HETE keine deuterierte 7,8-di-HETE detektiert werden. Diese beiden Ergebnisse zeigen, dass die 7,8-di-HETE nach Verwundung nicht aus der freien Arachidonsäure (C20:4) gebildet wird. Eine alternative Quelle wäre die verwundungsaktivierte Freisetzung von lipidgebundener



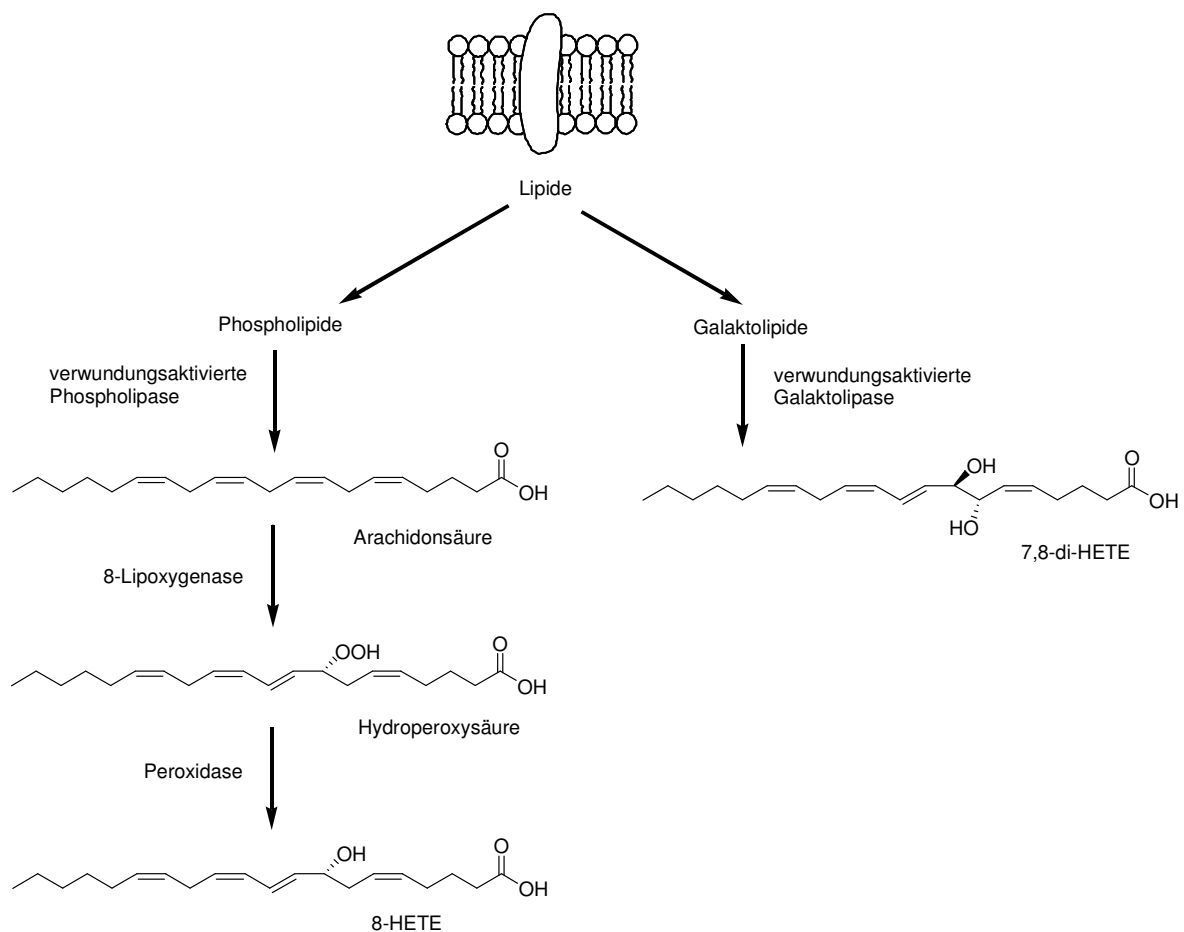
7,8-di-HETE. Kandidaten für di-HETE-haltige Speicherlipide sind Galaktolipide. So konnte schon in der verwandten Rotalge *Gracilaria lemaneiformis* gezeigt werden, dass die zu 7,8-di-HETE-strukturverwandte vicinal hydroxylierte 12,13-di-HETE an Galaktolipide gebunden ist.<sup>[202]</sup> Zum Nachweis von Galaktolipiden wurde *G. chilensis* nach dem von Jiang und Gerwick etablierten Protokoll aufgearbeitet.<sup>[202]</sup> 30 g *G. chilensis* wurden schockgefroren, extrahiert (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 2:1), getrocknet und über Nacht mit 1 mol Überschuss Essigsäureanhydrid in Pyridin acetyliert. Nach einer fraktionierten chromatographischen Reinigung an Kieselgel, konnte die Struktur der extrahierten Galaktolipide dann durch HPLC/UV/MS<sup>n</sup> basierend auf einem Protokoll von Guella *et al.*<sup>[203]</sup> vorgeschlagen werden (Abb. 39).



**Abbildung 39: Strukturvorschlag für ein Galaktolipid in *G. chilensis*, das mit den spektroskopischen Daten in Einklang steht. a) MS<sup>n</sup> Experimente, b) Peracetyliertes Monogalaktosyldiglycerid mit Linolensäure (C18:3) und einer di-HETE haltigen C20:4.**

Das MS Spektrum (ESI positiv) zeigte [M+Na<sup>+</sup>]-Pseudomolekülonen, welche mit der Masse von di-HETE haltigen Galaktolipiden übereinstimmten. Und auch das UV-Spektrum dieser Metaboliten zeigte bei den entsprechenden Retentionszeiten ein charakteristisches Maximum der konjugierten Diene bei 235 nm. Abbildung 41a zeigt die

Fragmentierung während der MS<sup>n</sup> Experimente, bei denen die charakteristischen Massen in Übereinstimmung mit dem Verlust einer acetylierten di-HETE detektiert werden konnten. Abbildung 41b gibt einen plausiblen Strukturvorschlag für ein Galaktolipid in *G. chilensis*, wobei jedoch die Position der Fettsäuren, der di-Hydroxygruppen und der Doppelbindungen mit der vorliegenden Methode nicht eindeutig geklärt werden konnten. Diese Ergebnisse zeigen eine mögliche Beteiligung einer Galaktolipase, welche zusätzlich zur Phospholipase nach der mechanischen Verwundung von *G. chilensis* aktiviert wird und für die direkte Freisetzung von 7,8-di-HETE verantwortlich sein kann (Abb. 40).



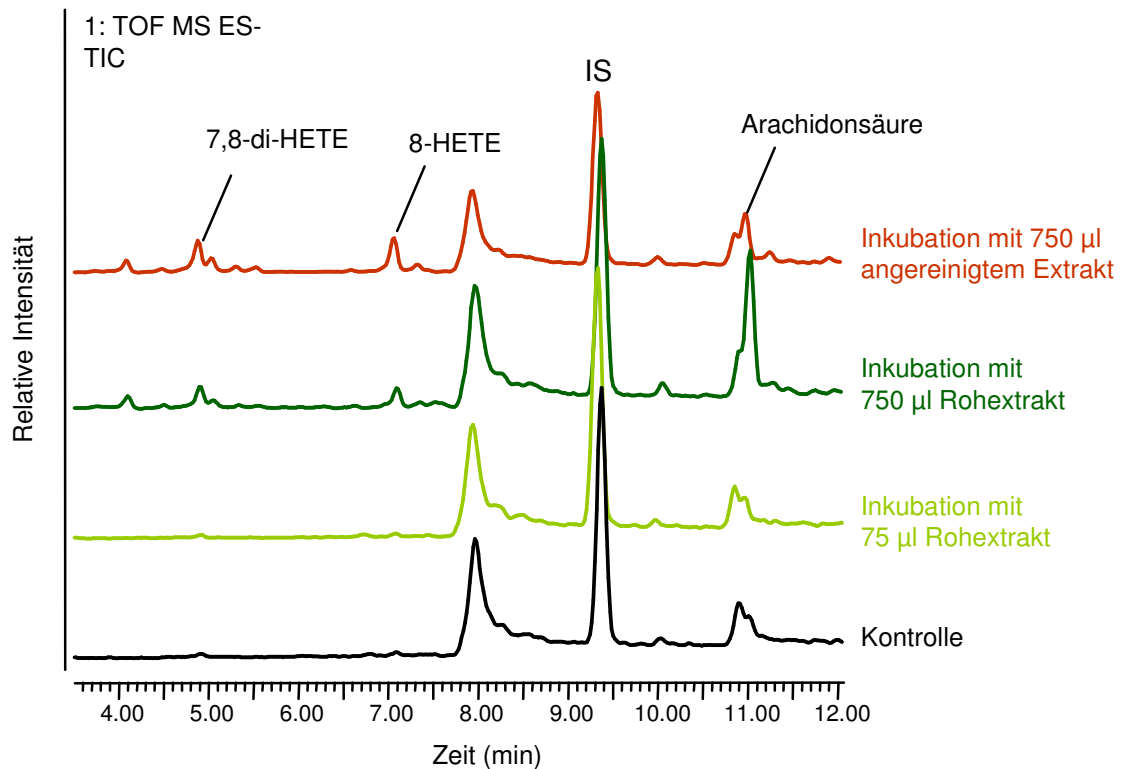
**Abbildung 40: Vermuteter Reaktionsweg für die Bildung von 8-HETE und 7,8-di-HETE in *G. chilensis*.**

Diese Studien führen zu der Feststellung, dass verschiedene Lipasen für die Freisetzung von hydroxylierten und nichtfunktionalisierten Fettsäuren nach mechanischer Verwundung verantwortlich sind. Von Lion et al. durchgeführte Bioassays zeigten, dass durch die hydroxylierte und die dihydroxylierte Fettsäure die Ansiedlung von Sporen der Grünalge *Acrochaetum* spp. reduziert werden kann. Beide Metaboliten spielen also eine direkte ökologische Rolle in der aktivierten chemischen Verteidigung der Rotalge *G. chilensis*.<sup>[199]</sup>

### 3.4.3 Induzierung von chemischer Verteidigung in *G. chilensis*

#### 3.4.3.1 Direkte Inkubation

Erste Vorversuche zeigten, dass *G. chilensis* neben der verwundungsaktivierten Verteidigung auch über eine induzierte Verteidigung gegen Epi- und Endophyten verfügt. Vorbehandlung von *G. chilensis* mit elicitoraktiven Extrakten der epiphytischen Grünalge *A. operculata* zeigte, dass einfache und komplexe Oxylipine *de-novo* gebildet werden. Um zu überprüfen, ob auch hormonell aktive Fraktionen der Rotalge selbst dazu in der Lage sind, wurden Inkubationsexperimente durchgeführt. Dafür wurden Thalli von *G. chilensis* in Falcontubes mit künstlichem Seewasser bedeckt und mit dem Rohextrakt von verwundeter *G. chilensis* versetzt. Des Weiteren wurde zu Inkubationsproben ein durch präparative HPLC angereinigter Rohextrakt, der neben den identifizierten Verteidigungsmetaboliten 7,8-di-HETE und 8-HETE auch unbekannte Oxylipine enthält, zugegeben. Die Kontrollproben wurden nach Behandlung mit reinem Methanol ebenfalls nach dem beschriebenen Protokoll untersucht. Nach einer Inkubationszeit von 19 Stunden wurden die Thalli für 72 Stunden zurück in künstliches Seewasser gesetzt. Nach Extraktion der Rotalgenproben und Analyse mit UPLC/UV/MS konnte, in Abhängigkeit der Konzentrationen, eine Zunahme der Arachidonsäure, 7,8-di-HETE und 8-HETE (Abb. 41) aber auch von anderen komplexen Oxylipinen, wie Prostaglandin E<sub>2</sub> und Leukotrien A<sub>4</sub> (persönliche Mitteilung U. Lion) festgestellt werden.



**Abbildung 41: Inkubationsexperimente mit *G. chilensis* unter Zuhilfenahme verschiedener Extrakte. Im angereinigten Extrakt (präparative HPLC U. Lion) liegen die hydroxylierten Fettsäuren 7,8-di-HETE und 8-HETE angereichert vor.**

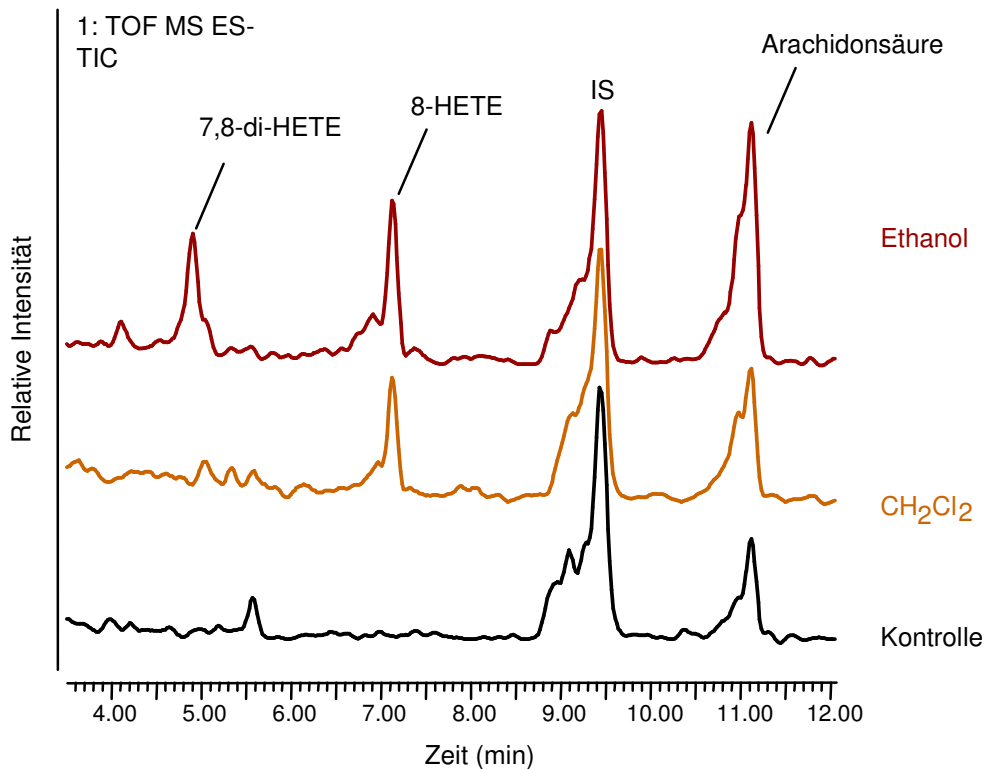
Während bei den Kontrollproben, sowie der niedrigsten Extraktzugabe, keine signifikante Hochregulierung von Arachidonsäure, 7,8-di-HETE, 8-HETE und komplexen Oxylipinen festgestellt wurde, konnten bei dem Einsatz höherer Konzentrationen des Rohextraktes bis zu 4.5 µg/g freie Arachidonsäure, bis zu 7 µg/g 7,8-di-HETE und bis zu 7 µg/g 8-HETE durch die Analyse quantifiziert werden. Doch auch die HPLC-angereicherte Fraktion des Rohextraktes, in der 8-HETE und 7,8-di-HETE angereichert vorliegen, führt zu einem Anstieg der hydroxylierten Fettsäuren und der Arachidonsäure (Abb. 41).

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass eine Induzierung der chemischen Verteidigung von *G. chilensis* möglich ist, indem die Oxylipine in der Rotalge gebildet und damit die identifizierten Verteidigungsmetaboliten 7,8-di-HETE und 8-HETE freigesetzt werden. Da sowohl Inkubationen mit dem Rohextrakt als auch mit einer angereinigten Fraktion zu einer erhöhten Resistenz von *G. chilensis* führen, wäre der nächste logische Schritt die Aufreinigung der Fraktionen, um die hormonaktive Verbindung zu charakterisieren. 7,8-di-HETE und 8-HETE selbst zeigen in Inkubationsversuchen keine hormonelle Aktivität (U. Lion, persönliche Mitteilung).

### 3.4.3.2 Indirekte Inkubation

Technisch einfache Methoden stehen im Vordergrund der Untersuchungen zur Induktion der Resistenz von *G. chilensis* gegen Epiphyten. Um die ökonomischen Probleme der chilenischen Anbaugelände bei der Kultivierung von *G. chilensis* für die Agarproduktion durch Epi- und Endophyten zu lösen, müssen Protokolle zur Verfügung gestellt werden, die selbst mit einfachsten Mitteln die Produktqualität erhöhen. Bei mechanischer Verwundung der Rotalge führt der resultierende Stress zur Resistenz von *G. chilensis* gegen Epi- und Endophyten. Da diese Behandlung die Alge aber signifikant beschädigt, oder sogar abtötet, kann das Verfahren nicht zur Resistenzinduzierung genutzt werden. Gezielte mechanische Verwundung als Vorbehandlung vor der Auspflanzung scheidet also aus praktischen Gründen aus. Da aber auch die Behandlung von Lösungsmitteln zu Membranstress führen kann, wurde die Frage aufgeworfen, ob Lösungsmitteldämpfe ebenfalls eine Resistenz der Rotalge gegen epiphytische Algen bewirken können.

Für Studien über den Einfluss von verschiedenen organischen Lösemitteldämpfen auf *G. chilensis* wurden handtuchrockene abgewogene Thalli ohne Seewasser verschiedenen Lösungsmitteldämpfen ausgesetzt. Nach zwei Stunden Inkubationszeit, in der die gesättigten Gase direkt auf die Alge einwirken konnten, wurden die Algenproben für 18 Stunden in künstliches Seewasser zurückgesetzt. Nach der Extraktion der Algenproben und der Analyse mit UPLC/UV/MS konnte eine Zunahme der Arachidonsäure, 7,8-di-HETE und 8-HETE festgestellt werden (Abb. 42).



**Abbildung 42: UPLC/MS-Analysen der *G. chilensis* Extrakte nach Gasphasenexperimenten mit den organischen Lösungsmitteln Ethanol und Dichlormethan im Vergleich zu Kontrollproben.**

Während bei den Kontrollproben keine signifikante Hochregulierung von Arachidonsäure, 7,8-di-HETE und 8-HETE festgestellt werden konnte, führte der Einsatz von Ethanol zu einer Freisetzung von Arachidonsäure (bis zu 61,7 µg/g), von 7,8-di-HETE (bis zu 30,4 µg/g) und von 8-HETE (bis zu 33,2 µg/g) (Abb. 44). Im Vergleich dazu konnten nach dem Einsatz von Dichlormethan ein geringerer Anstieg der hydroxylierten Fettsäuren (4,3 µg/g 7,8-di-HETE und 22,5 µg/g 8-HETE) quantifiziert werden.

Eine signifikante Hochregulierung der identifizierten Verteidigungsmetaboliten 7,8-di-HETE und 8-HETE durch Lösungsmitteldämpfe und dem damit einhergehenden Membranstress käme als Vorbehandlung der Algen vor dem Auspflanzen zur Resistenzinduktion in Frage. Somit stünden Lösungen zur Verfügung, wodurch auch mit einfachen, den Bauern in Chile zur Verfügung stehenden Mitteln, Resistenz in *G. chilensis* gegen Epi- und Endophyten induziert werden kann. Die hier identifizierte Vorbehandlung wird im nächsten Sommer in einem Algenanbaugelände in Chile erstmalig erprobt werden.

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Mit dem Ziel den Einfluss mechanischer Verwundung auf das chemische Verteidigungspotential von *D. dichotoma* zu untersuchen, wurde ein metabolisches Profiling durchgeführt. Dabei wurden Extrakte intakter *D. dichotoma* mit Algen, die vorher verwundet wurden, mit GC/MS- und LC/MS-basierten Methoden verglichen. Das Metabolitenprofil wurde unter Verwendung polarer und unpolarer Extraktionsmittel, unterschiedlicher Derivatisierungsreagenzien und bei verschiedenen Zeitabständen zwischen Verwundung und Extraktion untersucht. Es konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, dass die Produktion und Umsetzung der mit den beschriebenen Methoden erfassten Primär- und Sekundärmetaboliten in *D. dichotoma* durch mechanische Verwundung beeinflusst wird. Bei den bekannten fraßhemmenden terpenoiden Substanzen scheint es sich also um konstitutive chemische Verteidigungsmetaboliten zu handeln. Weiterhin konnte trotz der Vielzahl an Proteinen und reaktiven Verbindungen in der Algenmatrix keine eindeutigen Veränderungen im Proteinmuster nach einer mechanischen Verwundung nachgewiesen werden.

Beim Profiling von *D. dichotoma* wurden auch flüchtige Substanzen und biogene Gase erfasst. Es wurde eine schnelle und effektive auf GC/MS-basierende Methode entwickelt, wobei die nach mechanischer Verwundung an das umgebende Medium abgegebenen Komponenten mittels Festphasenmikroextraktion (SPME) an einer CAR/PDMS-Faser extrahiert wurden. So konnte die erhöhte Freisetzung flüchtiger niedrigmolekularerer Komponenten ( $m/z < 65$ ) nach Verwundung der Dictyotales festgestellt werden. Diese Hauptkomponenten wurden als Trimethylamin (TMA) und Dimethylsulfid (DMS) identifiziert. Die SPME-Methode wurde soweit optimiert, dass neben dem Nachweis eine Quantifizierung von TMA und DMS in *Dictyota* spp. und anderen Mikro- und Makroalgen möglich ist.

Die ökologische Rolle der flüchtigen Metaboliten TMA und DMS und der bei enzymatischer DMS-Produktion freigesetzten Acrylsäure in der aktivierten chemischen Verteidigung wurde durch Fütterungsexperimente mit den Flohkrebsarten *A. longimana* und *P. caudata* überprüft. Während die einzelnen Komponenten im natürlichen Konzentrationsbereich keinen Einfluss auf das Fraßverhalten der Herbivore hatten, kommt es bei der Mischung dieser drei Metaboliten zu Vermeidungsverhalten. Es wurde gezeigt, dass eine komplexe Mischung der nach Verwundung der Algen freigesetzten Metaboliten von Herbivoren, wie *A. longimana*, wahrgenommen wird und sich auf die Wahl des Futters auswirkt.

Bei der Untersuchung der Verbreitung dieser Verwundungsreaktion mit verschiedenen Algen, wie den marinen Braunalgen *Colpomenia peregrina*, *Dictyopteris* spp., *Fucus vesiculosus*, *Halopteris* spp., *Himantalia elongata*, *Laminaria saccharina*, *Sargassum muticum* und *Pylaiella* spp., der Rotalge *Gracilaria chilensis*, der Grünalge *Ulva* spp., aber auch der Diatomeenkultur *Thalassosera rotula* konnte keine verwundungsaktivierte Freisetzung von Gemischen aus TMA und DMS nachgewiesen werden. Diese Art der aktivierten chemischen Verteidigung scheint demnach nicht sehr weit verbreitet zu sein. Weiterführende Untersuchungen mit zahlreichen Algen sind mit der entwickelten Methode aufgrund kleiner benötigter Probenvolumina und ihrer Einfachheit und Schnelligkeit möglich.

Bei allen Proben in diesen Reihenuntersuchungen mit Mikro- und Makroalgen wurde nach Zugabe von Natriumhydroxidlösung ein starker Anstieg des DMS- und TMA-Gehaltes in der Gasphase festgestellt. Dieser Anstieg lässt auf einen relativ hohen internen DMSP-Gehalt in diesen Algen schließen, der wahrscheinlich nur in seltenen Fällen verwundungsaktiviert gespalten wird. Auch bei *Dictyota* spp. werden nur wenige % des internen DMSPs unmittelbar nach Verwundung umgesetzt.

Durch Fütterungsexperimente mit Flohkrebse stellte sich heraus, dass auch DMSP das Fraßverhalten von *A. longimana* signifikant beeinflusst und dieser Metabolit demzufolge über ein Verteidigungspotential verfügt. Die Flohkrebse *P. caudata* zeigten weder Hinweise auf eine konstitutive noch auf eine aktivierte chemische Verteidigung. Vergleichende Studien mit der DMSP-haltigen grünen Futteralge *Enteromorpha* spp. zeigten jedoch, dass das konstitutive Verteidigungspotential der Terpene (18 – 21) oder anderer Metaboliten der Dictyotales höher ist als der Einfluss von DMSP.

Es wurde eine universelle UPLC/UV/MS Methode für den direkten Nachweis von DMSP entwickelt, um die Unsicherheiten der bisher weit verbreiteten indirekten Methoden zu vermeiden. Der Einsatz von 1-Pyrenyldiazomethan (PDAM) als Derivatisierungsreagenz für DMSP ermöglichte die Entwicklung einer LC/MS-Methode unter Umkehrphasenbedingungen zur direkten Quantifizierung (Detektionslimit 590 nM). Die Ergebnisse zeigen, dass das DMSP in der marinen Braunalge *D. dichotoma* der Hauptvorläufer des freigesetzten DMS ist, da die durch die direkten und indirekten Nachweismethoden bestimmten DMSP-Konzentrationen im Rahmen der Fehlergrenzen übereinstimmen. Die Alge *D. menstrualis* enthält mehr DMSP als *D. dichotoma*. Dennoch wurde bei dieser Art nach mechanischer Verwundung weniger TMA und DMS freigesetzt als bei *D. dichotoma*. Grund hierfür könnte eine verringerte DMSP-Lyaseaktivität in *D. menstrualis* sein. Bei anderen Untersuchungen wurde generell auch eine unterschiedliche Chemie der Sekundärmetaboliten der *Dictyota* spp. gefunden. Die Chemotaxonomie



morphologisch ähnlicher Arten der Dictyotales kann also auch durch die unterschiedliche Freisetzung der biogenen Gasen TMA und DMS bestätigt werden.

Weiterhin wird durch die UPLC/UV/MS Methode für den direkten Nachweis von DMSP eine Bestimmung des DMSP-Gehaltes direkt in Mikroplankton bzw. im Wasser möglich.

Der Einfluss von Jasmonsäure (JA) auf die Sekundärmetabolitenproduktion von *D. dichotoma* und deren chemisches Verteidigungspotential wurde überprüft. Obwohl JA und MeJA schon in verschiedenen marinen Algen identifiziert wurden,<sup>[107, 108]</sup> konnte trotz der hohen Empfindlichkeit der verwendeten GC/MS-basierten Methode keine JA in *D. dichotoma* nachgewiesen werden. Auch Induktionsexperimente von *D. dichotoma* mit den Elizitoren JA und MeJA riefen keine spezifischen Veränderungen im Profil der Sekundärmetaboliten hervor. Ein Einfluss von JA in induzierten Verteidigungsreaktionen kann bei dieser Alge also ausgeschlossen werden. Der Stress für die Alge, der durch hohe Konzentrationen und lange Behandlungszeiten mit JA, MeJA und LEA entstand, hatte lediglich eine Freisetzung von Fettsäuren zur Folge. Eine hormonelle Aktivität kann bei dieser Reaktion aufgrund der hohen benötigten Konzentrationen und der unspezifischen Fettsäurefreisetzung ausgeschlossen werden.

Entgegengesetzt der Annahme, dass JA eine natürliche Antwort von Makroalgen auf Herbivorie oder den Angriff von Pathogenen mediiert,<sup>[110, 111]</sup> zeigten Fütterungsversuche, dass bei der untersuchten *D. dichotoma* keine Verteidigung durch JA oder MeJA induziert wird. Vielmehr stimulieren die hochregulierten freien Fettsäuren Herbivorie, möglicherweise da sie eine geschwächte Futteralge anzeigen.

Reihenuntersuchungen mit anderen marinen Braunalgen zeigten, dass auch hier JA und MeJA keinen Einfluss auf die Biosynthese von Sekundärmetaboliten haben, aber der Stress für die Algen, der durch hohe Konzentrationen an JA, MeJA und LEA im Seewasser ausgelöst wird, wiederum zur Freisetzung vorwiegend gesättigter Fettsäuren führt.

Die Untersuchungen der verwundungsaktivierten und induzierten Verteidigung der, für die Agarproduktion in Chile wichtigen marinen Rotalge *G. chilensis* stellen einen weiteren Teil dieser Arbeit dar.

Die mechanische Verwundung der Rotalge resultiert in einer Freisetzung von Fettsäuren und auch von den hydroxylierten Eicosanoiden, 8*R*-Hydroxyeicosatetraensäure (8-HETE) und 7*S*,8*R*-Dihydroxyeicosatetraensäure (7,8-di-HETE). Während die Freisetzung von Arachidonsäure und deren nachfolgende Umsetzung zu 8-HETE durch Phospholipase A kontrolliert wird,<sup>[199]</sup> zeigten HPLC/MS<sup>n</sup>-Untersuchungen eine mögliche Beteiligung einer Galaktolipase, welche zusätzlich zur Phospholipase aktiviert wird und für die direkte

Freisetzung von 7,8-di-HETE verantwortlich sein kann. Beide hydroxylierten Fettsäuren spielen eine direkte ökologische Rolle in der aktivierten chemischen Verteidigung der Rotalge *G. chilensis*.<sup>[199]</sup>

Durch Inkubationsexperimente der Rotalge *G. chilensis* mit dem Rohextrakt verwundeter Algen und einem durch präparative HPLC angereinigten Rohextrakt, der neben 7,8-di-HETE und 8-HETE auch unbekannte Oxylipine enthält, wurde eine Induzierung der chemischen Verteidigung erreicht.

Eine Induzierung der chemischen Verteidigung von *G. chilensis* konnte ebenfalls durch Lösungsmitteldämpfe und dem damit einhergehenden Membranstress erreicht werden. Auch hier wurde eine signifikante Hochregulierung der identifizierten Verteidigungsmetaboliten 7,8-di-HETE und 8-HETE nachgewiesen. Die Inkubation mit einfachen Lösungsmitteldämpfen stellt eine technisch einfache Lösung dar, mit der auch, mit den Bauern in Chile zur Verfügung stehenden Mitteln, eine Resistenz in *G. chilensis* gegen Epi- und Endophyten induziert werden kann.

## 5 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
CAR	Carboxen
CI	Chemische Ionisierung
CLSA	Closed Loop Stripping Analysis
d.h.	das heißt
DAD	Diodenarray
dest.	destilliert
DGTA	Diacylglycerylhydroxymethyltrimethyl- $\beta$ -alanin
DMS	Dimethylsulfid
DMSP	Dimethylsulfoniumpropionat
DTT	Dithiothreitol
EI	Electrospray Ionization
ESI	Electrospray Ionization
FA	Fettsäure(n)
GC	Gaschromatographie
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
IS	Interner Standard
JA	Jasmonsäure
LC	Flüssigchromatographie
LEA	Linolensäure
MeJA	Methyljasmonat
MeOH	Methanol
MPI	Max-Planck-Institut
MS	Massenspektrometrie
MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-2,2,2-trifluoracetamid
NMHC	Nicht-Methankohlenwasserstoffe
NMR	Kernresonanzspektroskopie
OPDA	Oxophytodiensäure
p.A.	pro analysi
PDA	Photo Diode Array
PDAM	1-Pyrenyldiazomethan
PDMS	Polydimethylsiloxan

PFBHA	O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylaminhydrochlorid
PG	Phosphatidylglycerol
PUA	ungesättigte Aldehyde
PUFA	ungesättigte Fettsäuren
r	Korrelationskoeffizient
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPME	Festphasenmikroextraktion (Solid Phase Micro Extraction)
spp	species
SQDG	Sulfochinovosyldiacylglycerol
Tab.	Tabelle
TEA	Triethylamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamiin
Tg	Teragramm = Millionen Tonnen
THF	Tetrahydrofuran
TMA	Trimethylamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV	Ultraviolett
VOC	flüchtige organische Verbindungen
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Materialien und Geräte

#### 6.1.1 Reagenzien

Für die chromatographischen Untersuchungen und Extraktionen wurden Methanol, Ethanol, Chloroform und Dichlormethan p.A., (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Trimethylamin\*HCl (Aldrich, Seelze, Deutschland) und Dimethylsulfid (DMS) (Fluka/Aldrich, Seelze, Deutschland) sind als Standards für die Identifizierung sowie Quantifizierung flüchtiger Bestandteile in verschiedenen Algen eingesetzt worden. [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-DMS, Acrylsäure und Natriumchlorid wurden von Aldrich/Fluka (Buchs, Schweiz) und Salzsäure sowie Methanol für die Synthese von deuteriertem Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP) bei Merck (Dietikon, Schweiz) bezogen. Schwefelsäure und Dichlormethan lieferte Fisher Scientific (Schweiz). Sämtliche Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert, sofern sie nicht den Reinheitsgrad p.A. hatten. Als Derivatisierungsreagenzien wurden 1-Pyrenyldiazomethan (PDAM), (Trimethylsilyl)diazomethan (Sigma/Aldrich, Buchs, Schweiz) beziehungsweise aus Diazald (Sigma/Aldrich, Deutschland) synthetisiertes Diazomethan verwendet.

#### 6.1.2 Massenspektroskopie

##### 6.1.2.1 Gaschromatographie/Massenspektroskopie (GC/MS)

Für die GC/MS-Analytik wurde ein Finnigan ITS Gaschromatograph (Thermo-Finnigan, Waltham, MA, USA) ausgestattet mit einer Alltech EC5 Kapillarsäule (15 m x 0,25 mm, 0,25 µm, Alltech, Hamburg, Deutschland) und gekoppelt an ein Finnigan TraceMS verwendet. Alle Proben wurden bei einer Injektortemperatur von 250 °C im split oder splitless Modus appliziert. Je nach Analyten wurden verschiedene Temperaturgradienten eingesetzt. Zur Verbesserung der Nachweisgrenze ausgewählter Stoffgruppen wurden neben Elektronenstoß-Ionisation (EI) mit einer Elektronenenergie von 70 eV die chemische Ionisierung (CI) eingesetzt. CI-Spektren wurden an einem Finnigan GCQ (Thermo-Finnigan, Waltham, MA, USA) mit einer Alltech EC5-Säule (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) aufgenommen. Als CI-Ionisierungsgas wurde Methan verwendet.

Neben EI(+)-Spektren wurden hochaufgelöste Massenspektren an einem GCT Premier (Waters Micromass, Manchester, England) gekoppelt an einen Agilent 6890N Gaschromatographen (Agilent, Basel, Schweiz) aufgenommen. Die GC-Trennung erfolgte dabei mit einer J&W DB5ms Kapillarsäule (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm).

### 6.1.2.2 Flüssigkeitschromatographie/Massenspektroskopie (HPLC/MS bzw. UPLC/MS)

Für ESI/MS und APCI/MS Messungen wurde ein Ionenfallengerät (Finnigan LCQ mit APCI- und ESI-Quelle), gekoppelt mit einem Hewlett Packard 1100 System, verwendet. Die HPLC-Trennung erfolgte unter Umkehrphasenbedingungen auf einer Grom-Sil 120 ODS-3 CP Säule (125 x 2 mm, Partikelgröße 3 µm, Grom, Rottenburg-Hailfingen, Deutschland). Alternativ kam eine Acquity™ Ultrapformance LC (Water Micromass, Manchester, England) mit einem 2996 PDA Detektor, unter Benutzung einer Acquity UPLC™ BEH C<sub>18</sub>-Säule (1,7 µm Partikelgröße, 2,1 x 50 mm) zum Einsatz. In diesem Fall erfolgten die Aufnahmen der Massenspektren und der hochaufgelösten Massen mit einem gekoppelten Q-tof Micro (Water Micromass, Manchester, England). Als mobile Phase wurden Acetonitril, Methanol, Tetrahydrofuran Gradient Grade und quarzdestilliertes Wasser in Abhängigkeit der untersuchenden Analyten verwendet. Bei einem Grossteil der Analysen wurde der mobilen Phase je 0,01 % Essigsäure zugegeben.

### 6.1.3 NMR

Für <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR Messungen wurde ein Bruker Avance 400 eingesetzt. Chemische Verschiebungen δ wurden in ppm angegeben. Als Referenz diente das Signal von [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-MeOD (δ = 3,310 ppm).

## 6.2 Organismen

Makroalgen und Flohkrebse wurden in küstennahen Gebieten gesammelt und in künstliches Seewasser überführt, welches durch Lösen von 33 g/L Instant Ocean (Aquarium Systems, Sarrebourg, France) in destilliertem Wasser hergestellt wurde. Das Medium für Kulturen, bestehend aus Sel marin hw professional (SEL, Wiegandt GmbH, Krefeld, Deutschland) wurde nach Maier und Calenberg<sup>[204]</sup> dargestellt.

### 6.2.1 Makroalgen

Im Küstengewässer in direkter Umgebung der Station de Biologique, Roscoff in Frankreich, wurde die Braunalge *D. dichotoma* eingesammelt. Die verwandte Braunalge *D. menstrualis* stellte das Institute of Marine Science in Morehead City, Nordcarolina USA, zur Verfügung.

Verwendete Braunalgen (*Ectocarpus fasciculatus*, *Colpomenia peregrina*, *Fucus vesiculosus*, *Halopteris scoparia*, *Himantalia elongata*, *Laminaria saccharina*, *Sargassum muticum*, *Pylaiella* spp.) und *Ulva* spp. wurden im Tidengebiet der Station de Biologique, Roscoff in Frankreich, gesammelt. Für weiterführende Untersuchungen wurden die

Grünalgen *Ulva* spp. und *Enteromorpha intestinalis* aus bestehenden Kulturen verwendet. Die Rotalge *Gracilaria chilensis* wurde vom einer Algenfarm in Caldera, Nordchile (Cultivos Marinos (PB) Bahia Calderilla, Chile) bereitgestellt.

## 6.2.2 Mikroalgen

Eine Kultur der marinen weltweit verbreiteten coccolithophoriden (kalkiges Nanoplankton) Mikroalge *Emiliana huxleyi* (CC MP 1516) wurde von dem „Provasoli-Guillard national centre for culture of marine phytoplankton“, Maine USA zur Verfügung gestellt. Im Labor bestehende Kulturen von *Thalassosera rotula* (PT 646) wurden ebenfalls in die Studien miteinbezogen.

### 6.2.2.1 Flohkrebse

Die Flohkrebse *Amphithoe longimana* und *Paracerceis caudata* wurden in Morehead City, Nordcarolina (USA), gesammelt und innerhalb von zwei bis drei Tagen per Luftfracht ins Labor geschickt. Diese Flohkrebse sind an der atlantischen Küste von Nordamerika weit verbreitet.

## 6.3 Kulturbedingungen

### 6.3.1 Herstellung vom künstlichen Seewasser

165 g Instant Ocean (Aquarium Systems, Sarrebourg, France) wurden in 5 L quartzdestilliertem Wasser so lange gerührt, bis das Salz vollständig gelöst war. Vor dem Überführen der Kulturen wurde das Medium entsprechend der jeweiligen Kulturbedingungen temperiert. Entweder erfolgte die Nährstoffzugabe durch Zugabe von 1,1 ml Lösung 3 und 2,45 ml Lösung 4 (siehe Kapitel 6.3.2.1) pro 5 L des Mediums oder durch eine Nährstoffzugabe 24 Stunden vor dem Erneuern des Wassers mit ca. 5 ml pro Aquarium (ca. 7 L) einer 1:1 Mischung der beiden Lösungen.

### 6.3.2 Herstellung von Seewasser für Reinkulturen

#### 6.3.2.1 nach Maier <sup>[204]</sup>

Für 5 L Seewasser wurden 120 g NaCl, 40 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 3,75 g KCl, 7,5 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 6 g HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin- N'-2-ethansulfonsäure) und 0,2 g NaHCO<sub>3</sub> in ein 5 L Becherglas eingewogen. Die Mischung wurde in 4 L quartzdestilliertem Wasser unter Rühren gelöst. Dazu wurden folgende Lösungen gegeben, die mit quartzdestilliertem Wasser hergestellt wurden:

Lösung 3:	1,1 ml	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,79 g/200 ml
-----------	--------	---------------------------------	---------------

Lösung 4:	2,45 ml	NaNO <sub>3</sub>	17,9 g/200 ml
Lösung 11:	50 ml	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> x 9 H <sub>2</sub> O	3,5 g/500 ml
		Mit HCl auf pH 3 einstellen	
Lösung 16:	5 ml	Na <sub>2</sub> -Glycerophosphat x 5 H <sub>2</sub> O	12 g/500 ml
Lösung 17:	5 ml	AlCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	60,5 mg/500 ml
		KI	83 mg/500 ml
		RbCl	90 mg/500 ml
		LiCl	530 mg/500 ml
		SrCl x 6 H <sub>2</sub> O	13,35 mg/500 ml
		KBr	29,76 mg/500 ml
Lösung mit 10 M NaOH vor dem Auffüllen alkalisieren (pH 10 – 12)			
Lösung 19:	5 ml	Thiamin HCl	50 mg/500 ml
		Biotin (Vitamin H)	0,5 mg/500 ml
		Cyanocobalmin (Vitamin B12)	0,5 mg/500 ml
		Nicotinsäureamid	0,1 mg/500 ml

Anschließend wurde mit einer 10 N NaOH-Lösung ein pH Wert von 10 eingestellt, das Gesamtvolumen auf 5 L mit destilliertem Wasser aufgefüllt, in autoklavierbare 1-L-Flaschen verteilt und 20 Minuten bei 121 °C (Kontrolle durch Medienfühler) autoklaviert. Danach wurde je 1 ml der separat autoklavierten Lösung 18 zugegeben.

Lösung 18:	1 ml	Na <sub>2</sub> EDTA	18,61 g/500 ml
		(NH <sub>4</sub> )Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	4,9 g/500 ml
		H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,09 g/500 ml
		MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,99 g/500 ml
		ZnCl <sub>2</sub>	0,68 g/500 ml
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,24 g/500 ml
		CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	25 mg/500 ml
		CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	12 mg/500 ml
		NaVO <sub>3</sub>	6 mg/500 ml
		Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	1,3 mg/500 ml

### 6.3.2.2 SEL

In einem 5 L Becherglas wurden 167 g Meersalz (Sel marin hw professional, Wiegandt GmbH, Krefeld, Deutschland) eingewogen, mit 5 L quartzdestilliertem Wasser aufgefüllt und für mindestens 12 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Seewasser in autoklavierbare 1-L-Flaschen überführt und autoklaviert (siehe Kapitel 6.3.2.1). Danach wurde je 0,4 ml separat autoklavierter Seramis® Pflanzendünger zugegeben.



### 6.3.3 Haltung von Makroalgen

*D. dichotoma*, *D. menstrualis*, *G. chilensis* und andere Braun- und Grünalgen wurden nach dem Einsammeln gesäubert, mit feuchten Zellstofftüchern in Ziplock®-Beutel verpackt und per Expressdienst ins Labor geschickt. Nach ein bis zwei Tagen Transportzeit wurden alle Algen im Labor sofort in belüftete Aquarien überführt, welche ca. 10 L künstliches Seewasser enthielten. Die Aquarien wurden mit einer Photoperiode 14 h Licht/10 h Dunkelheit beleuchtet und bei verschiedenen Außentemperaturen (13 – 25 °C) kultiviert. Ein kompletter Wasserwechsel erfolgte zwei- bis viermal im Monat. Die Algen wurden dazu mit künstlichem Seewasser gewaschen, vorsichtig von äußeren Kontaminationen gesäubert und in ein sauberes Aquarium mit temperiertem Seewasser überführt.

### 6.3.4 Haltung von Reinkulturen

Die Phytoplanktonkulturen von *T. rotula* wurden bei 16 °C in Seewasser nach Maier<sup>[204]</sup> mit einer Photoperiode 14 h Licht/10 h Dunkelheit als stehende Kulturen in 250 ml Glasschalen (Weck, Bonn-Duisdorf, Deutschland) kultiviert. *E. huxleyi*-Kulturen unterlagen den gleichen Lichtbedingungen, jedoch in SEL-Seewasser und bei einer Temperatur von 13 °C. Zellzahlen der Mikroalgen wurden in einer Neubauer-Improved-Kammer (Marienfeld, Deutschland) bestimmt. Reinkulturen von *D. dichotoma* wurden innerhalb von 24 Stunden von der Station de Biologique, Roscoff Frankreich, oder von der marinen biologischen Station Helgoland geschickt. Im Labor wurden sie in SEL-Seewasser bei verschiedenen Temperaturen (13 – 18 °C) mit einer Photoperiode 14 h Licht/10 h Dunkelheit in künstlichem Seewasser gehalten.

Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden die Kulturen unter Verwendung einer laminar-Flow-Bank alle ein bis zwei Wochen in frisches Seewassermedium nach Maier oder SEL-Seewasser (siehe oben) umgesetzt. Die Glasschalen wurden vor Gebrauch hitzesterilisiert (ca. 6 h bei 220 °C). Verwendete Pinzetten wurden durch Abflammen mit Ethanol sterilisiert.

### 6.3.5 Haltung der Flohkrebse

Die Flohkrebsearten, *Amphithoe longimana* und *Paracerceis caudata* wurden vom Institute of Marine Science in Morehead City, Nordcarolina USA, per Luftfracht verschickt und direkt nach der Ankunft im Labor in künstliches Seewasser bei ca. 20 °C überführt. Bei einer Photoperiode von 14 h Licht/10 h Dunkelheit wurden die Krebse jeden zweiten Tag mit einer Glaspipette in Aquarien mit frischem Seewasser überführt.

Fluka/Aldrich, Seelze, Deutschland lieferte den Agar, der als Matrix für das künstliche Futter diente. 0.72 g Agar wurden mit 20 ml destilliertem Wasser gemischt und durch Erhitzen in einem Mikrowellenofen gelöst. Weiter wurden 2 g der gepulverten gefriergetrockneten Grünalge *Enteromorpha* spp. mit 16 ml destilliertem Wasser gemischt. Nach dem Vereinigen der beiden Mischungen wurden diese durch Schütteln homogenisiert und in ca. 12 cm<sup>2</sup> große und 5 mm tiefe Plastikschaalen ausgegossen. Ein Pellet (Volumen von ca. 1 ml) des künstlichen Futter wurde in 3 – 4 Teile zerschnitten und nach dem Wechseln des künstlichen Seewasser den Flohkrebse als Futter angeboten. Fanden die Fütterungsexperimente mit den Versuchstieren täglich statt, wurde auf eine weitere Zufütterung verzichtet, um eine Übersättigung zu vermeiden. Eine Fütterung der Flohkrebse erfolgte in diesem Fall nur, wenn der Zeitraum zwischen den Fütterungsversuchen mehr als 20 Stunden betrug.

## 6.4 Profiling von *Dictyota* spp.

Zur statistischen Auswertung aller der im Folgenden beschriebenen Analysemethoden kamen folgende Kriterien zum Einsatz: Für jede Probe wurden mindestens drei unabhängige Messungen durchgeführt. Beim Profiling der Algenproben wurden alle Peaks größer 5 % berücksichtigt. Die Peakerkennung erfolgte über die Retentionszeiten und die Masse (Molekülpeak oder höchstes erkennbares Fragmention und Fragmentierungsmuster). Eine Quantifizierung erfolgte über die jeweilige Peakfläche. Eine Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen intakter und mechanisch verwundeter *D. dichotoma* wurde mit Hilfe der Standardabweichung abgesichert.

### 6.4.1 GC/LC-Analysen

#### 6.4.1.1 Extraktionsmittel

Für gaschromatographische Voruntersuchungen erfolgte die Extraktion von *D. dichotoma* mit Ethanol, Chloroform, Dichlormethan oder nach Bligh und Dyer.<sup>[148]</sup> Auf 1 g Thallusstücke kamen ca. 100 µl künstliches Seewasser und 2 ml des jeweiligen Lösungsmittels. Nach der Extraktion wurden die Mischungen in ein Zentrifugenröhrchen überführt, für 30 s gevortext und anschließend zentrifugiert. Bei der Bligh und Dyer-Extraktion wurde das Algenhomogenisat nach dem Mörsern mit einer Mischung aus Chloroform/Methanol (1:2) in ein Zentrifugenröhrchen überführt (bei 1 g Alge 2 ml Chloroform und 4 ml MeOH). Nach dem Vortexen (1 min) erfolgte eine Zugabe von 2 ml Chloroform und 2 ml dest. Wasser, was zu einer Phasentrennung führte.<sup>[148]</sup>

Die organischen Phasen wurden abgetrennt und konnten direkt mittels GC/MS (Kapitel 6.4.1.3) analysiert werden.

Für flüssigchromatographische Analysen kamen Methanol, Wasser oder ein Methanol/Wasser-Gemisch (1:1) als Extraktionsmittel zum Einsatz. 200 mg *D. dichotoma* wurden dazu mit 1,5 ml Lösungsmittel extrahiert.

#### **6.4.1.2 Extraktionsprotokoll**

##### **6.4.1.2.1 Laborbedingungen**

Um die Reaktion des Organismus auf mechanische Verwundung zu untersuchen, wurden ca. 200 mg *D. dichotoma* durch Mörsern mechanisch verwundet. Nach 1, 5, 10, 20 min, 1 h und 48 h wurde dieses Algenhomogenisat unter Verwendung von Dichlormethan (1 ml) extrahiert. Zur Extraktion wurde die Probe 30 s gevortext und anschließend zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erreichen. Die organische Phase war direkt oder nach Derivatisierung den gaschromatographischen Analysemethoden zugänglich.

Intakte *D. dichotoma* Proben wurden zunächst in flüssigen Stickstoff schockgefroren, um Enzymaktivität nach Zellverletzung zu inhibieren. Zur Erhöhung des Extraktionserfolges wurde die kalte Probe zu einem Pulver zerrieben und anschließend direkt extrahiert. Als zweite Kontrolle für die Versuchreihen der mechanischen Verwundung über 48 h wurden ebenfalls ca. 200 mg *D. dichotoma* vor dem Extrahieren für zwei Minuten in kochendes Wasser überführt. Durch diesen Vorgang konnte die Enzymaktivität irreversibel inaktiviert werden. Nach 48 h wurden diese Proben mit 1 ml Dichlormethan extrahiert.

Bei ausgewählten Proben erfolgte direkt nach der Extraktion eine Überführung der organischen Phase in abgedunkelte Probenbehälter, um mögliche Fotoreaktionen vor den GC/MS-Analysen ausschließen zu können.

Für LC/MS Untersuchungen wurden ca. 200 mg *D. dichotoma* entweder mit flüssigem Stickstoff schockgefroren oder durch Mörsern mechanisch verwundet (2 und 20 min) und anschließend mit 1 – 1,5 ml Methanol, Wasser oder einem Methanol/Wasser-Gemisch (1:1) extrahiert.

##### **6.4.1.2.2 Clipping-Experimente**

Um eine Überlagerung mit den mechanischen Wundreaktionen während des Einsammelns oder des Transportes zu vermeiden, wurden so genannte Clipping (Verschnitt)-Experimente direkt im Tidengebiet der Station de Biologique, Roscoff in Frankreich, durchgeführt. Der Standort wurde markiert, ca. 20 % der Thalli mit einem Lochstanzer entfernt und die Algenproben nach 48 Stunden eingesammelt. Dafür wurde neben intakten Algen auch die verwundete *D. dichotoma* geteilt, anschließend jeweils in Aluminiumfolie eingewickelt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um weitere

enzymatische Aktivitäten zu unterdrücken. Nach dem gekühltem Transport (- 196 °C) wurden diese Proben im Labor, wie oben beschrieben, extrahiert und analysiert.

### 6.4.1.3 GC/MS Analytik

#### 6.4.1.3.1 Derivatisierungsmethoden

Zur massenspektroskopischen Untersuchung nach gaschromatographischer Trennung wurden ausgewählte Proben mit verschiedenen Derivatisierungsreagenzien behandelt.

##### **PFBHA x HCl**

Nach dem Entfernen des Lösungsmittels des Dichlormethanextraktes (Kapitel 6.4.1.2.1) im Stickstoffstrom wurden 40 µl einer O-(2,3,4,5,6-pentafluorbenzyl)hydroxylaminhydrochlorid-Lösung (PFBHA x HCl) (25 mM PFBHA plus 100 mM TrisHCl, pH 7,0 – 7,2) zugegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurden 40 µl destilliertes Wasser und 40 µl Chloroform zugegeben. Nach kurzem Vortexen erfolgte eine Phasentrennung. Die organische Phase wurde direkt mit GC/MS-Analytik weiter untersucht.

##### **MSTFA**

Nach dem Entfernen des Lösungsmittels des Dichlormethanextraktes (Kapitel 6.4.1.2.1) im Stickstoffstrom wurden die Proben in 20 µl N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-2,2,2-trifluoracetamid (MSTFA) aufgenommen, 1 h bei 40 °C geschüttelt und 1 ml Chloroform zugegeben. Anschließend konnten diese Proben direkt mit GC/MS analysiert werden.

##### **PFBHA x HCl und MSTFA**

Zunächst wurden die Proben mit PFBHA x HCl (siehe oben) derivatisiert. Nach der Phasentrennung wurde das Chloroform im Stickstoffstrom abgeblasen und 20 µl MSTFA zugegeben. Die Lösung wurde für eine Stunde bei 40 °C geschüttelt. Nach der Zugabe von 1 ml Chloroform wurden die Proben direkt mittels GC/MS gemessen.

##### **Diazomethan und (Trimethylsilyl)diazomethan**

Diazomethan wurde aus Diazald<sup>®</sup> mit dem Diazald<sup>®</sup>-Kit (ALDRICH) nach der empfohlenen Anleitung hergestellt.<sup>[205]</sup> Zu einer auf 70 °C erhitzten Lösung von 6 g Kaliumhydroxid, 10 ml Wasser und 35 ml Diethylenglykolmonomethylether wurden unter Rühren 21,5 g N-Methyl-N-nitroso-*para*-toluolsulfonamid (Diazald<sup>®</sup>) in 200 ml Diethylether getropft. Während des Zutropfens wurde eine etherische Lösung von Diazomethan laufend in eine auf - 70 °C gekühlte Vorlage destilliert. Achtung: Diazomethan ist hochtoxisch und explosiv, alle Schritte müssen mit Schutzkleidung unter dem Abzug durchgeführt werden. Zu dem im Stickstoffstrom getrockneten Extrakt (Kapitel 6.4.1.2.1) wurde etwa 1 ml dieser Lösung gegeben. Nach etwa 10 bis 15 Minuten wurde die Probe vorsichtig im Stickstoffstrom getrocknet und mit 500 µl Dichlormethan aufgefüllt.

Als alternatives, weniger toxisches Reagenz zur Methylierung wurde (Trimethylsilyl)diazomethan verwendet. Der im Stickstoffstrom getrocknete Extrakt wurde dazu mit ca. 1 ml (Trimethylsilyl)diazomethanlösung (2 M in Diethylether) und 10 µl Methanol versetzt, um gute Ergebnisse des gewünschten Methylesters zu erhalten.<sup>[206, 207]</sup> Nach einer Reaktionszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur, wurde die Probe vorsichtig im Stickstoffstrom getrocknet und mit 500 µl Dichlormethan aufgefüllt.

#### **Diazomethan und MSTFA**

Nach dem Derivatisieren der *D. dichotoma* Proben mit Diazomethan und dem anschließendem Entfernen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom, erfolgte die Zugabe von MSTFA (siehe oben).

#### **6.4.1.3.2 GC/MS-Methode**

Alle Extrakte wurden an oben beschriebenen Geräten unter folgenden optimierten Bedingungen analysiert.

El Spektren:	Säule:	Alltech EC5 15 m x 0,25 mm, 0,25 µm
	Trägergas:	Helium (1 ml/min)
	Split:	15 ml/min
	Injektortemperatur:	260 °C
	Temperaturprogramm:	50 °C (2 min) in 15 °C/min auf 300 °C (2 min)
CI Spektren:	Säule:	Alltech EC5 30 m x 0.25 mm, 0,25 µm
	Trägergas:	Helium
	CI-Gas:	Methan
	Split:	Splitless
	Injektortemperatur:	260 °C
	Temperaturprogramm:	50 °C (2 min) mit 15 °C/min auf 300 °C (2 min)

#### **6.4.1.3.3 HPLC/MS-Methode**

Nach dem Extrahieren der Algenproben mit Methanol oder einem Gemisch aus Methanol und Wasser (1:1) und dem Filtrieren, wurden diese direkt mittels HPLC/MS unter folgenden Bedingungen untersucht.

HPLC Parameter:

Säule:	Grom-Sil 120 ODS-3, 125 x 2 mm, Partikelgröße 3 µm
Laufmittel A:	Wasser + 0,5 % Essigsäure
Laufmittel B:	Acetonitril + 0,5 % Essigsäure
Flussrate:	0,2 ml/min
Gradient:	Laufmittel B 10 % (7 min), 27 min 100 % B, 37 min 100 % B, 37,50 min 10 % B (9,5 min)

---

Detektionswellenlängen:	DAD-UV Detektor: von 220 nm bis 400 nm
ESI/MS Parameter (positive Ionisierung)	
Kapillartemperatur (°C):	300 °C
Massenbereich:	50 – 700
Kapillarspannung (V):	7
Quellenspannung (kV):	4,2
Quellenstrom (µA):	100
Kollisionsenergie:	35.00
Sheat Gas Fluss (L/h):	80
Aux Gas Fluss (L/h):	21

## 6.4.2 Flüchtige Verbindungen

### 6.4.2.1 Closed-Loop-Stripping (CLS)

Zur Untersuchung von an das Wasser abgegebenen Verbindungen kam ein, auf Grob und Zürcher zurückgehendes, Closed-Loop-Stripping-Verfahren zum Einsatz.<sup>[162]</sup> In einer 24stündigen Anreicherungsphase wurden 1 – 3 g *D. dichotoma* mit ca. 100 ml künstlichem Seewasser in einen Kolben gegeben. Für Experimente zur mechanischen Verwundung wurden die Algen zuvor für 1 min gemörsert. Die von der Alge in das Wasser abgegebenen und von hier in die Gasphase transportierten, flüchtigen Verbindungen wurden in einem geschlossenen Luftkreislauf durch einen Aktivkohlefilter (Länge 100 µm, I.D. 0,5 cm, Aktivkohlemenge 1,5 mg, CLSA-Filter, Winterthur, Schweiz) geleitet und dort absorbiert. Anschließend wurde mit 2 x 15 µl Dichlormethan eluiert und direkt durch GC/MS analysiert (Kapitel 6.4.1.3.2).

Pumpen: DC12/08NK, Erich Fürgut, Aichstetten Deutschland

### 6.4.2.2 Mec Worm

Eine Methode zur kontinuierlichen mechanischen Verletzung stellt der Roboter *Mec Worm* dar (Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena, Deutschland).<sup>[165]</sup> Während einer Versuchsdauer von 24 Stunden stößt ein Metallbolzen Löcher in den Thallus von *D. dichotoma* und imitiert damit eine kontinuierliche Verletzung der Alge durch Fraßfeinde. Ca. 500 mg der Braunalge *D. dichotoma* wurden dafür unter diesem Metallbolzen platziert und künstliches Seewasser wurde zugegeben, so dass die Probe vollständig bedeckt war. Die Verwundung fand in einem geschlossenen System statt, wobei die an das Wasser abgegebenen und in die Gasphase transportierten Verbindungen auch hier durch einen Aktivkohlefilter geleitet und absorbiert wurden. Während der Versuchsdauer wurde darauf

geachtet, dass der Thallus ständig mit Seewasser bedeckt war. Die daran anschließende Aufarbeitung fand wie im CLS-Verfahren statt.

### 6.4.2.3 Festphasenmikroextraktion (SPME)

#### 6.4.2.3.1 Extraktionsprotokoll

Die durchgeführten Experimente mit *D. dichotoma* und anderen marinen Algen dienten in erster Linie der Quantifizierung von TMA und DMS. Für die Adsorption von diesen und anderen flüchtigen Bestandteilen der Algenproben kam ein manueller Faserhalter mit einer SPME Faser mit ummantelten Carboxen/Polydimethylsiloxan (CAR/PDMS) (Supelco<sup>TM</sup>, Deisenhofen, Deutschland) zur Anwendung.

Etwa 200 mg Algenmaterial wurden in einem, durch einen Teflondeckel verschlossenen, Glasgefäß (Volumen = 4 ml) in 100 µl künstlichem Seewasser mit drei Glasperlen (Ø ~ 5 mm) durch Vortexen mechanisch verwundet. In dem Gasraum über dem verletzten Algenmaterial wurde eine SPME-Faser für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die Identifizierung der flüchtigen Bestandteile intakter Algen wurde die SPME-Faser für 20 min in den Gasraum über einer gleichen Menge intakter Alge eingebracht, alle anderen Parameter wurden, wie bei den verwundeten Proben beschrieben, belassen.

Direkt nach der Extraktion wurde die Faser in den Injektor eines Gaschromatographen überführt und die extrahierten Metaboliten für 2 min thermisch desorbiert. Der Nachweis der flüchtigen Komponenten erfolgte mit den oben genannten GC/MS Geräten (Kapitel 6.1.2.1).

Um DMSP-gebundenes DMS freizusetzen und die Flüchtigkeit von TMA zu erhöhen, wurden zusätzlich 1 ml einer 1 N Natriumhydroxidlösung in das geschlossene System gegeben. Die nachfolgende Festphasenmikroextraktion geschah, wie oben beschrieben.

#### 6.4.2.3.2 GC/MS-Analytik

Die Bestimmung der flüchtigen Komponenten der Algenproben fand unter folgenden Bedingungen statt:

Finnigan TraceMS:

Säule: Alltech EC5 15 m x 0,25 mm, 0,25 µm

Trägergas: Helium (1 ml/min)

Injektor: Splitless mode, Temperatur 250 °C

Transferlinientemperatur: 270 °C

Temperaturprogramm: 40 °C (4 min isotherm), dann mit 10 °C/min auf 100 °C, dann mit 30 °C/min auf 250 °C (2 min)

Oder:

Agilent 6890N Gaschromatograph gekoppelt mit GCT Premier MS:

Säule:	J&W DB5ms 30 m x 0,25 mm, 0,25 $\mu$ m
Trägergas:	Helium (1 ml/min)
Injektor:	Splitless mode, Temperatur 250 °C
Transferlinientemperatur:	250 °C
Temperaturprogramm:	siehe oben

#### 6.4.2.3.3 Nachweis von TMA und DMS

Die Identifizierung von TMA und DMS erfolgte über ihr typisches Fragmentierungsmuster (TMA: 30, 42 sowie das Verhältnis des Molekülpeaks 59  $m/z$  zu dem [M-1]-Peak (58  $m/z$ ); DMS: 35, 47 and 62  $m/z$ ).

Zur zusätzlichen Identifizierung wurden hochaufgelöste Massenspektren der beiden Komponenten (GCT Premier gekoppelt mit einem Agilent 6890N Gaschromatographen, Bedingungen siehe Kapitel 6.4.2.3.2) aufgenommen.

TMA: berechnet 59,0732  $m/z$ , gemessen 59,0735  $m/z$

DMS: berechnet 62,0189  $m/z$ , gemessen 62,0190  $m/z$

#### 6.4.2.3.4 Quantifizierung und Linearität

Kalibrationsgeraden für TMA wurden in einem Bereich von 1  $\mu$ g TMA\*HCl/ml und 40  $\mu$ g TMA\*HCl/ml H<sub>2</sub>O, und für DMS zwischen 0,5  $\mu$ g DMS/ml H<sub>2</sub>O/MeOH und 12,5  $\mu$ g DMS/ml H<sub>2</sub>O/MeOH aufgenommen. Da bei längerer Lagerung Konzentrationsverluste der flüchtigen Stoffe in den Stammlösungen zu erwarten waren, mussten für jede Versuchsreihe neue Stammlösungen angesetzt werden. Aus diesen Stammlösungen, wobei TMA in Wasser und DMS in MeOH (je 10 mg/ml) gelöst wurde, wurden Verdünnungsreihen in Wasser hergestellt. Jeweils 200  $\mu$ l der verdünnten Lösungen wurden zu 800  $\mu$ l künstlichem Seewasser in ein 4-ml-GC-Vial gegeben. Nach dem Verschließen erfolgte die Extraktion für 20 min unter Benutzung der SPME-Faser. GC/MS Messungen wurden wie in Kapitel 6.4.2.3.2 durchgeführt.

Die Kalibrierungsgeraden ließen sich aus den Flächen der jeweiligen Molekülonen des jeweiligen Analyten (TMA 59  $m/z$ , DMS 42  $m/z$ ), im Verhältnis zur eingesetzten Menge, bestimmen.

Bei hohen DMS-Gehalten wurde das Protokoll für die Kalibrierung, und für die Quantifizierung etwas abgeändert. Das Absorptionvolumen wurde durch die Verwendung größerer Probengefäße (50 ml Einhalskolben) vergrößert. In diesen wurden 5, 10, 50 und 100  $\mu$ g/ml DMS/H<sub>2</sub>O/MeOH vorgelegt, mit einem Kautschukseptum verschlossen und anschließend bei Raumtemperatur für 20 min extrahiert.



### 6.4.3 SPME-Profilung von Mirko- und Makroalgen

Festphasenmikroextraktionen (SPME) wurden auch mit den marinen Braunalgen *D. menstrualis*, *Colpomenia peregrina*, *Dictyopteris* spp., *Fucus vesiculosus*, *Halopteris* spp., *Himanthalia elongata*, *Laminaria saccharina*, *Sargassum muticum* *Pylaiella* spp., der Rotalge *Gracilaria chilensis* und der Grünalge *Ulva* spp., und einer Diatomeenkultur von *Thalassiosira rotula*, durchgeführt. Bei Extraktionen der Makroalgen kam das für *D. dichotoma* optimierte Protokoll zum Einsatz (Kapitel 6.4.2.3.1).

Proben der Diatomeenkultur wurden unter Benutzung eines Whatman®-Filters (Cat. No. 1001 055, Ø 55 mm, Aldrich, Seelze, Deutschland) filtriert, so dass immer ein Überstand des Mediums vorhanden war. Mit 1 ml künstlichem Seewasser wurde die aufkonzentrierte Probe in ein 4 ml-Probengefäß überführt und die Zellen in einer Neubauer-Improved-Kammer (Marienfeld, Deutschland) gezählt. Anschließend wurde die Probe im Eisbad gekühlt und für 1 min mit Ultraschall behandelt (80 Watt, 5 s Pulse, B. Braun 1000L Ultraschallfinger), um eine Zerstörung der Zellen zu erreichen.<sup>[208]</sup> Direkt nach der Ultraschallbehandlung wurde das Probengefäß mit einem Deckel mit Teflonseptum verschlossen und bei Raumtemperatur wie oben beschrieben extrahiert.

Um gebundenes DMS freizusetzen und die Flüchtigkeit von TMA zu erhöhen, wurden zusätzlich Experimente nach Zugabe von 1 ml einer 1 N Natriumhydroxidlösung in das geschlossene System gegeben durchgeführt.

### 6.4.4 Lipidextraktionen

#### 6.4.4.1 Umesterung der Fettsäuren

Für ein Profiling aller enthaltenen Fettsäuren in *D. dichotoma* wurden 10 – 60 mg Alge (Feuchtgewicht) mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver verrieben, welches in ein 1,5-ml-GC-Vial überführt wurde. Nach der Zugabe von 0.5 ml einer MeOH/Acetylchloridlösung (19:1), internem Standard [<sup>2</sup>H<sub>27</sub>]-Myristinsäure (C<sub>14</sub>D<sub>27</sub>O<sub>2</sub>H) (1 µl einer Stammlösung in 10 mg/ml Dichlormethan) und 250 µl Hexan wurde das Probengefäß gasdicht versiegelt und diese Mischung für 10 min bei 100 °C geschüttelt (Achtung: Überdruck). Nach dem Abkühlen auf Eis und Zugabe zusätzlicher 250 µl Hexan wurde eine Phasentrennung durch die Zugabe von 1 ml destilliertem Wasser erreicht. Der durch Zentrifugation beschleunigten Phasentrennung folgten GC/MS Analysen der Hexanphase. Die Identifizierung der Fettsäuren erfolgte durch den Vergleich mit einer externen Fettsäuremethylesterstandardmischung (C<sub>4</sub>-C<sub>24</sub>, Sigma/Aldrich, Seelze, Deutschland) über die Retentionszeiten und Massenspektren.

#### 6.4.4.2 Analyse von Oxylipinen als Pentafluorbenzyloxime<sup>[209]</sup>

Für die Analyse von Oxylipinen wurden ca. 300 mg *D. dichotoma* mit 10 ml einer Lösung BHT (2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol) in Methanol (0,5 mg/ml) bedeckt und anschließend 4 ml PFBHA in Methanol (1,24 g/100 ml) hinzugefügt. Danach wurde die Mischung mit einem Eisbad gekühlt und unter Argon für 5 min, unter Verwendung eines Hochleistungsdispergiergerätes (Ultra-Turrax T 25, IKA-Werk, Deutschland), homogenisiert. Für eine vollständige Extraktion und eine *in situ* Derivatisierung wurde die Mischung für 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden dem Methanol-Extrakt 4 ml einer HCl-Lösung (pH 3) zugegeben und mit 3 x 10 ml Hexan extrahiert. Die Hexanfraktionen wurden zentrifugiert und die organischen Phasen vereinigt (Hexanfraktion). Dem verbleibenden polaren Extrakt wurden erneut 4 ml einer HCl-Lösung (pH 3) zugegeben und 3 x mit 10 ml Dichlormethan extrahiert. Auch diese organischen Phasen wurden vereinigt (Dichlormethanfraktion).

Die Hexanfraktion durch Chromabond NH<sub>2</sub>-Kartuschen (0,5 g, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) geschickt. Vor dem Laden erfolgte eine Vorkonditionierung der Kartuschen mit Methanol (5 ml) und Hexan (5 ml). Nach dem Aufbringen der Extrakte wurden die Kartuschen mit einem binären Lösemittelgemisch von Dichlormethan/2-Propanol (5 ml, 2:1) gespült und mit 10 ml Ether/Ameisensäure (98:2) eluiert. Die Dichlormethanfraktion, welche vermutlich mehr polare Oxylipine enthält, wurde ebenfalls durch mit 5 ml Methanol und 5 ml Dichlormethan vorkonditionierte NH<sub>2</sub>-Kartuschen (1 g, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) geschickt. Nach dem Auftragen der Dichlormethanfraktionen wurden die Kartuschen mit 5 ml Dichlormethan gewaschen und anschließend mit 10 ml Ether/Ameisensäure (98:2) eluiert.

Anschließend wurde bei beiden Fraktionen das Lösungsmittel im Stickstoffstrom abgeblasen und nach der Überführung in GC-Probenbehälter erfolgte eine Methylierung unter Verwendung von Diazomethan (siehe Kapitel 6.4.1.3.1).

### 6.5 Galaktolipide in *G. chilensis*

Zur Untersuchung intakter Algen wurden ca. 30 g *G. chilensis* (Abtropfgewicht) mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, um enzymatische Aktivitäten zu unterdrücken und in einem Mörser zu einem feinen Puder zerrieben. Anschließend erfolgte die Extraktion mit 240 ml eines Dichlormethan/Methanol Gemisches (2:1). Nach dem Filtrieren und Trocknen des Extraktes wurde das Lösungsmittel abgezogen und das erhaltene Rohextrakt über Nacht mit Essigsäureanhydrid in Pyridin (9,4 ml Ac<sub>2</sub>O in 8 ml Pyridin, bei Raumtemperatur) acetyliert.<sup>[202]</sup> Nach dem Einengen der Lösung mittels Rotationsverdampfer erfolgte eine fraktionierte chromatographische Reinigung an

Kieselgel (Eluent Essigsäureethylester/Petrolether Gradient: 0:100, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50 und 100:0 mit je 200 ml). Die gereinigten Fraktionen wurden mittels HPLC/MS auf Galaktolipide untersucht.

HPLC Parameter:

Säule: Grom-Sil 120 ODS-3, 125 x 2 mm, Partikelgröße 3 µm

Laufmittel A: Wasser

Laufmittel B: Methanol

Flussrate: 0,2 ml/min

Gradient: Laufmittel B 60 %, 7 min 95 % B (3 min), 15 min 100 % B (30 min), 46 min 60 % B (9 min)

Detektionswellenlängen: DAD-UV Detektor: von 220 nm bis 400 nm

ESI/MS Parameter (positive Ionisierung)

Kapillartemperatur (°C): 280 °C

Massenbereich: 100 – 2000

Kapillarspannung (V): 22

Quellenspannung (kV): 6,5

Quellenstrom (µA): 100

Kollisionsenergie: 35.00

Sheat Gas Fluss (L/h): 80

Aux Gas Fluss (L/h): 20

## 6.6 Induktionsexperimente

### 6.6.1 Darstellung von Jasmonsäure aus Methyljasmonat

Für die Darstellung von Jasmonsäure wurden 5 g Methyljasmonat mit 100 g gesättigter Kaliumcarbonatlösung und 100 ml Methanol unter Rückfluss 1,5 Stunden im Wasserbad auf 90 °C erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Gemisch mit destilliertem Wasser versetzt bis das gesamte  $K_2CO_3$  vollständig gelöst war. Anschließend wurde das Methanol mit Hilfe eines Rotationsverdampfers abdestilliert und die wässrige Phase mit 2 N HCl auf einen pH 1 – 2 eingestellt. Nach erschöpfender Extraktion der sauren wässrigen Lösung mit 3 x 150 ml Ether wurden die organischen Phasen vereinigt und über Nacht über  $Na_2SO_4$  getrocknet. Das Rohprodukt wurde mit Silicagel chromatographiert. Als Laufmittel wurde Petrolether/Ether (40:60) verwendet.

### 6.6.2 Elizitoren

Für Induktionsexperimente mit verschiedenen Braunalgen wurden Methyljasmonat, Jasmonsäure und Linolensäure (10 mg/ml MeOH) verwendet. Zu den Kontrollproben

wurde die entsprechende Menge an Methanol gegeben. 100 bis 500 mg der Algenproben wurden in einzelne Probenbehälter mit 20 ml künstlichen Seewassers gegeben. Neben unterschiedlichen Konzentrationen (10 – 1000 µg Elicitor /ml künstliches Seewasser) wurden die Induktionen über verschiedene Zeitperioden (2, 12, 24, 48 und 72 h) durchgeführt.

Nach der Induktion wurden die einzelnen Algenproben gewogen, überschüssige Elizitoren abgewaschen, in beschriftete Aluminiumfolie gewickelt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend konnten die Proben mit Dichlormethan extrahiert und nach der Derivatisierung mit Diazomethan mittels GC/MS untersucht werden. Als interner Standard wurde [<sup>2</sup>H<sub>27</sub>]-Myristinsäure in MeOH (10 mg/ml) verwendet (pro 10 mg Alge wurde 1 µl der Stammlösung zugegeben).

GC/MS Parameter:

Säule:	Alltech EC5 15 m x 0,25 mm, 0,25 µm bzw. J&W DB5ms 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm
Trägergas:	Helium (1 ml/min)
Injektor:	Split mode (Flow 30 ml/min, Verhältnis 20), Temperatur 220 °C
Transferlinientemperatur:	270 °C
Temperaturprogramm:	60 °C (2 min) mit 20 °C/min auf 140 °C, dann mit 5 °C/min auf 250 °C, dann mit 20 °C/min auf 300 °C (2 min)

### 6.6.3 Gasphasenexperimente

Für Studien über den Einfluss von verschiedenen organischen Lösemitteln auf *G. chilensis* über die Gasphase wurden handtuchtrockene und abgewogene (~ 500 mg) Thalli in ein 50 ml Falcontube gegeben und ein Wattebausch wurde so platziert, dass er nicht mit der Alge in Berührung kam. Anschließend wurden jeweils in fünf voneinander unabhängigen Experimenten 100 µl Dichlormethan oder Ethanol auf den Wattebausch getropft und das Probengefäß verschlossen. Nach zwei Stunden Inkubationszeit wurden die Algenproben für 18 Stunden in künstliches Seewasser zurückgesetzt. Parallel dazu wurden fünf weitere Algenproben entsprechend behandelt, jedoch ohne Zugabe von organischen Lösemitteln. Nach dem vorsichtigen Trocknen der Proben, wurden diese mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, mit 1,5 ml Dichlormethan extrahiert und die Extrakte direkt gaschromatographischen Analysen unterzogen. Als interner Standard wurde Phenylododecansäure in MeOH (1 mg/ml) verwendet (pro 500 mg Alge wurden 50 µl der Stammlösung zugegeben). Für die sich anschließenden UPLC/MS Messungen wurde die Probe bis zur Trockne eingengt und anschließend in 1 ml MeOH aufgenommen.

UPLC Parameter:

---

Säule:	Acquity UPLC™ BEH C <sub>18</sub> , 2,1 x 50 mm, Partikelgröße 1,7 µm
Laufmittel A:	Wasser + 0,5 % Essigsäure
Laufmittel B:	Acetonitril + 0,5 % Essigsäure
Flussrate:	0,6 ml/min
Gradient:	Start mit Laufmittel B bei 30 %, 14 min 80 % B (5 min), 24 min 95 % B (4 min), 32 min 100 % B (3 min), 37 min 30 % B
Detektionswellenlängen:	PDA Detektor: von 200 nm bis 800 nm
ESI/MS Parameter (negative Ionisierung)	
Massenbereich:	180 – 2000
Kapillarspannung (V):	3000
Probenkonus (V):	12
Quellentemperatur (°C):	80
Desolvationstemperatur (°C):	300
Kollisionsenergie (V):	10
Ionenenergie (V):	2.0

#### 6.6.4 Inkubationsexperimente

Um die durch hormonell aktive Fraktionen induzierten Reaktionen der marinen Rotalge *G. chilensis* genauer zu untersuchen, wurden Inkubationsexperimente durchgeführt, bei denen zunächst ca. 500 mg Mengen der Alge in einem 25 ml Falcontube mit 7,5 ml künstlichem Seewasser bedeckt wurden. Zur Inkubation wurden 75 µl, 750 µl und 3 ml eines Rohextraktes (1 mg/ml Methanol) von epiphytenstimulierter *G. chilensis* dem Seewasser zugesetzt. Des Weiteren wurden zu zwei Inkubationsproben je 750 µl einer Fraktion des HPLC-angereinigten Rohextraktes in MeOH (U. Lion, persönliche Mitteilung) zugegeben. Eine Kontrolle wurde mit 750 µl MeOH behandelt. Der für die Inkubationen verwendete Rohextrakt wurde aus 267 g *G. chilensis* (Abtropfgewicht) hergestellt. Die Rotalge wurde durch einen handelsüblichen Küchenmixer für 5 min zerkleinert. Mittelpolare bis unpolare Substanzen wurden mit methanolischen Dichlormethan (2:1) erschöpfend ausgeschüttelt und die organische Phase wurde über Nacht über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Die Kontrollproben erfolgten ebenfalls nach dem beschriebenen Protokoll, jedoch mit der Zugabe von gleichen Mengen reinem Methanol. Nach einer Inkubationszeit von 19 Stunden wurden die Thalli jeweils für 72 Stunden zurück in künstliches Seewasser gesetzt. Die anschließende Extraktion erfolgte nach dem in Kapitel 6.6.3 beschriebenen Protokoll, wobei zu 500 µg Alge (Frischgewicht) 50 µl Phenyl-dodecansäure in MeOH (1 mg/ml) als interner Standard zugegeben wurden. Das Dichlormethan wurde im Stickstoffstrom abgeblasen und die Proben in MeOH aufgenommen, so dass direkt eine

Umkehrphasen Chromatographie mit gekoppelter MS Analytik durchgeführt werden konnte.

UPLC Parameter/MS Parameter: siehe Kapitel 6.6.3

## 6.7 Bestimmung von DMSP in marinen Algen und Seewasser

### 6.7.1 Herstellung des synthetischen DMSP und Derivatisierung

Für die Synthese von Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP) nach Chambers et al.<sup>[182]</sup> wurde 1 ml (14.5 mmol) Acrylsäure mit 2.5 ml (34 mmol) Dimethylsulfid in 15 ml Dichlormethan gelöst. Durch diese Lösung wurde Chlorwasserstoff geleitet. Nach 20 min Reaktionszeit wurde der ausgefallene Niederschlag filtriert und in Methanol/Ether umkristallisiert. Dieses synthetisierte DMSP x HCl wurde für die Methodenentwicklung zur Identifizierung und Quantifizierung verwendet.

Die Reinheitsüberprüfung erfolgte durch NMR. DMSP x HCl (<sup>1</sup>H NMR ([<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-MeOD, 400 MHz) δ: 3,55 (t, 2H)(J = 6,8 Hz); 2,99 (t, 2H) (J = 6,7 Hz); 3,11 (s, 6H))

Zur Synthese des internen Standards wurde deuteriertes DMS nach dem oben genannten Protokoll umgesetzt.

Identitätsnachweis von [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-DMSP x HCl erfolgte durch NMR. <sup>1</sup>H NMR ([<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-MeOD, 400 MHz) δ: 3,55 (t, 2H) (J = 6,8 Hz); 2,99 (t, 2H) (J = 6,8 Hz); <sup>13</sup>C NMR ([<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-MeOD, 100 MHz) δ: 25,67(q), 29,72, 40,45, 173,51.

Für den Einsatz von DMSP in Bioassays wurde die freie Base durch Behandeln mit Silberoxid freigesetzt.<sup>[210]</sup> Nach dem Filtrieren wurde die Lösung direkt verwendet (siehe Kapitel 6.8.1.2).

1 mg DMSP x HCl wurde zur Derivatisierung mit 2 ml PDAM (4 mg/ml CHCl<sub>3</sub>/MeOH 3:1) für 1 h bei Raumtemperatur unter Rühren behandelt. Anschließend wurden die Proben im Stickstoffstrom getrocknet, in 1 ml Methanol aufgenommen und zentrifugiert. Zur DMSP-Bestimmung wurden Verdünnungsreihen erstellt (1 µg/ml bis 5 mg/ml) und 1 – 10 µl der Proben in das UPLC-System injiziert.

### 6.7.2 Extraktion und Derivatisierung

Ca. 300 mg der marinen Makroalgen *D. dichotoma*, *D. menstrualis* und *Ulva* spp. wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, um die enzymatische Aktivität zu unterdrücken und [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-DMSP (500 µg/ml in Methanol) als interner Standard zugegeben (Endkonzentration von 50 µl Standardlösung pro 100 mg Makroalge). Anschließend wurde die Probe zu einem feinen Pulver gemörsert und mit 1 ml Methanol extrahiert. Nach der Phasentrennung wurde der Extrakt mit 250 µl PDAM (5 mg/ml CHCl<sub>3</sub>/MeOH 3:1) derivatisiert. Dazu wurden die Proben zunächst im Stickstoffstrom getrocknet, in

200 µl Methanol aufgenommen und nach Zugabe der Derivatisierungslösung für eine Stunde gerührt. Nach dem Abblasen des Lösemittels und Wiederaufnahme in 100 µl Methanol können die Proben nach Zentrifugation per UPLC/MS vermessen werden.

Proben der Mikroalgenkultur *E. huxleyi* wurden unter Benutzung einer "HERMLE Z 383 K" Zentrifuge (Wehingen, Deutschland) kalt zentrifugiert (10 min, 6000 rpm, 13 °C). Nachfolgend wurde das Medium bis auf ca. 1 ml Volumen entfernt. Die Zellen wurden in einer Neubauer-Improved-Kammer (Marienfeld, Deutschland) gezählt und 10 µl des internen Standards [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-DMSP (1 mg/ml in Methanol) zugegeben. Aus diesem Gemisch wurden jeweils 5 Proben (100 µl) entnommen. Diese wurden einer Bligh und Dyer-Extraktion (1,2 ml MeOH/500 µl CHCl<sub>3</sub>/Wasser, 12:5:1) unterzogen.<sup>[148]</sup> Anschließend wurden die Lösungsmittel im Stickstoffstrom abgeblasen, die Probe in 200 µl Methanol resuspendiert und mit 200 µl PDAM (1,5 mg/ml CHCl<sub>3</sub>/MeOH 3:1) 1 Stunde bei RT derivatisiert.

### 6.7.3 UPLC/MS

UPLC Parameter:

Säule:	Acquity UPLC™ BEH C <sub>18</sub> , 2,1 x 50 mm, Partikelgröße 1,7 µm
Laufmittel A:	Wasser + 0,1 % Essigsäure
Laufmittel B:	Methanol/THF (80:20) + 0,1 % Essigsäure
Flussrate:	0,6 ml/min
Gradient:	Start: 40 % B, nach 1 min 60 % B, 2,5 min 100 % B (3 min), 4,1 min 40 % B (0,9 min)

Detektionswellenlängen: PDA Detektor: von 200 nm bis 800 nm

ESI/MS Parameter (positive Ionisierung)

Massenbereich:	60 – 500
Kapillarspannung (V):	3000
Probenkonus (V):	10
Quellentemperatur (°C):	150
Desolvationstemperatur (°C):	300
Kollisionsenergie (V):	5
Ionenenergie (V):	1,8

Unter diesen Bedingungen wurden ebenfalls hochaufgelöste Massenspektren, nach Kalibrierung des Gerätes mittels Phosphorsäure, aufgenommen.

### 6.7.4 Linearität und Quantifizierung

Der lineare Zusammenhang zwischen injizierter Substanzmenge und relativer Abundanz oder UV-Signal sowie der dynamische Bereich der UPLC/MS-Methode wurden mit

synthetisiertem und PDAM derivatisiertem DMSP bestimmt. Dafür wurden jeweils drei Proben unterschiedlicher Konzentrationen unabhängig voneinander derivatisiert und mittels UPLC/UV/MS Analytik vermessen. Durch Vergleichen der Flächen der Ionenspur des Moleküliions  $[M^+]$  des PDAM-Derivates von DMSP (349  $m/z$ ) mit der ursprünglich eingesetzten Menge an DMSP konnte die Linearität im Massenspektrometer bestimmt werden. Für höhere Konzentrationen konnte anhand des UV-Spektrums durch den Vergleich der Fläche des Signals von PDAM-DMSP (343,5 nm) mit der eingesetzten Konzentration der lineare Bereich für die Quantifizierung bestimmt werden. Bei der Quantifizierung von DMSP in marinen Algenproben wurde deuteriertes  $[^2H_6]$ -DMSP als interner Standard vor dem Extrahieren zugegeben. Die Menge des in der Algenprobe enthaltenen DMSP wurde durch den Vergleich der Fläche des  $[M^+]$  Peaks (349  $m/z$ ) und der Ionenspur des PDAM- $[^2H_6]$ -DMSP-Signals (355  $m/z$ ) bestimmt.

### 6.7.5 Stabilität der Derivate

Die Stabilität der derivatisierten DMSP-Proben wurde durch UPLC/MS-Messungen nach verschiedenen Zeiten geprüft. DMSP-Proben mit einer Konzentration von 2.93 nM wurden für vier Tage bei 10 °C in drei verschiedenen Lösungen (Methanol, Methanol + 0.01 % Essigsäure and Methanol + 0.1 % Essigsäure) gelagert. UPLC/MS Messungen erfolgten nach 0, 17, 26 und 92 Stunden und die detektierten Mengen an DMSP wurden verglichen. Zu den Algenproben wurde deuteriertes DMSP ( $[^2H_6]$ -DMSP) direkt zugegeben und eine Ein-Punkt-Kalibrierung durchgeführt.

## 6.8 Bioassays

### 6.8.1 Zubereitung des künstlichen Futters

#### 6.8.1.1 Flüchtige Komponenten

Als Basis für das künstliche Futter der verschiedenen Flohkrebse wurde ein feines Pulver der gefriergetrockneten Grünalge *Enteromorpha* spp. verwendet. Es wurden 0,72 g Agar mit 20 ml destilliertem Wasser gemischt und durch Erhitzen in einem Mikrowellenofen gelöst. Währenddessen wurden 2 g gepulverte *Enteromorpha* mit 16 ml destilliertem Wasser gemischt. Nach dem Vereinigen der beiden Mischungen wurden diese durch Schütteln homogenisiert und anschließend jeweils 25 ml der Mischung in 25 ml-Falcontubes gefüllt. Nach dem Verschließen wurden die Probenbehälter auf der Seite oder dem Deckel gelagert und es erfolgte eine Abkühlung auf Raumtemperatur. Die gewünschten Mengen der zu untersuchenden Stoffe (TMA, DMS und Acrylsäure) wurden nun unter Verwendung einer Spritze in den Gasraum eingeführt, der durch die im



Falcontube enthaltende Luft während des Abkühlungsprozesses entstanden ist. Der geschlossene Probenbehälter wurde nun in einem Wasserbad erhitzt, bis der sich darin befindende Agar wieder verflüssigt hatte. Durch kräftiges Schütteln wurde die Mischung homogenisiert. Nach dem erneuten Abkühlen und Festwerden des Agars wurden die Probebehälter geöffnet und das hergestellte Futter in definierte Stücke für die Bioassays geschnitten. Kontrollfutter wurde ebenfalls nach diesem Protokoll angefertigt, jedoch unter Ausschluss der flüchtigen Komponenten und Acrylsäure.

Die Konzentrationen der flüchtigen Komponenten TMA und DMS wurden nach Zubereitung des Futters und während der Durchführung der Futtersuche verfolgt. Dafür wurden definierte Agarstücke von ca. 1 g direkt untersucht oder für 1, 6 und 12 Stunden in künstlichem Seewasser gelagert. Die Extraktion erfolgte dann, indem die Agarstücke in ein verschließbares 4 ml-GC-Glasgefäß überführt, verschlossen und in einem Wasserbad erhitzt wurden, bis der Agar sich wieder verflüssigt hatte. Die Analyse der flüchtigen Komponenten erfolgte durch Festphasenmikroextraktion (Kapitel 6.4.2.3.1).

#### **6.8.1.2 DMSP-haltiges Futter**

Da die gefriergetrocknete Grünalge *Enteromorpha* spp. DMSP enthält wurde das Futter für Untersuchungen des Einflusses von DMSP auf das Fressverhalten der Flohkrebse ohne Zusatz der Alge hergestellt. Zunächst wurden 100 mg (588 µmol) des synthetisierten DMSP x HCl für fünfzehn Minuten mit 69,5 mg (300 µmol) Silberoxid versetzt und für 1 min geschüttelt. 0,72 g Agar wurden mit 20 ml destilliertem Wasser gemischt und durch Erhitzen in einem Mikrowellenofen gelöst. Die entsprechende Menge (27,7 µg/ml und 277,7 µg/ml) an umgesetzten DMSP wurde in 16 ml destilliertem Wasser gelöst und mit dem heißen flüssigen Agar zu einer homogenen Mischung vereint. Direkt im Anschluss wurde diese Lösung in eine ca. 12 cm<sup>2</sup> große und 5 mm tiefe Plastikschale gegossen. Nach dem Erkalten wurden definierte Stücke herausgeschnitten und in die Versuchsgefäße überführt. Kontrollproben wurden ebenfalls nach diesem Protokoll hergestellt, jedoch unter Ausschluss von DMSP.

#### **6.8.1.3 Induzierte Algenproben**

Wie im Kapitel 6.6.2 beschrieben, wurden Proben von *D. dichotoma* mit JA, MeJA und LEA für 30 Stunden induziert oder mit Methanol als Kontrolle behandelt. Anschließend wurden die induzierten Algenproben sowie die Kontrollalgen gefriergetrocknet und zu einem feinen Pulver zerstoßen und konnten zu Versuchsfutter verarbeitet werden. Dafür wurden 0,72 g Agar mit 20 ml destilliertem Wasser gemischt und durch Erhitzen in einem Mikrowellenofen gelöst. Währenddessen wurden 2 g der gepulverten Algenproben mit 16 ml destilliertem Wasser gemischt. Für Fütterungsexperimente über einen Zeitraum von

einer Stunde wurde die heiße Lösung direkt im Anschluss in eine ca. 6 ml große Petrischale gegossen. Nach dem Erkalten wurden definierte Stücke herausgeschnitten, in die Versuchsgefäße überführt und verwendet.

## 6.8.2 Durchführung

### 6.8.2.1 Fütterungsexperimente

Mit den Flohkrebse, *A. longimana* und *P. caudata* wurden Fütterungsexperimente mit 40 µg DMS und/oder Acrylsäure (AA)/ml Agar und 300 µg TMA/ml Agar, sowie dem zehnbzw. hundertfachen dieser Konzentrationen durchgeführt. Nach dem Herstellen des Futters (Kapitel 6.8.1.1) wurde der Agar in Stücke von ca. 75 mm<sup>3</sup> geschnitten und direkt für die Fütterungsexperimente verwendet.

Die Konzentrationen in den mit DMSP behandelten Futterproben lagen zwischen 0,027 und 27,7 µg/ml, welches den Bereich der DMSP-Konzentrationen in verschiedenen untersuchten Makroalgen widerspiegelt. Der DMSP-haltige Agar (Kapitel 6.8.1.2) wurde in Stücke von ca. 90 mm<sup>3</sup> geschnitten und für die Fütterungsexperimente verwendet.

Die Durchführung der Futtersversuche fand in Eiswürfelbehältern statt, die mit 18 °C kaltem künstlichem Seewasser gefüllt wurden. In jedes Gefäß kam ein Flohkrebs, der die Wahl zwischen Kontrollfutter und behandeltem Futter hatte. Alle fünf Minuten wurde protokolliert, welches Futter der Flohkrebs bevorzugte. Die Laufzeit der Fütterungsexperimente für die flüchtigen Komponenten betrug 25 min, die Laufzeiten aller anderen Futtersversuche betragen bis zu eine Stunde. Für statistische Untersuchungen der Fütterungsexperimente wurden die Standardabweichung sowie der Wilcoxon-Paar-Test einbezogen, um die fünf bzw. zwölf Observierungspunkte, die sich aus den Aufenthaltsorten der Flohkrebse während der Futtersversuche ergaben, auszuwerten.

### 6.8.2.2 Futtersversuche mit induzierten Algenproben

Um das Verhalten der verschiedenen Flohkrebse, wie *Amphithoe longimana* und *Paracerceis caudata*, in Antwort auf das angebotene Futter beobachten zu können, wurden Fütterungsexperimente durchgeführt, in denen die Versuchstiere zwischen behandeltem Futter und Kontrollfutter wählen. Bei einer Versuchsdauer bis zu einer Stunde wurde alle fünf Minuten kontrolliert, welches Futter das jeweilige Versuchstier bevorzugt. Zur statistischen Validierung wurden zwölf Observierungspunkte, die sich aus den Aufenthaltsorten der Flohkrebse während der Versuche ergaben, unter Zuhilfenahme der Standardabweichung und des Wilcoxon-Paar-Testes, untersucht.

## 6.9 Proteinuntersuchungen

### 6.9.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese<sup>[211]</sup>

In Anlehnung an<sup>[212]</sup> wurden die für die SDS-Page benötigten Trenngellösungen, Sammelgellösungen, 3-facher Ladepuffer, Proteinstandard, Elektronenpuffer, Coomassie Blau Färbelösung und Entfärbelösung wie von Jung beschrieben hergestellt.<sup>[211]</sup>

### 6.9.2 Proteinprobenvorbereitung von *D. dichotoma*

Für die Markerproben wurden 7 µl der Lösung des „Low Molecular Weight“-Markers (Amersham Biosciences) und 13 µl dest. Wasser mit 10 µl 3-fachen Ladepuffer und 3 µl Dithiothreitol (DTT) gemixt. Für die Algenproben wurden ca. 300 mg intakte Thalli vorsichtig mit künstlichem Seewasser gesäubert. Für die Proteinbestimmung in intakten Proben wurden die definierten Algenstücke 2 min in Wasser gekocht und anschließend mit 10 % künstlichem Seewasser für zwei Minuten gemörsert. Für die Bestimmung der Proteine in mechanisch verwundeten Algenproben, wurden die Thalli mit 10 % künstlichem Seewasser für einen definierten Zeitraum in 1,5 ml-Eppendorfgefäßen, ohne vorheriges Kochen, gemörsert. Im Anschluss wurden 10 µl des jeweiligen Homogenisates entnommen und in Reaktionsgefäße überführt und gewogen. Nach Zugabe von 10 µl 3-fachen Ladepuffer und 3 µl DTT wurde mit dest. Wasser auf 30 µl aufgefüllt. Nach erneuter intensiver Durchmischung auf dem Vortexer wurden die Algenproben und die Markerproben für 1 min im Wasserbad gekocht und anschließend im Eisbad gelagert. Vor dem Auftragen in die Taschen der Gelapparatur wurden die Proben erneut für eine Minute gekocht.

Nach dem Beladen der Taschen des Gels mit den Proben wurde die Kammer mit dem Elektrodenpuffer gefüllt und die Gelelektrophorese gestartet (Sammelgel: 80 V, Trenngel 150 V).

Nach etwa einer Stunde erreichte die Bromphenolblau-Phase das Ende des Gels und zeigt somit an, dass die Trennung der Proteine abgeschlossen ist. Das Gel wurde vorsichtig aus der Apparatur entfernt und in die vorbereitete Coomassie Blau Lösung überführt. Unter leichtem Schütteln wurde das Gel innerhalb von etwa 2 Stunden angefärbt, so dass die Banden ein intensives blau hatten. Daraufhin erfolgte eine Überführung des Gels in die Entfärbelösung und wurde so lange geschüttelt bis der Hintergrund entfärbt war. Nun konnte das Gel eingescannt und zwischen zwei Lagen Zellophan im Geltrockner über Nacht getrocknet werden.

## Literaturverzeichnis

- [1] I. A. Guschina and J. L. Harwood. **2006** Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research* **45**, 160-186.
- [2] G. I. McFadden, P. R. Gilson, et al. **1994** Goniomonas - ribosomal-rna sequences indicate that this phagotrophic flagellate is a close relative of the host component of cryptomonads. *European Journal of Phycology* **29**, 29-32.
- [3] M. E. Hay and P. D. Steinberg. **1992** The chemical ecology of plant-herbivore interactions in marine versus terrestrial communities. In *Herbivores their interactions with secondary plant metabolites*, vol. 2 (ed. G. A. Rosenthal and M. R. Berenbaum), pp. 371-413. San Diego: Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich.
- [4] R. Kuhlenskamp, L. A. Franklin, et al. **2001** Effect of solar ultraviolet radiation on growth in the marine macroalga dictyota dichotoma (phaeophyceae) at helgoland and its ecological consequences. *Helgoland Marine Research* **55**, 77-86.
- [5] D. P. Hader, M. Porst, et al. **2001** Photosynthetic performance of the atlantic brown macroalgae, cystoseira abies-marina, dictyota dichotoma and sargassum vulgare, measured in gran canaria on site. *Environmental and Experimental Botany* **45**, 21-32.
- [6] F. Paul, E. Städler, et al. **1992** *Herbivores, their interaction with secondary plant metabolites*. Ecological and evolutionary processes (herbivores). San Diego: Academic Press.
- [7] V. J. Paul and M. P. Puglisi. **2004** Chemical mediation of interactions among marine organisms. *Natural Product Reports* **21**, 189-209.
- [8] V. J. Paul, M. P. Puglisi, et al. **2006** Marine chemical ecology. *Natural Product Reports* **23**, 153-180.
- [9] U. Wittstock and J. Gershenzon. **2002** Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 300-307.
- [10] D. J. Faulkner. **1977** Interesting aspects of marine natural-products chemistry. *Tetrahedron* **33**, 1421-1443.
- [11] G. B. Toth and H. Pavia. **2006** Artificial wounding decreases plant biomass and shoot strength of the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* (Fucales, Phaeophyceae). *Marine Biology* **148**, 1193-1199.
- [12] T. M. Schmitt, M. E. Hay, et al. **1995** Constraints on chemically mediated coevolution - multiple functions for seaweed secondary metabolites. *Ecology* **76**, 107-123.
- [13] M. E. Hay. **1996** Marine chemical ecology: What's known and what's next? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **200**, 103-134.

- [14] M. E. Hay and W. Fenical. **1988** Marine plant-herbivore interactions - the ecology of chemical defense. *Annual Review of Ecology and Systematics* **19**, 111-145.
- [15] F. Weinberger, G. Pohnert, et al. **2002** A signal released by an enclophytic attacker acts as a substrate for a rapid defensive reaction of the red alga *Chondrus crispus*. *Chembiochem* **3**, 1260-1263.
- [16] M. Heil and I. T. Baldwin. **2002** Fitness costs of induced resistance: Emerging experimental support for a slippery concept. *Trends in Plant Science* **7**, 61-67.
- [17] L. L. Walling. **2000** The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation* **19**, 195-216.
- [18] E. M. Borell, A. Foggo, et al. **2004** Induced resistance in intertidal macroalgae modifies feeding behaviour of herbivorous snails. *Oecologia* **140**, 328-334.
- [19] R. Karban, I. T. Baldwin, et al. **2000** Communication between plants: Induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighboring sagebrush. *Oecologia* **125**, 66-71.
- [20] G. L. Cetrulo and M. E. Hay. **2000** Activated chemical defenses in tropical versus temperate seaweeds. *Marine Ecology-Progress Series* **207**, 243-253.
- [21] G. Cronin and M. E. Hay. **1996** Induction of seaweed chemical defenses by amphipod grazing. *Ecology* **77**, 2287-2301.
- [22] V. J. Paul and K. L. Vanalstyne. **1992** Activation of chemical defenses in the tropical green-algae *Halimeda* spp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **160**, 191-203.
- [23] H. Pavia and G. B. Toth. **2000** Inducible chemical resistance to herbivory in the brown seaweed *ascophyllum nodosum*. *Ecology* **81**, 3212-3225.
- [24] G. Pohnert. **2004** Chemical defense strategies of marine organisms. In *Chemistry of pheromones and other semiochemicals I*, vol. 239, pp. 179-219.
- [25] K. L. Vanalstyne. **1988** Herbivore grazing increases polyphenolic defenses in the intertidal brown alga *fucus-distichus*. *Ecology* **69**, 655-663.
- [26] K. L. Van Alstyne, G. V. Wolfe, et al. **2001** Activated defense systems in marine macroalgae: Evidence for an ecological role for DMSP cleavage. *Marine Ecology-Progress Series* **213**, 53-65.
- [27] C. D. Amsler and V. A. Fairhead. **2006** Defensive and sensory chemical ecology of brown algae. In *Advances in botanical research*, vol. 43 (ed., pp. 1-91).
- [28] K. Bouarab, P. Potin, et al. **1999** Sulfated oligosaccharides mediate the interaction between a marine red alga and its green algal pathogenic endophyte. *Plant Cell* **11**, 1635-1650.

- [29] K. Bouarab, F. Adas, et al. **2004** The innate immunity of a marine red alga involves oxylipins from both the eicosanoid and octadecanoid pathways. *Plant Physiology* **135**, 1838-1848.
- [30] F. Weinberger, G. Pohnert, et al. **2005** Apoplastic oxidation of L-asparagine is involved in the control of the green algal endophyte *Acrochaete operculata* correa & nielsen by the red seaweed *Chondrus crispus* stackhouse. *Journal of Experimental Botany* **56**, 1317-1326.
- [31] C. Herve, T. Tonon, et al. **2006** NADPH oxidases in eukaryotes: Red algae provide new hints! *Current Genetics* **49**, 190-204.
- [32] S. H. Ban, C. Burns, et al. **1997** The paradox of diatom-copepod interactions. *Marine Ecology-Progress Series* **157**, 287-293.
- [33] S. A. Poulet, M. Laabir, et al. **1995** Reproductive response of calanus helgolandicus. 1. Abnormal embryonic and naupliar development. *Marine Ecology-Progress Series* **129**, 85-95.
- [34] A. Ianora, A. Miralto, et al. **2004** Aldehyde suppression of copepod recruitment in blooms of a ubiquitous planktonic diatom. *Nature* **429**, 403-407.
- [35] G. Pohnert. **2005** Diatom/copepod interactions in plankton: The indirect chemical defense of unicellular algae. *Chembiochem* **6**, 946-959.
- [36] G. Pohnert. **2000** Wound-activated chemical defense in unicellular planktonic algae. *Angewandte Chemie-International Edition* **39**, 4352-+.
- [37] A. Miralto, G. Barone, et al. **1999** The insidious effect of diatoms on copepod reproduction. *Nature* **402**, 173-176.
- [38] T. Wichard, S. A. Poulet, et al. **2005** Determination and quantification of alpha,beta,gamma,delta-unsaturated aldehydes as pentafluorobenzyl-oxime derivatives in diatom cultures and natural phytoplankton populations: Application in marine field studies. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **814**, 155-161.
- [39] T. Wichard, S. A. Poulet, et al. **2005** Survey of the chemical defence potential of diatoms: Screening of fifty one species for alpha,beta,gamma,delta-unsaturated aldehydes. *Journal of Chemical Ecology* **31**, 949-958.
- [40] R. Casotti, S. Mazza, et al. **2005** Growth inhibition and toxicity of the diatom aldehyde 2-trans, 4-trans-decadienal on *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* **41**, 7-20.
- [41] G. Pohnert, S. Adolph, et al. **2004** Short synthesis of labeled and unlabeled 6z,9z,12z,15-hexadecatetraenoic acid as metabolic probes for biosynthetic studies on diatoms. *Chemistry and Physics of Lipids* **131**, 159-166.

- [42] J. Bruin, M. W. Sabelis, et al. **1995** Do plants tap SOS signals from their infested neighbors. *Trends in Ecology & Evolution* **10**, 167-170.
- [43] P. W. Pare and J. H. Tumlinson. **1999** Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology* **121**, 325-331.
- [44] J. Takabayashi and M. Dicke. **1996** Plant-carnivore mutualism through herbivore-induced carnivore attractants. *Trends in Plant Science* **1**, 109-113.
- [45] M. Dicke. **1994** Local and systemic production of volatile herbivore-induced terpenoids - their role in plant-carnivore mutualism. *Journal of Plant Physiology* **143**, 465-472.
- [46] A. A. Agrawal. **2000** Mechanisms, ecological consequences and agricultural implications of tri-trophic interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 329-335.
- [47] M. Dicke and M. W. Sabelis. **1988** How plants obtain predatory mites as bodyguards. *Netherlands Journal of Zoology* **38**, 148-165.
- [48] M. Steinke, G. Malin, et al. **2002** Trophic interactions in the sea: An ecological role for climate relevant volatiles? *Journal of Phycology* **38**, 630-638.
- [49] A. Kessler and I. T. Baldwin. **2001** Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* **291**, 2141-2145.
- [50] M. Steinke, J. Stefels, et al. **2006** Dimethyl sulfide triggers search behavior in copepods. *Limnology and Oceanography* **51**, 1925-1930.
- [51] D. J. Faulkner and M. T. Ghiselin. **1983** Chemical defense and evolutionary ecology of dorid nudibranchs and some other opisthobranch gastropods. *Marine Ecology-Progress Series* **13**, 295-301.
- [52] J. J. Stachowicz and M. E. Hay. **1999** Reducing predation through chemically mediated camouflage: Indirect effects of plant defenses on herbivores. *Ecology* **80**, 495-509.
- [53] R. L. J. Kwint and K. J. M. Kramer. **1995** Dimethylsulfide production by plankton communities. *Marine Ecology-Progress Series* **121**, 227-237.
- [54] M. Steiner and T. Hartmann. **1968** Occurrence and distribution of volatile amines in marine algae. *Planta* **79**, 113-&.
- [55] G. V. Wolfe, M. Steinke, et al. **1997** Grazing-activated chemical defence in a unicellular marine alga. *Nature* **387**, 894-897.
- [56] Z. Kamenarska, S. Dimitrova-Konaklieva, et al. **2002** Comparative study of the volatile compounds from some black sea brown algae. *Botanica Marina* **45**, 502-509.
- [57] K. L. Van Alstyne and L. T. Houser. **2003** Dimethylsulfide release during macroinvertebrate grazing and its role as an activated chemical defense. *Marine Ecology-Progress Series* **250**, 175-181.

- [58] S. Strom, G. Wolfe, et al. **2003** Chemical defense in the microplankton II: Inhibition of protist feeding by beta-dimethylsulfoniopropionate (DMSP). *Limnology and Oceanography* **48**, 230-237.
- [59] W. J. Broadgate, P. S. Liss, et al. **1997** Seasonal emissions of isoprene and other reactive hydrocarbon gases from the ocean. *Geophysical Research Letters* **24**, 2675-2678.
- [60] R. M. Moore, D. E. Oram, et al. **1994** Production of isoprene by marine-phytoplankton cultures. *Geophysical Research Letters* **21**, 2507-2510.
- [61] R. Seifert, N. Delling, et al. **1999** Ethylene and methane in the upper water column of the subtropical atlantic. *Biogeochemistry* **44**, 73-91.
- [62] R. Fluhr and A. K. Mattoo. **1996** Ethylene - biosynthesis and perception. *Critical Reviews in Plant Sciences* **15**, 479-523.
- [63] C. Duque, A. Bonilla, et al. **2001** Exudation of low molecular weight compounds (thiobismethane, methyl isocyanide, and methyl isothiocyanate) as a possible chemical defense mechanism in the marine sponge *Ircinia felix*. *Biochemical Systematics and Ecology* **29**, 459-467.
- [64] T. Hartmann and Auferman.B. **1973** Physiology of amine formation in marine red alga *Polysiphonia-urceolata*. *Marine Biology* **21**, 70-74.
- [65] V. Herrmann and F. Juttner. **1977** Excretion products of algae - identification of biogenic-amines by gas-liquid-chromatography and mass-spectrometry of their trifluoroacetamides. *Analytical Biochemistry* **78**, 365-373.
- [66] S. W. Gibb, R. F. C. Mantoura, et al. **1999** Distributions and biogeochemistries of methylamines and ammonium in the arabian sea. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography* **46**, 593-615.
- [67] D. C. Yoch. **2002** Dimethylsulfoniopropionate: Its sources, role in the marine food web, and biological degradation to dimethylsulfide. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 5804-5815.
- [68] G. P. Yang, M. Levasseur, et al. **2005** Biogeochemistry of dimethylsulfide (DMS) and dimethylsulfoniopropionate (DMSP) in the surface microlayer and subsurface water of the western north atlantic during spring. *Marine Chemistry* **96**, 315-329.
- [69] R. P. Kiene and D. Slezak. **2006** Low dissolved dmsp concentrations in seawater revealed by small-volume gravity filtration and dialysis sampling. *Limnology and Oceanography-Methods* **4**, 80-95.
- [70] A. Norici, R. Hell, et al. **2005** Sulfur and primary production in aquatic environments: An ecological perspective. *Photosynthesis Research* **86**, 409-417.
- [71] M. O. Andreae and W. R. Barnard. **1984** The marine chemistry of dimethylsulfide. *Marine Chemistry* **14**, 267-279.



- [72] R. P. Kiene. **1990** Dimethyl sulfide production from dimethylsulfoniopropionate in coastal seawater samples and bacterial cultures. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 3292-3297.
- [73] F. Challenger. **1951** Biological methylation. *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry* **12**, 429-491.
- [74] M. Steinke and G. O. Kirst. **1996** Enzymatic cleavage of dimethylsulfoniopropionate (DMSP) in cell-free extracts of the marine macroalga *Enteromorpha clathrata* (Roth) Grev, (Ulvales, Chlorophyta). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **201**, 73-85.
- [75] J. W. H. Dacey and N. V. Blough. **1987** Hydroxide decomposition of dimethylsulfoniopropionate to form dimethylsulfide. *Geophysical Research Letters* **14**, 1246-1249.
- [76] W. Sunda, D. J. Kieber, et al. **2002** An antioxidant function for DMSP and DMS in marine algae. *Nature* **418**, 317-320.
- [77] M. Steinke, G. Malin, et al. **2002** Vertical and temporal variability of DMSP lyase activity in a coccolithophorid bloom in the northern north sea. *Deep-Sea Research Part II- Topical Studies in Oceanography* **49**, 3001-3016.
- [78] A. A. Erickson, V. J. Paul, et al. **2006** Palatability of macroalgae that use different types of chemical defenses. *Journal of Chemical Ecology* **32**, 1883-1895.
- [79] G. A. Nevitt, R. R. Veit, et al. **1995** Dimethyl sulfide as a foraging cue for antarctic procellariiform seabirds. *Nature* **376**, 680-682.
- [80] D. M. J. Dickson and G. O. Kirst. **1987** Osmotic adjustment in marine eukaryotic algae - the role of inorganic-ions, quaternary ammonium, tertiary sulfonium and carbohydrate solutes. 1. Diatoms and a rhodophyte. *New Phytologist* **106**, 645-655.
- [81] G. V. Wolfe. **2000** The chemical defense ecology of marine unicellular plankton: Constraints, mechanisms, and impacts. *Biological Bulletin* **198**, 225-244.
- [82] C. Evans, G. Malin, et al. **2006** Infectious titers of *Emiliania huxleyi* virus 86 are reduced by exposure to millimolar dimethyl sulfide and acrylic acid. *Limnology and Oceanography* **51**, 2468-2471.
- [83] R. H. Reed. **1983** Measurement and osmotic significance of beta-dimethylsulphonio-propionate in marine macroalgae. *Marine Biology Letters* **4**, 173-181.
- [84] P. T. Visscher, R. P. Kiene, et al. **1994** Demethylation and cleavage of dimethylsulfoniopropionate in marine intertidal sediments. *Fems Microbiology Ecology* **14**, 179-189.
- [85] T. Niki, T. Fujinaga, et al. **2004** Simple determination of dimethylsulfide (DMS) and dimethylsulfoniopropionate (DMSP) using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Oceanography* **60**, 913-917.

- [86] A. G. Howard, C. E. Freeman, et al. **1998** Flow injection system with flame photometric detection for the measurement of the dimethylsulphide precursor beta-dimethylsulphonio propionate. *Analytica Chimica Acta* **377**, 95-101.
- [87] G. C. Smith, T. Clark, et al. **1999** Methodology for analyzing dimethyl sulfide and dimethyl sulfoniopropionate in seawater using deuterated internal standards. *Analytical Chemistry* **71**, 5563-5568.
- [88] U. Karsten, C. Wiencke, et al. **1990** The beta-dimethylsulphonio propionate (DMSP) content of macroalgae from antarctica and southern chile. *Botanica Marina* **33**, 143-146.
- [89] H. Nakamura, T. Jin, et al. **1997** Biogenesis of sulfonium compounds in a dinoflagellate; methionine cascade. *Tetrahedron* **53**, 9067-9074.
- [90] A. G. Howard and D. W. Russell. **1996** *An alternative approach to the measurement of  $\beta$ -dimethylsulfoniopropionate (DMSP) and other precursors of dimethylsulfide*. Biological and environmental chemistry of dmsp and related sulfonium compounds. New York: Plenum Press.
- [91] D. A. Gage, D. Rhodes, et al. **1997** A new route for synthesis of dimethylsulphonio propionate in marine algae. *Nature* **387**, 891-894.
- [92] G. Arimura, C. Kost, et al. **2005** Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1734**, 91-111.
- [93] R. Karban and I. T. Baldwin. **1997** *Induced response to herbivory*. Chicago: The University of Chicago Press.
- [94] C. Wasternack, O. Miersch, et al. **1998** Jasmonic acid: Biosynthesis, signal transduction, gene expression. *Fett-Lipid* **100**, 139-146.
- [95] H. Fukui, K. Koshimizu, et al. **1977** Plant-growth regulators in seeds of cucurbita-pepo l.3. Structures of plant-growth inhibitors in seeds of *Cucurbita-pepo* l. *Agricultural and Biological Chemistry* **41**, 189-194.
- [96] R. Ranjan and S. Lewak. **1992** Jasmonic acid promotes germination and lipase activity in nonstratified apple embryos. *Physiologia Plantarum* **86**, 335-339.
- [97] B. Hause, I. Stenzel, et al. **2000** Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers: Allene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles. *Plant Journal* **24**, 113-126.
- [98] B. J. F. Feys, C. E. Benedetti, et al. **1994** Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male-sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* **6**, 751-759.
- [99] R. A. Creelman and J. E. Mullet. **1997** Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 355-381.

- [100] J. S. Thaler. **1999** Jasmonate-inducible plant defences cause increased parasitism of herbivores. *Nature* **399**, 686-688.
- [101] R. Halitschke and I. T. Baldwin. **2003** Antisense lox expression increases herbivore performance by decreasing defense responses and inhibiting growth-related transcriptional reorganization in *Nicotiana attenuata*. *Plant Journal* **36**, 794-807.
- [102] P. Staswick. **1995** *Jasmonates, salicylic acid, and brassinolides*. Plant hormones. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Press.
- [103] B. A. Vick and D. C. Zimmerman. **1984** Biosynthesis of jasmonic acid by several plant-species. *Plant Physiology* **75**, 458-461.
- [104] H. S. Seo, J. T. Song, et al. **2001** Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 4788-4793.
- [105] C. C. von Dahl and I. T. Baldwin. **2004** Methyl jasmonate and cis-jasmone do not dispose of the herbivore-induced jasmonate burst in *Nicotiana attenuata*. *Physiologia Plantarum* **120**, 474-481.
- [106] E. E. Farmer and C. A. Ryan. **1990** Interplant communication - airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase-inhibitors in plant-leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 7713-7716.
- [107] J. Ueda, K. Miyamoto, et al. **1991** Identification of jasmonic acid from *Euglena gracilis* as a plant-growth regulator. *Agricultural and Biological Chemistry* **55**, 275-276.
- [108] M. V. Krupina and W. Dathe. **1991** Occurrence of jasmonic acid in the red alga *Gelidium latifolium*. *Zeitschrift für Naturforschung C-A Journal of Biosciences* **46**, 1127-1129.
- [109] R. Czerpak, A. Piotrowska, et al. **2006** Jasmonic acid affects changes in the growth and some components content in alga *Chlorella vulgaris*. *Acta Physiologiae Plantarum* **28**, 195-203.
- [110] C. Christov, I. Pouneva, et al. **2001** Influence of temperature and methyl jasmonate on *Scenedesmus incrassulatus*. *Biologia Plantarum* **44**, 367-371.
- [111] T. M. Arnold, N. M. Targett, et al. **2001** Evidence for methyl jasmonate-induced phlorotannin production in *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology* **37**, 1026-1029.
- [112] S. Blechert, W. Brodschelm, et al. **1995** The octadecanoic pathway - signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 4099-4105.
- [113] S. Parchmann, H. Gundlach, et al. **1997** Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures. *Plant Physiology* **115**, 1057-1064.

- [114] A. Muller, P. Duchting, et al. **2002** A multiplex gc-ms/ms technique for the sensitive and quantitative single-run analysis of acidic phytohormones and related compounds, and its application to *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**, 44-56.
- [115] J. P. Berge and G. Barnathan. **2005** Fatty acids from lipids of marine organisms: Molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. In *Marine biotechnology I*, vol. 96 (ed., pp. 49-125.
- [116] J. Dalsgaard, M. St John, et al. **2003** Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. In *Advances in marine biology*, vol 46, vol. 46 (ed., pp. 225-340.
- [117] E. Blee. **1998** Phytooxylipins and plant defense reactions. *Progress in Lipid Research* **37**, 33-72.
- [118] W. H. Gerwick. **1994** Structure and biosynthesis of marine algal oxylipins. *Biochimica et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism* **1211**, 243-255.
- [119] W. H. Gerwick, M. A. Roberts, et al. **1999** Biogenesis and biological function of marine algal oxylipins. In *Lipoxygenases and their metabolites*, vol. 447 (ed., pp. 211-218.
- [120] K. Boonprab, K. Matsui, et al. **2003** Hydroperoxy-arachidonic acid mediated n-hexanal and (z)-3- and (e)-2-nonenal formation in *Laminaria angustata* (vol 63, pg 669, 2003). *Phytochemistry* **64**, 809-809.
- [121] R. Schnetter, I. Hornig, et al. **1987** Taxonomy of some north-atlantic Dictyota species (Phaeophyta). *Hydrobiologia* **151**, 193-197.
- [122] A. Kelecom and V. L. Teixeira. **1986** Diterpenes of marine brown algae of the family Dictyotaceae: Their possible role as defense compounds and their use in chemotaxonomy. *Science of the Total Environment* **58**, 109-115.
- [123] V. L. Teixeira and A. Kelecom. **1988** A chemotaxonomic study of diterpenes from marine brown-algae of the genus Dictyota. *Science of the Total Environment* **75**, 271-283.
- [124] S. V. Khotimchenko. **1995** Uncommon 16/1 (n-5) acid from *Dictyota-dichotoma* and fatty-acids of some brown-algae of Dictyotaceae. *Phytochemistry* **38**, 1411-1415.
- [125] V. L. Teixeira, S. A. D. Almeida, et al. **1990** Chemotaxonomy of Dictyotales (Phaeophyta).4. Chemosystematic and biogeographic studies of the diterpenes from the marine brown alga *Dictyota-dichotoma*. *Biochemical Systematics and Ecology* **18**, 87-92.
- [126] V. L. Teixeira, D. N. Cavalcanti, et al. **2001** Chemotaxonomic study of the diterpenes from the brown alga *Dictyota menstrualis*. *Biochemical Systematics and Ecology* **29**, 313-316.
- [127] M. A. Vallim, J. C. De Paula, et al. **2005** The diterpenes from dictyotacean marine brown algae in the tropical atlantic american region. *Biochemical Systematics and Ecology* **33**, 1-16.
- [128] X. C. Li, X. Fan, et al. **2002** Fatty acids of some algae from the Bohai Sea. *Phytochemistry* **59**, 157-161.

- [129] W. Eichenberger, S. Araki, et al. **1993** Betaine lipids and phospholipids in brown-algae. *Phytochemistry* **34**, 1323-1333.
- [130] D. J. Faulkner, B. N. Ravi, et al. **1977** Diterpenes from *Dictyota-dichotoma*. *Phytochemistry* **16**, 991-993.
- [131] C. B. Rao, K. C. Pullaiah, et al. **1986** The diterpenes of *Dictyota-dichotoma* from the Indian-Ocean. *Journal of Organic Chemistry* **51**, 2736-2742.
- [132] R. C. Pereira, D. N. Cavalcanti, et al. **2000** Effects of secondary metabolites from the tropical brazilian brown alga *Dictyota menstrualis* on the amphipod *Parhyale hawaiiensis*. *Marine Ecology-Progress Series* **205**, 95-100.
- [133] G. Cronin and M. E. Hay. **1996** Susceptibility to herbivores depends on recent history of both the plant and animal. *Ecology* **77**, 1531-1543.
- [134] M. E. Hay, W. Fenical, et al. **1987** Chemical defense against diverse coral-reef herbivores. *Ecology* **68**, 1581-1591.
- [135] J. P. Barbosa, V. L. Teixeira, et al. **2004** A dolabellane diterpene from the brown alga *Dictyota paffii* as chemical defense against herbivores. *Botanica Marina* **47**, 147-151.
- [136] M. E. Hay, J. E. Duffy, et al. **1987** Chemical defense against different marine herbivores - are amphipods insect equivalents. *Ecology* **68**, 1567-1580.
- [137] R. B. Taylor, N. Lindquist, et al. **2003** Intraspecific variation in palatability and defensive chemistry of brown seaweeds: Effects on herbivore fitness. *Oecologia* **136**, 412-423.
- [138] C. J. Bird, J. McLachlan, et al. **1986** *Gracilaria-chilensis* sp-nov (Rhodophyta, gigartinales), from Pacific South-America. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **64**, 2928-2934.
- [139] A. H. Buschmann, J. A. Correa, et al. **2001** Red algal farming in chile: A review. *Aquaculture* **194**, 203-220.
- [140] A. H. Buschmann and P. Gomez. **1993** Interaction mechanisms between *Gracilaria-chilensis* (Rhodophyta) and epiphytes. *Hydrobiologia* **261**, 345-351.
- [141] A. H. Buschmann, C. A. Retamales, et al. **1997** Ceramialean epiphytism in an intertidal *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta) bed in Southern Chile. *Journal of Applied Phycology* **9**, 129-135.
- [142] C. M. Pueschel and K. M. Cole. **1985** Ultrastructure of germinating carpospores of *Porphyra-variegata* (Kjellm) us (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Phycology* **21**, 146-154.
- [143] L. V. Evans and A. O. Christie. **1970** Studies on ship-fouling alga *Enteromorpha*. 1. Aspects of fine-structure and biochemistry of swimming and newly settled zoospores. *Annals of Botany* **34**, 451-&.

- [144] M. V. S. Puerta, P. I. Leonardi, et al. **2004** Zoospore adhesion and germination upon non-toxic substances in *Pseudovellula* sp (Chlorophyta). *Hydrobiologia* **513**, 255-258.
- [145] P. D. Steinberg and R. de Nys. **2002** Chemical mediation of colonization of seaweed surfaces. *Journal of Phycology* **38**, 621-629.
- [146] D. Rittschof. **2001**. Marine chemical ecology. Boca Raton.
- [147] P. Potin, K. Bouarab, et al. **2002** Biotic interactions of marine algae. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 308-317.
- [148] E. G. Bligh and W. J. Dyer. **1959** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**, 911-917.
- [149] G. F. Hoffmann and L. Sweetman. **1991** O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)oxime-trimethylsilyl ester derivatives for sensitive identification and quantitation of aldehydes, ketones, and oxoacids in biological-fluids. *Clinica Chimica Acta* **199**, 237-242.
- [150] M. L. Selley, M. R. Bartlett, et al. **1989** Determination of the lipid-peroxidation product trans-4-hydroxy-2-nonenal in biological samples by high-performance liquid-chromatography and combined capillary column gas chromatography negative-ion chemical ionization mass-spectrometry. *Journal of Chromatography-Biomedical Applications* **488**, 329-340.
- [151] F. Vankuijk, D. W. Thomas, et al. **1986** Occurrence of 4-hydroxyalkenals in rat-tissues determined as pentafluorobenzyl oxime derivatives by gas chromatography-mass spectrometry. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **139**, 144-149.
- [152] M. S. Ali, M. K. Pervez, et al. **2004** Dichotenol-a, b and c: The c-16 oxidized seco-dolastanes from the marine brown alga *Dictyota dichotoma* (Huds.) Lamour. *Natural Product Research* **18**, 543-549.
- [153] P. Siamopoulou, A. Bimplakis, et al. **2004** Diterpenes from the brown algae *Dictyota dichotoma* and *Dictyota linearis*. *Phytochemistry* **65**, 2025-2030.
- [154] M. S. Ali, M. K. Pervez, et al. **2003** Dichotenone-a and -b: Two new enones from the marine brown alga *Dictyota dichotoma* (Hudson) Lamour. *Natural Product Research* **17**, 301-306.
- [155] S. R. Gedara, O. B. Abdel-Halim, et al. **2003** Cytotoxic hydroazulene diterpenes from the brown alga *Dictyota dichotoma*. *Zeitschrift für Naturforschung C-A Journal of Biosciences* **58**, 17-22.
- [156] V. Amico, G. Oriente, et al. **1980** Diterpenes based on the dolabellane skeleton from *Dictyota-dichotoma*. *Tetrahedron* **36**, 1409-1414.
- [157] S. Adolph, V. Jung, et al. **2005** Wound closure in the invasive green alga *Caulerpa taxifolia* by enzymatic activation of a protein cross-linker. *Angewandte Chemie-International Edition* **44**, 2806-2808.

- [158] F. Juttner. **2001** Liberation of 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid and other polyunsaturated fatty acids from lipids as a grazer defense reaction in epilithic diatom biofilms. *Journal of Phycology* **37**, 744-755.
- [159] R. Lubig, P. Kusch, et al. **1981** On the mechanism of protein crosslinking with glutaraldehyde. *Monatshefte für Chemie* **112**, 1313-1323.
- [160] B. C. M. Potts, D. J. Faulkner, et al. **1992** Chemical mechanism of inactivation of bee venom phospholipase-A2 by the marine natural-products manoalide, luffariellolide, and scalaradial. *Journal of the American Chemical Society* **114**, 5093-5100.
- [161] G. Cimino, G. Sodano, et al. **1987** Correlation of the reactivity of 1,4-dialdehydes with methylamine in biomimetic conditions to their hot taste - covalent binding to primary amines as a molecular mechanism in hot taste receptors. *Tetrahedron* **43**, 5401-5410.
- [162] K. Grob and F. Zurcher. **1976** Stripping of trace organic-substances from water equipment and procedure. *Journal of Chromatography* **117**, 285-294.
- [163] E. Lorbeer, M. Mayr, et al. **1984** Identification of volatile constituents from biological-material by the stripping method (CLSA) closed-loop stripping apparatus. *Monatshefte für Chemie* **115**, 1107-1112.
- [164] J. Donath and W. Boland. **1995** Biosynthesis of acyclic homoterpenes - enzyme selectivity and absolute-configuration of the nerolidol precursor. *Phytochemistry* **39**, 785-790.
- [165] A. Mithofer, G. Wanner, et al. **2005** Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. II. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission. *Plant Physiology* **137**, 1160-1168.
- [166] X. J. Li, Z. R. Zeng, et al. **2004** Novel fiber coated with amide bridged-calix[4]arene used for solid-phase microextraction of aliphatic amines. *Journal of Chromatography A* **1041**, 1-9.
- [167] G. A. Mills, V. Walker, et al. **1999** Quantitative determination of trimethylamine in urine by solid-phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **723**, 281-285.
- [168] J. Namiesnik, A. Jastrzebska, et al. **2003** Determination of volatile aliphatic amines in air by solid-phase microextraction coupled with gas chromatography with flame ionization detection. *Journal of Chromatography A* **1016**, 1-9.
- [169] G. Pohnert and E. von Elert. **2000** No ecological relevance of trimethylamine in fish - daphnia interactions. *Limnology and Oceanography* **45**, 1153-1156.
- [170] T. M. Arnold and N. M. Targett. **1998** Quantifying in situ rates of phlorotannin synthesis and polymerization in marine brown algae. *Journal of Chemical Ecology* **24**, 577-595.

- [171] C. Hellio, J. P. Marechal, et al. **2004** Seasonal variation of antifouling activities of marine algae from the Brittany Coast (France). *Marine Biotechnology* **6**, 67-82.
- [172] G. Cronin and M. E. Hay. **1996** Within plant variation in seaweed palatability and chemical defenses: Optimal defense theory versus the growth differentiation balance hypothesis. *Oecologia* **105**, 361-368.
- [173] H. Pavia, G. B. Toth, et al. **2002** Optimal defense theory: Elasticity analysis as a tool to predict intraplant variation in defenses. *Ecology* **83**, 891-897.
- [174] E. E. Sotka, J. P. Wares, et al. **2003** Geographic and genetic variation in feeding preference for chemically defended seaweeds. *Evolution* **57**, 2262-2276.
- [175] J. E. Duffy and M. E. Hay. **1994** Herbivore resistance to seaweed chemical defense - the roles of mobility and predation risk. *Ecology* **75**, 1304-1319.
- [176] J. E. Duffy and M. E. Hay. **1991** Food and shelter as determinants of food choice by an herbivorous marine amphipod. *Ecology* **72**, 1286-1298.
- [177] E. Cruz-Rivera and M. E. Hay. **2003** Prey nutritional quality interacts with chemical defenses to affect consumer feeding and fitness. *Ecological Monographs* **73**, 483-506.
- [178] E. Cruz-Rivera and M. E. Hay. **2000** Can quantity replace quality? Food choice, compensatory feeding, and fitness of marine mesograzers. *Ecology* **81**, 201-219.
- [179] C. Hockelmann, T. Moens, et al. **2004** Odor compounds from cyanobacterial biofilms acting as attractants and repellents for free-living nematodes. *Limnology and Oceanography* **49**, 1809-1819.
- [180] M. Berenbaum and J. J. Neal. **1985** Synergism between myristicin and xanthotoxin, a naturally cooccurring plant toxicant. *Journal of Chemical Ecology* **11**, 1349-1358.
- [181] M. E. Hay, Q. E. Kappel, et al. **1994** Synergisms in plant defenses against herbivores - interactions of chemistry, calcification, and plant-quality. *Ecology* **75**, 1714-1726.
- [182] S. T. Chambers, C. M. Kunin, et al. **1987** Dimethylthetin can substitute for glycine betaine as an osmoprotectant molecule for *Escherichia-coli*. *Journal of Bacteriology* **169**, 4845-4847.
- [183] J. H. Zhang, T. Nagahama, et al. **2005** Capillary electrophoretic analysis of dimethylsulfoniopropionate in sugarcane and marine algal extracts. *Talanta* **66**, 244-248.
- [184] V. B. Ritov, D. E. Kelley, et al. **2002** Derivatization of F-2-isoprostanes with 1-pyrenyldiazomethane and their subsequent determination by fluorescence high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* **311**, 10-18.
- [185] S. Strom, G. Wolfe, et al. **2003** Chemical defense in the microplankton I: Feeding and growth rates of heterotrophic protists on the DMS-producing phytoplankter *Emiliania huxleyi*. *Limnology and Oceanography* **48**, 217-229.



- [186] M. Dicke, R. Gols, et al. **1999** Jasmonic acid and herbivory differentially induce carnivore-attracting plant volatiles in lima bean plants. *Journal of Chemical Ecology* **25**, 1907-1922.
- [187] W. Boland, J. Hopke, et al. **1995** Jasmonic acid and coronatin induce odor production in plants. *Angewandte Chemie-International* **34**, 1600-1602.
- [188] H. Gundlach, M. J. Muller, et al. **1992** Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant-cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 2389-2393.
- [189] J. Engelberth, T. Koch, et al. **2001** Ion channel-forming alamethicin is a potent elicitor of volatile biosynthesis and tendrill coiling. Cross talk between jasmonate and salicylate signaling in lima bean. *Plant Physiology* **125**, 369-377.
- [190] T. Koch, T. Krumm, et al. **1999** Differential induction of plant volatile biosynthesis in the lima bean by early and late intermediates of the octadecanoid-signaling pathway. *Plant Physiology* **121**, 153-162.
- [191] B. Schulze, R. Lauchli, et al. **2006** Profiling of structurally labile oxylipins in plants by in situ derivatization with pentafluorobenzyl hydroxylamine. *Analytical Biochemistry* **348**, 269-283.
- [192] G. D. Kanas, H. Skaltsa, et al. **1992** Study of the correlation between trace elements, sterols and fatty acids in brown algae from the Saronikos Gulf of Greece. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **344**, 334-339.
- [193] S. Araki, W. Eichenberger, et al. **1991** Distribution of diacylglycerylhydroxymethyltrimethyl- $\beta$ -alanine (DGTA) and phosphatidylcholine in brown algae. *Plant and Cell Physiology* **32**, 623-628.
- [194] V. M. Dembitsky, O. A. Rozentsvet, et al. **1990** Glycolipids, phospholipids and fatty acids of brown algae species. *Phytochemistry* **29**, 3417-3421.
- [195] M. Aknin, K. Dogbevi, et al. **1992** Fatty-acid and sterol compositions of 8 brown-algae from the Senegalese Coast. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **102**, 841-843.
- [196] R. B. Johns, P. D. Nichols, et al. **1979** Fatty acid composition of ten marine algae from Australian waters. *Phytochemistry* **18**, 799-802.
- [197] M. Shameel, W. Shaikh, et al. **1991** Comparative fatty-acid composition of 5 species of Dictyota (Phaeophyta). *Botanica Marina* **34**, 425-428.
- [198] P. I. Leonardi, A. B. Miravalles, et al. **2006** Diversity, phenomenology and epidemiology of epiphytism in farmed *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta) in Northern Chile. *European Journal of Phycology* **41**, 247-257.

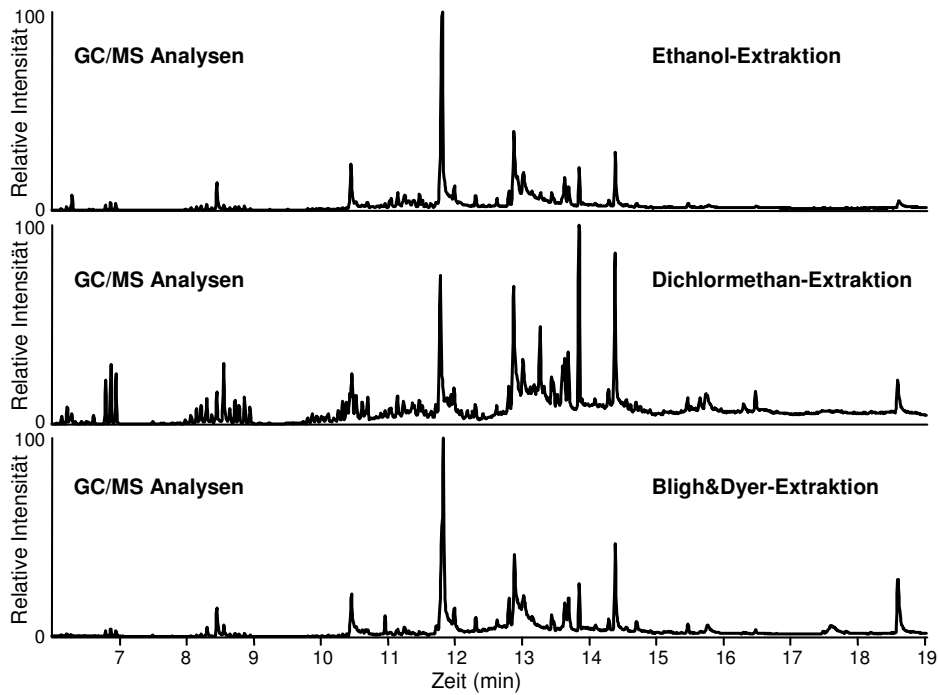
- [199] U. Lion, T. Wiesemeier, et al. **2006** Phospholipases and galactolipases trigger oxylipin-mediated wound-activated defence in the red alga *Gracilaria chilensis* against epiphytes. *Chembiochem* **7**, 457-462.
- [200] M. Hamberg and W. H. Gerwick. **1993** Biosynthesis of vicinal dihydroxy fatty-acids in the red alga *Gracilariopsis-lemaneiformis* - identification of a sodium-dependent 12-lipoxygenase and a hydroperoxide isomerase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **305**, 115-122.
- [201] W. H. Gerwick, M. Moghaddam, et al. **1991** Oxylipin metabolism in the red alga *Gracilariopsis-lemaneiformis* - mechanism of formation of vicinal dihydroxy fatty-acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **290**, 436-444.
- [202] Z. D. Jiang and W. H. Gerwick. **1990** Galactolipids from the temperate red marine alga *Gracilariopsis-lemaneiformis*. *Phytochemistry* **29**, 1433-1440.
- [203] G. Guella, R. Frassanito, et al. **2003** A new solution for an old problem: The regiochemical distribution of the acyl chains in galactolipids can be established by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **17**, 1982-1994.
- [204] I. Maier and M. Calenberg. **1994** Effect of extracellular Ca<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-antagonists on the movement and chemoorientation of male gametes of *Ectocarpus-siliculosus* (Phaeophyceae). *Botanica Acta* **107**, 451-460.
- [205] T. J. Deboer and H. J. Backer. **1954** A new method for the preparation of diazomethane. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas-Journal of the Royal Netherlands Chemical Society* **73**, 229-234.
- [206] N. Hashimoto, T. Aoyama, et al. **1981** New methods and reagents in organic synthesis. 14. A simple efficient preparation of methyl esters with trimethylsilyldiazomethane (TMSCHN<sub>2</sub>) and its application to gas chromatographic analysis of fatty acids. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **29**, 1475-1478.
- [207] D. Seyferth, H. Menzel, et al. **1972** Trimethylsilyl-substituted diazoalkanes. 1. Trimethylsilyldiazomethane. *Journal of Organometallic Chemistry* **44**, 279-290.
- [208] G. Pohnert, O. Lumineau, et al. **2002** Are volatile unsaturated aldehydes from diatoms the main line of chemical defence against copepods? *Marine Ecology-Progress Series* **245**, 33-45.
- [209] B. Schulze. **2005** Oxylipins and their involvement in plant response to biotic and abiotic stress. Biologisch-Pharmazeutische Fakultät, Friedrich-Schiller-Universität Jena, 197.
- [210] M. Lever. **1998** Exclusion and retention of compensatory kosmotropes by HPLC columns. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* **1425**, 61-73.

[211] V. Jung. **2003** Untersuchungen zur chemischen Verteidigung der invasiven Grünalge *Caulerpa taxifolia*. Chemisch-Geowissenschaftliche Fakultät, Friedrich-Schiller-Universität Jena, 129.

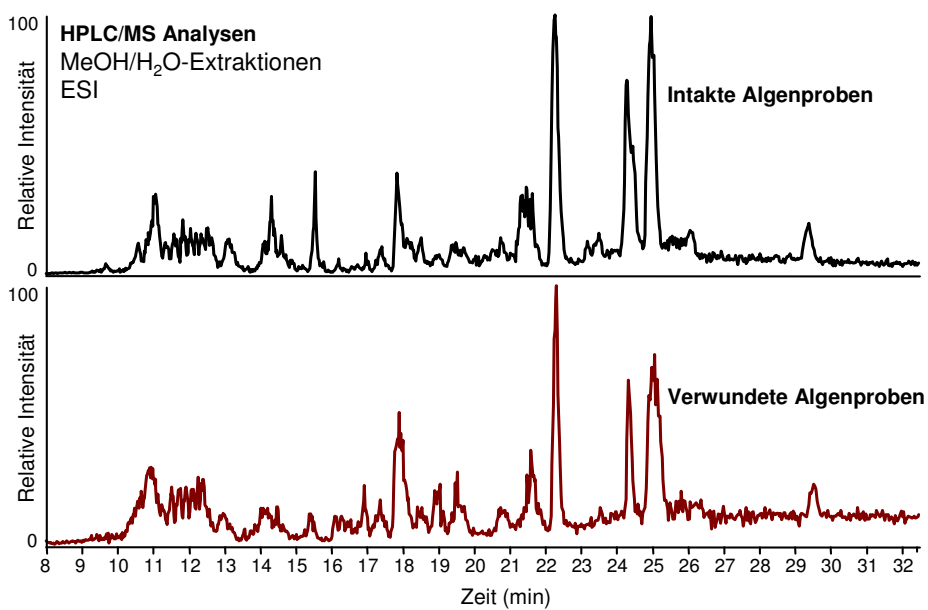
[212] J. Sambrook, E. F. Fritsch, et al. (ed.) **1989** *Molecular cloning*. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

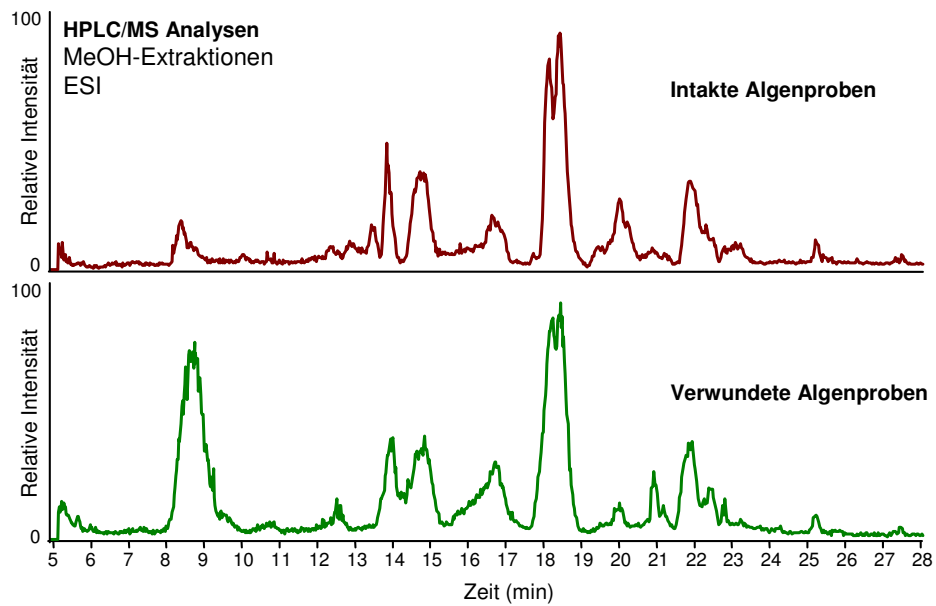
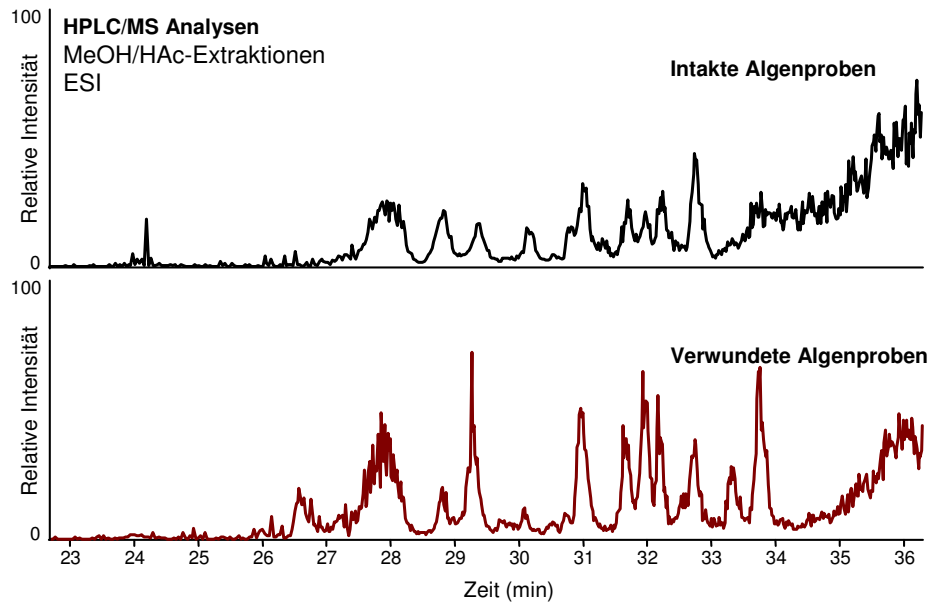
## Anhang

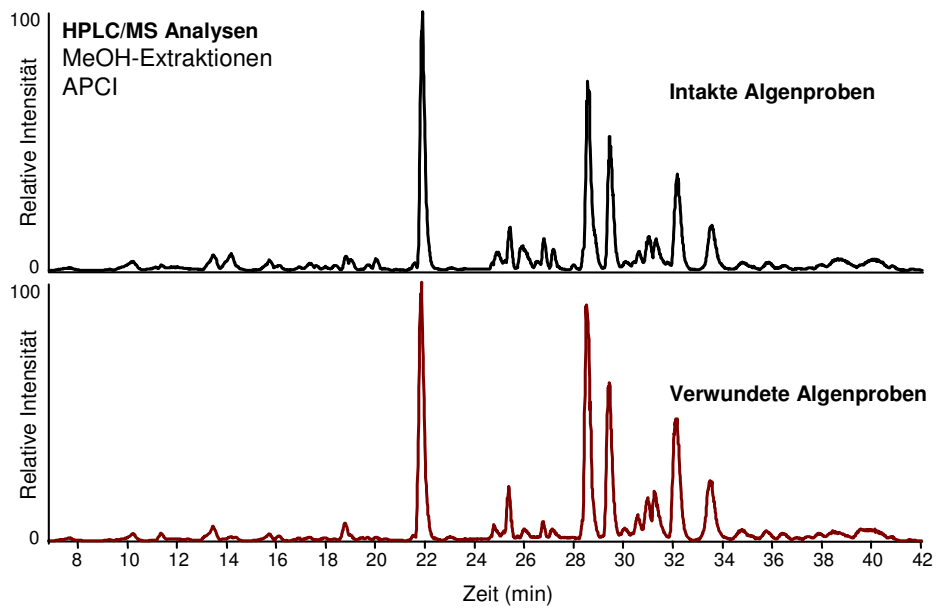
Vergleich verschiedener Lösungsmittel bei der Extraktion von *D. dichotoma* für GC/MS-Analysen:



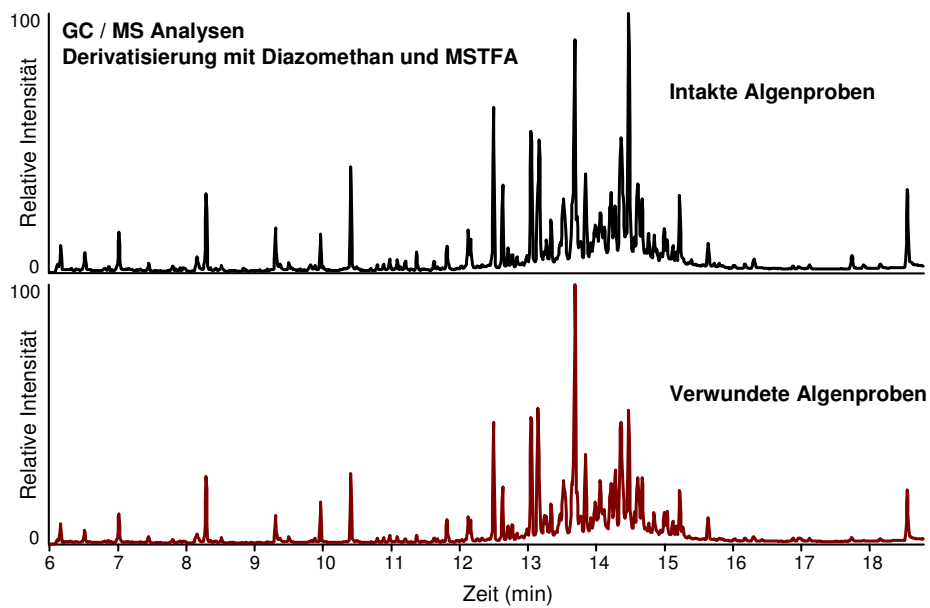
Vergleich verschiedener Lösungsmittel bei der Extraktion von *D. dichotoma* und verschiedener Ionisierungsarten (ESI und APCI) für HPLC/MS-Analysen. Es sind jeweils nur Beispielchromatogramme für mindestens drei unabhängige Messungen gezeigt.



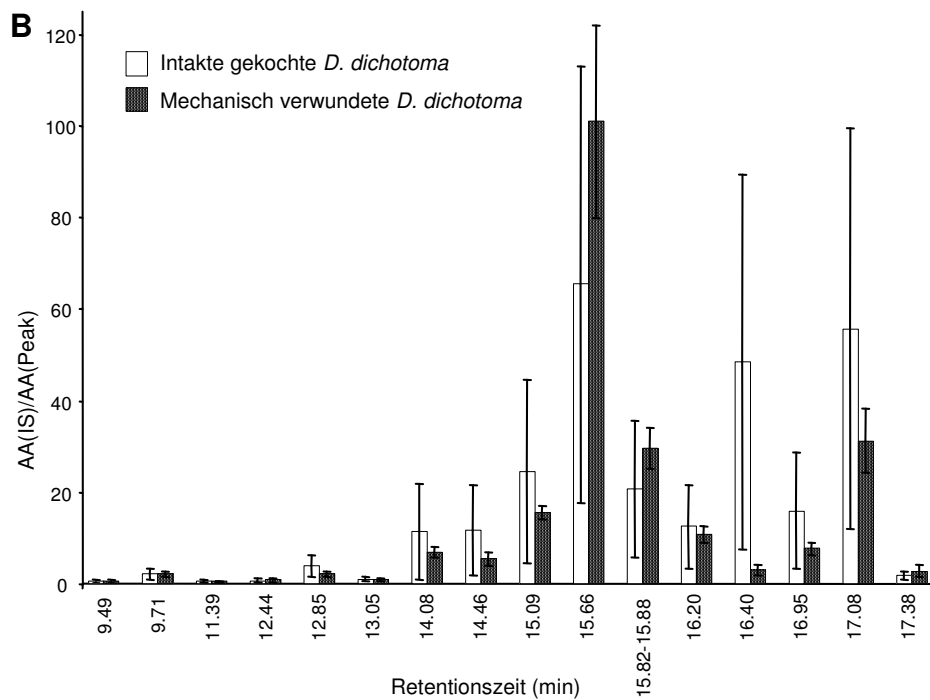
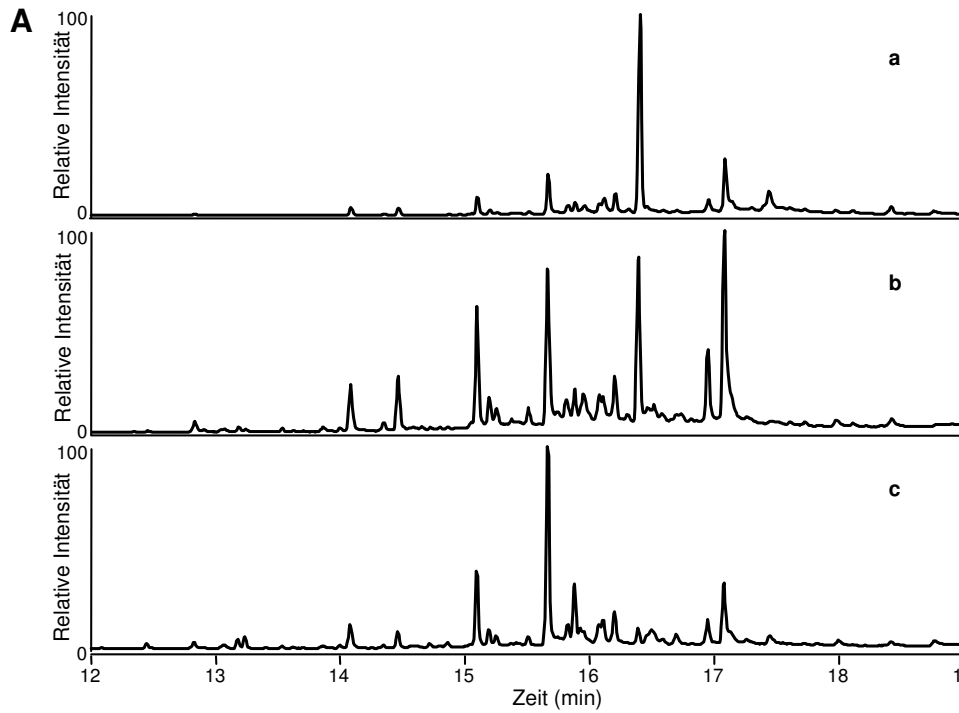




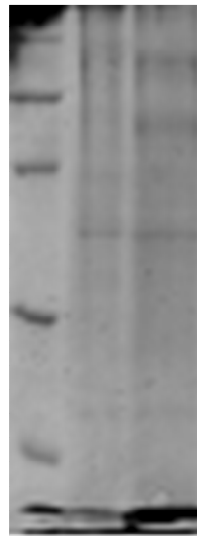
Exemplarisches Beispiel für den Vergleich von derivatisierten GC/MS Proben (Diazomethan und MSTFA) mit intakten und verwundeten *D. dichotoma* Proben (5 min nach Verwundung):



Exemplarisches Beispiel für den Vergleich von GC/MS Untersuchungen (ohne Derivatisierung) mit intakten und verwundeten *D. dichotoma* Proben (48 h nach Verwundung). A: Beispielchromatogramm (a) schockgefrorene *D. dichotoma* (Inhibierung der Enzymaktivität ist reversibel); b) gekochte *D. dichotoma*; c) mechanisch verwundete *D. dichotoma*); B: statistische Auswertung.



SDS-Page von Proteinextrakten aus *D. dichotoma*; A: Marker; B: *D. dichotoma* gekocht; C: *D. dichotoma* 48 h nach Verwundung:



A B C

Kalibrationsgleichungen für Festphasenmikroextraktionen (SPME) mariner Algen, die während der verschiedenen Versuchsreihen ermittelt wurden:

**Finnigan ITS Gaschromatograph  
gekoppelt mit Finnigan TraceMS**

Kalibration	TMA	DMS
Datum	59 m/z	62 m/z
03.12.2003	$y = 86369.3x$ $r^2 = 0.76$	$y = 6656709.2x$ $r^2 = 0.89$
11.12.2003	$y = 149105x$ $r^2 = 0.74$	$y = 4344749x$ $r^2 = 0.83$
24.02.2004	$y = 477572.73x$ $r^2 = 0.93$	$y = 13575206.32x$ $r^2 = 0.99$
04.03.2004	$y = 270597.16x$ $r^2 = 0.82$	$10497553.1x$ $r^2 = 0.85$
29.04.2005	$y = 31297.78x$ $r^2 = 0.91$	$y = 1664776.94x$ $r^2 = 0.88$
17.06.2005	$y = 48884.53x$ $r^2 = 0.99$	$y = 2085297.08x$ $r^2 = 0.97$

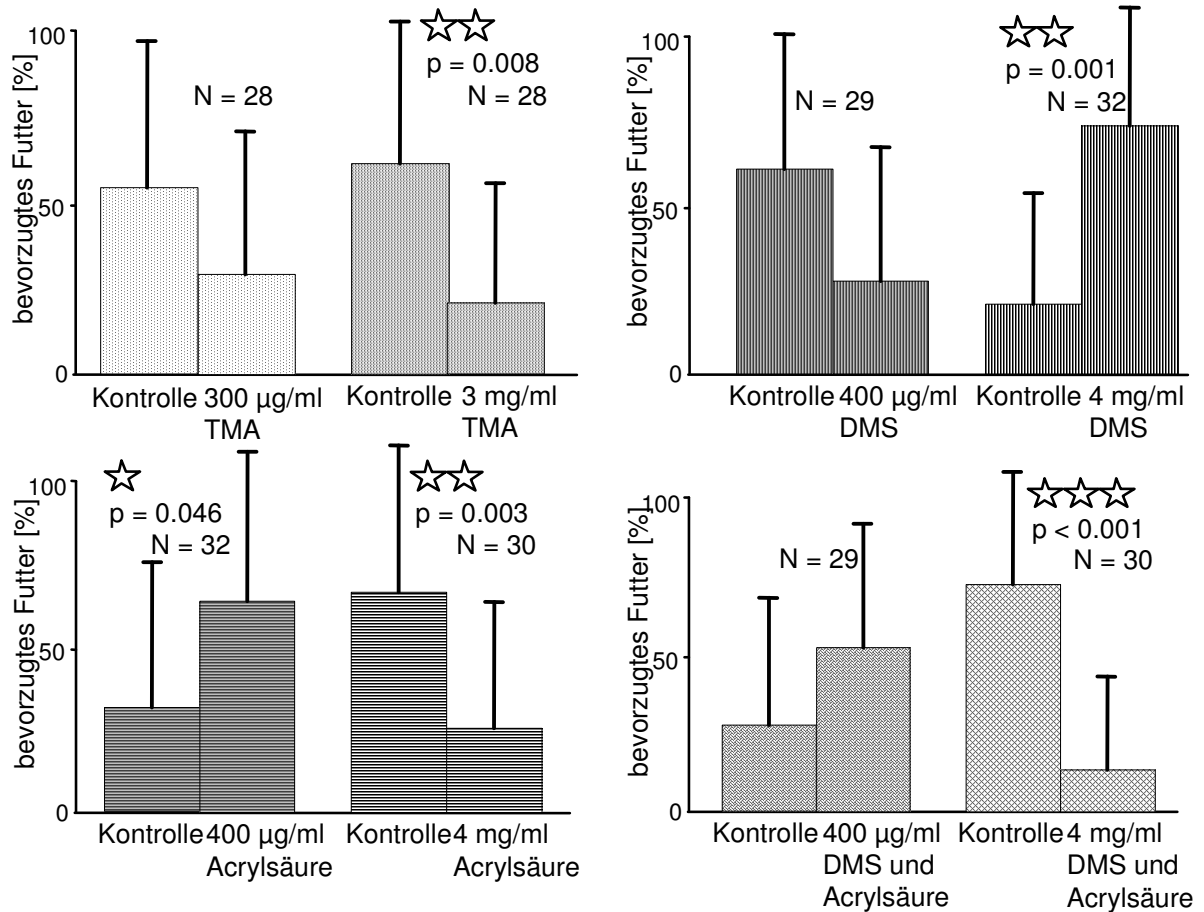
**Agilent 6890N Gaschromatograph  
gekoppelt mit GCT Premier**

Kalibration	TMA	DMS
Datum	58 m/z	62 m/z
23.03.2006	$y = 10.69x$ $r^2 = 0.94$	$y = 5825.53x$ $r^2 = 0.99$
04.04.2006	$y = 288.77x$ $r^2 = 0.97$	$y = 7378.28x$ $r^2 = 0.98$
05.04.2006	$y = 20.11x$ $r^2 = 0.99$	$y = 1151.84x$ $r^2 = 0.99$
30.05.2006		$y = 3042.40x$ $r^2 = 0.99$

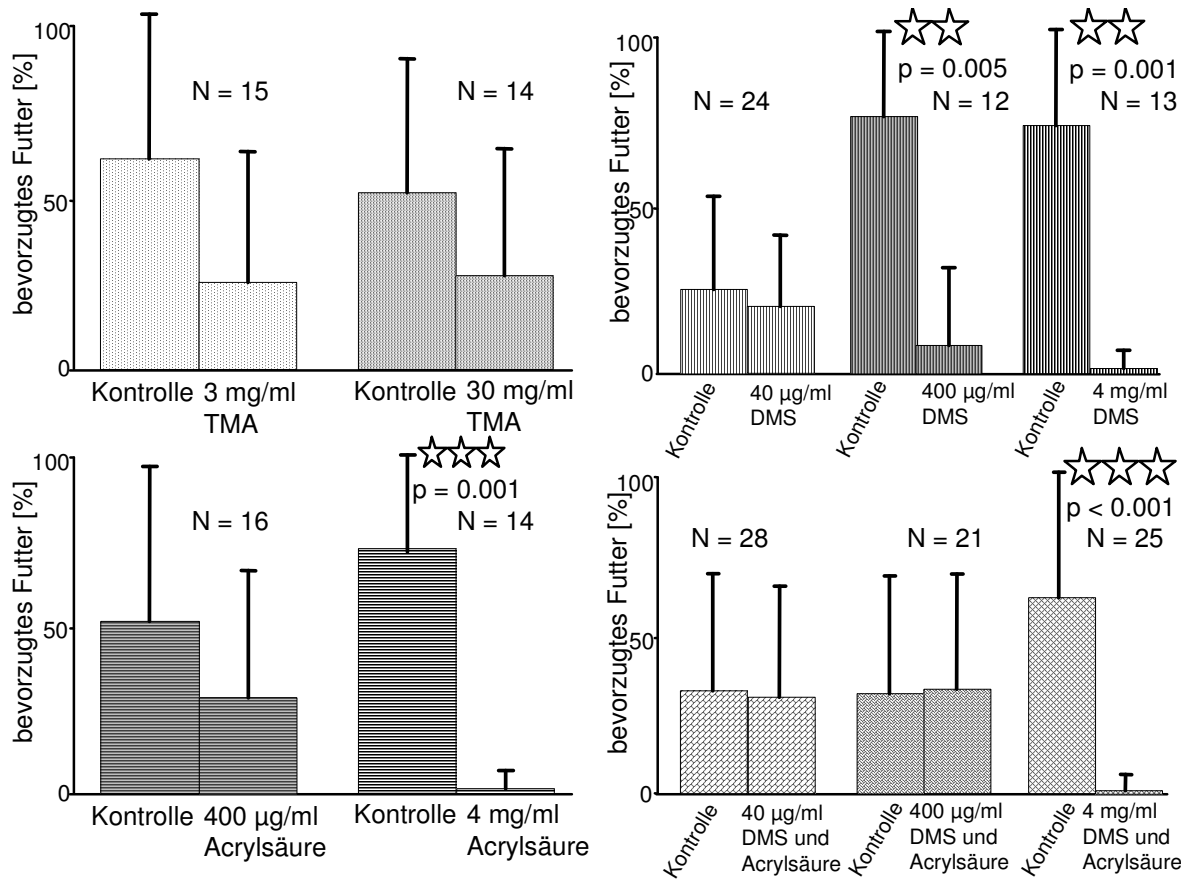
**Kalibration in 50 ml Einhalsskolben**  
13.06.2006  $y = 10.74x$   
 $r^2 = 0.99$



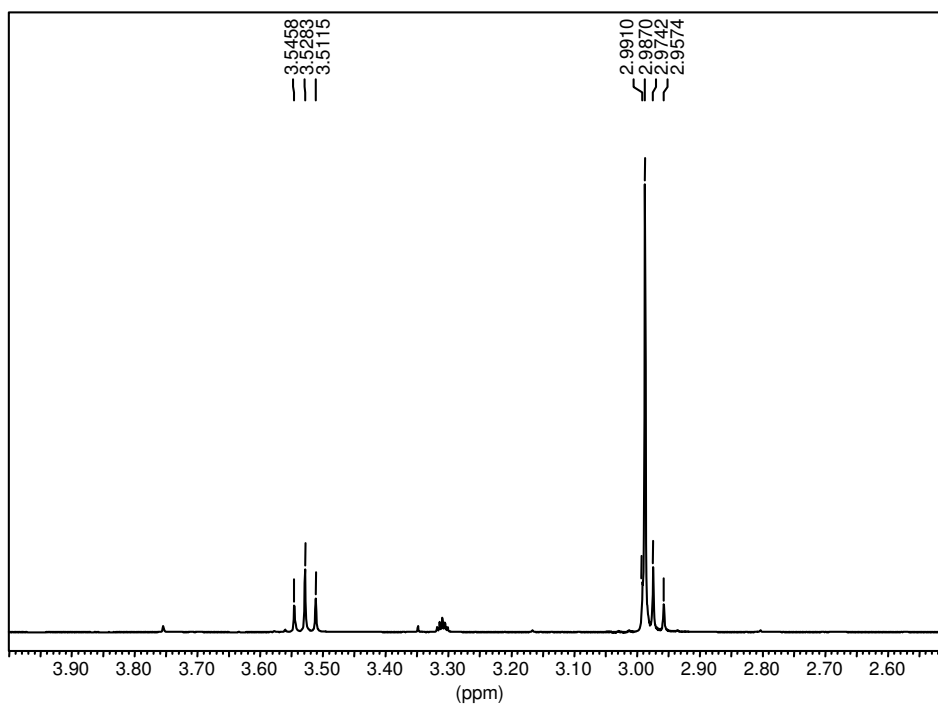
Fütterungsexperimente mit Amphipoden für einzelne Komponenten und einem Mix aus DMS und Acrylsäure, mit Standardabweichung. Die Prozentzahl gibt an, wie oft sich die einzelnen Versuchstiere während der Versuchsdauer auf dem jeweiligen Futter befinden (5 Messpunkte = 100%, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder) (Wilcoxon-t-Test für Signifikanzbestimmung):



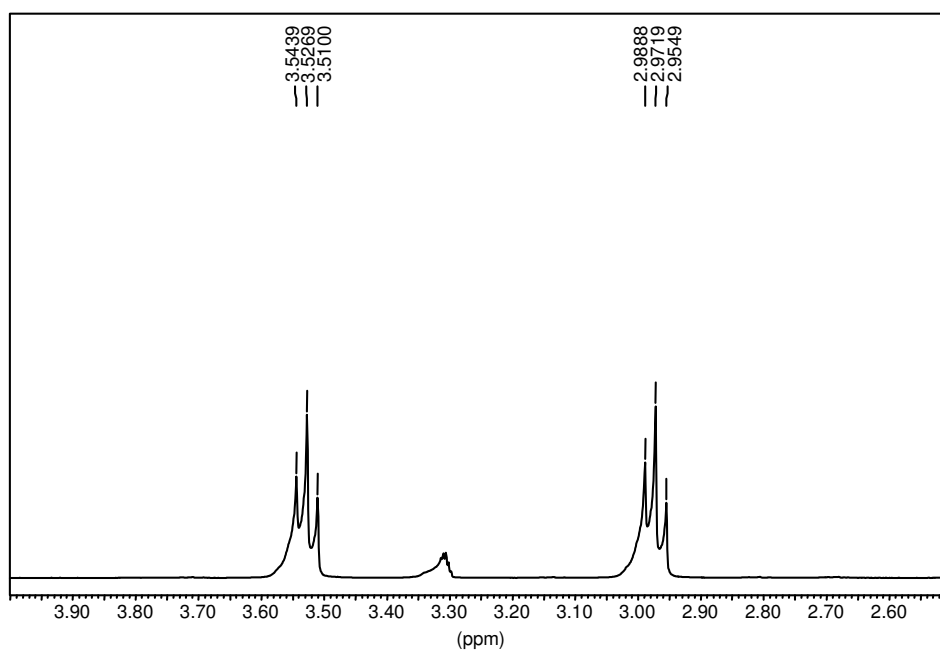
Fütterungsexperimente mit Isopoden für einzelne Komponenten und einem Mix aus DMS und Acrylsäure, mit Standardabweichung. Die Prozentzahl gibt an, wie oft sich die einzelnen Versuchstiere während der Versuchsdauer auf dem jeweiligen Futter befinden (5 Messpunkte = 100%).



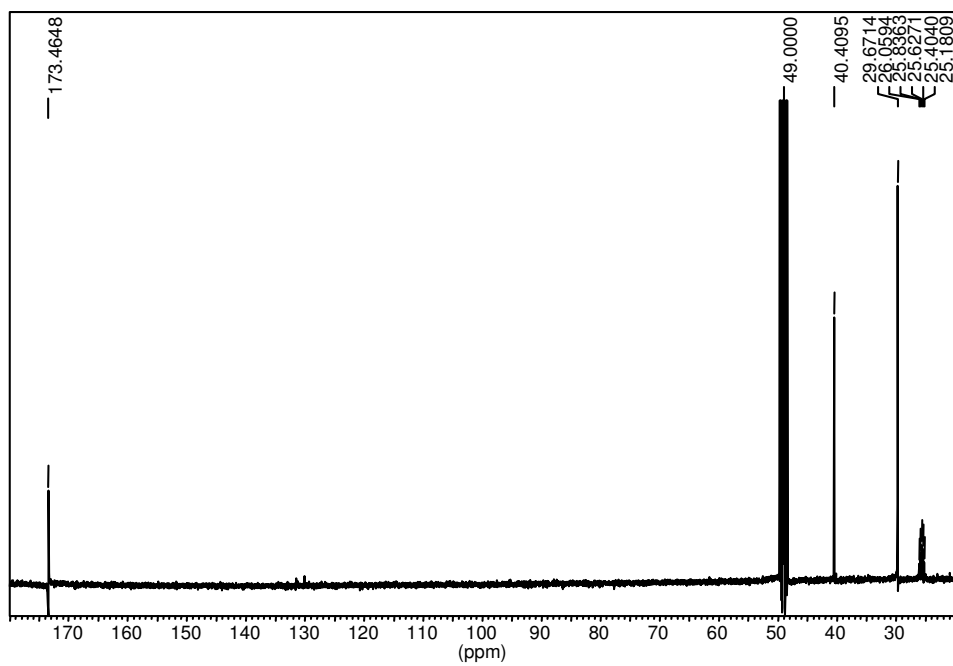
DMSP x HCl ( $^1\text{H}$  NMR ( $[\text{}^2\text{H}_4]\text{-MeOD}$ , 400 MHz):



$[\text{}^2\text{H}_6]\text{-DMSP x HCl}$  ( $^1\text{H}$  NMR:  $[\text{}^2\text{H}_4]\text{-MeOD}$ , 400 MHz)



$[\text{}^2\text{H}_6]$ -DMSP x HCl ( $^{13}\text{C}$  NMR:  $[\text{}^2\text{H}_4]$ -MeOD, 100 MHz)



Flächenvergleiche der einzelnen Peaks zum internen Standard der GC/MS-Analysen von induzierten derivatisierten *D. dichotoma* Proben (0,1; 0,5 und 1 mg/ml JA/Seewasser, 2, 24 und 48 h) mit Kontrollproben (alle Peaks größer 5 % wurden berücksichtigt):

Retentionszeit [min]	6,65	6,79	6,85	7,85	10,03	10,99	11,34	11,56
	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)
Kontrolle <sup>a</sup>	0,0038±0,0056	0,0023±0,0015	0,0038±0,0015	0,0025±0,0010	0,0082±0,0226	0,0079±0,0245	0,0006±0,0006	0,0003±0,0004
Kontrolle <sup>b</sup>	0,0020±0,0004	0,0026±0,0006	0,0055±0,0003	0,0036±0,0001	0,0015±0,0003	0,0005±0,0002	0,0003±0,0003	n.d.
Kontrolle <sup>c</sup>	0,0105±0,0091	0,0031±0,0028	0,0026±0,0023	0,0014±0,0012	0,0281±0,0448	0,0308±0,0474	0,0010±0,0009	0,0003±0,0003
Kontrolle <sup>d</sup>	0,0005±0,0001	0,0013±0,0013	0,0036±0,0008	0,0026±0,0001	0,0021±0,0004	0,0003±0,0000	0,0001±0,0000	n.d.
JA, 100µg/ml, 24h <sup>a</sup>	0,0021±0,0008	0,0007±0,0002	0,0029±0,0007	0,0023±0,0006	0,0019±0,0006	0,0002±0,0002	0,0009±0,0006	0,0008±0,0003
JA, 100µg/ml, 24h <sup>b</sup>	0,0023±0,0004	0,0017±0,0014	0,0036±0,0024	0,0012±0,0015	0,0021±0,0012	0,0002±0,0002	0,0001±0,0001	n.d.
JA, 100µg/ml, 48h <sup>a</sup>	0,0025±0,0023	0,0007±0,0001	0,0029±0,0003	0,0018±0,0002	0,0019±0,0017	0,0001±0,0002	0,0005±0,0003	0,0006±0,0001
JA, 100µg/ml, 48h <sup>b</sup>	0,0014±0,0004	0,0017±0,0005	0,0024±0,0013	0,0026±0,0001	0,0014±0,0003	0,0002±0,0000	0,0003±0,0000	n.d.
JA, 500µg/ml, 2h <sup>c</sup>	0,0379±0,0077	0,0139±0,0001	0,0032±0,0011	0,0034±0,0016	0,0044±0,0025	0,0022±0,0005	0,0020±0,0015	0,0008±0,0007
JA, 500µg/ml, 24h <sup>c</sup>	0,0291±0,0167	0,0134±0,0019	0,0028±0,0003	0,0019±0,0001	0,0035±0,0004	0,0023±0,0004	0,0017±0,0011	0,0005±0,0008
JA, 500µg/ml, 48h <sup>c</sup>	0,0208±0,0282	0,0325±0,0145	0,0176±0,0179	0,0019±0,0001	0,0023±0,0007	0,0015±0,0002	0,0009±0,0004	n.d.
JA, 1mg/ml, 2h <sup>a</sup>	0,0022±0,0010	0,0009±0,0002	0,32±0,0006	0,0020±0,0003	0,0014±0,0005	0,0000±0,0001	0,0005±0,0001	0,0009±0,0000
JA, 1mg/ml, 2h <sup>b</sup>	0,0022±0,0003	0,0052±0,0019	0,0054±0,0007	0,0032±0,0002	0,0018±0,0010	0,0003±0,0001	0,0002±0,0000	n.d.
JA, 1mg/ml, 24h <sup>a</sup>	0,0021±0,0002	0,0028±0,0006	0,0032±0,0009	0,0020±0,0006	0,0014±0,0004	0,0001±0,0001	0,0005±0,0002	0,0011±0,0007
JA, 1mg/ml, 24h <sup>b</sup>	0,0011±0,0006	0,0025±0,0015	0,0033±0,0018	0,0024±0,0006	0,0023±0,0005	0,0002±0,0000	0,0003±0,0002	n.d.
JA, 1mg/ml, 48h <sup>a</sup>	0,0016±0,0004	0,0022±0,0010	0,0032±0,0000	0,0020±0,0001	0,0010±0,0005	0,0001±0,0000	0,0005±0,0001	0,0009±0,0003
JA, 1mg/ml, 48h <sup>b</sup>	0,0007±0,0003	0,0019±0,0013	0,0018±0,0011	0,0018±0,0004	0,0037±0,0028	0,0003±0,0001	0,0003±0,0000	n.d.
JA, 1mg/ml, 48h <sup>d</sup>	0,0004±0,0002	0,0007±0,0006	0,0054±0,0007	0,0019±0,0001	0,0028±0,0007	0,0002±0,0001	0,0001±0,0000	n.d.

- a) 17.08.2004  
b) 30.08.2004  
c) 21.09.2004  
d) 24.08.2004

Retentionszeit [min]	11,66	11,97	12,15	12,35	12,77	12,86	13,14	13,30
	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)
Kontrolle <sup>a</sup>	0,0006±0,0009	0,0005±0,0005	0,0004±0,0006	0,0008±0,0006	0,0002±0,0004	n.d.	0,0006±0,0007	0,0048±0,0066
Kontrolle <sup>b</sup>	0,0002±0,0000	0,0005±0,0002	0,0003±0,0001	0,0006±0,0003	n.d.	n.d.	0,0003±0,0000	0,0030±0,0006
Kontrolle <sup>c</sup>	0,0003±0,0003	0,0010±0,0009	0,0010±0,0009	0,0013±0,0012	n.d.	n.d.	0,0012±0,0011	0,0119±0,0112
Kontrolle <sup>d</sup>	n.d.	0,0002±0,0001	0,0001±0,0001	0,0007±0,0002	0,0001±0,0001	n.d.	0,0002±0,0000	0,0005±0,0007
JA, 100µg/ml, 24h <sup>a</sup>	0,0020±0,0008	0,0004±0,0003	n.d.	0,0004±0,0002	0,0003±0,0002	n.d.	0,0005±0,0003	0,0009±0,0006
JA, 100µg/ml, 24h <sup>b</sup>	0,0000±0,0001	0,0002±0,0002	0,0002±0,0002	0,0007±0,0008	n.d.	0,0001±0,0001	0,0001±0,0001	0,0016±0,0017
JA, 100µg/ml, 48h <sup>a</sup>	0,0012±0,0002	0,0002±0,0001	0,0001±0,0001	0,0003±0,0001	0,0002±0,0001	0,0001±0,0001	0,0003±0,0003	0,0005±0,0003
JA, 100µg/ml, 48h <sup>b</sup>	0,0001±0,0001	0,0002±0,0000	0,0004±0,0001	0,0008±0,0005	0,0002±0,0001	0,0002±0,0002	0,0003±0,0000	0,0042±0,0005
JA, 500µg/ml, 2h <sup>c</sup>	n.d.	0,0006±0,0002	0,0010±0,0002	0,0047±0,0046	0,0006±0,0009	n.d.	0,0009±0,0001	0,0075±0,0010
JA, 500µg/ml, 24h <sup>c</sup>	n.d.	0,0018±0,0013	0,0095±0,0089	0,0363±0,0256	n.d.	n.d.	0,0009±0,0002	0,0065±0,0031
JA, 500µg/ml, 48h <sup>c</sup>	0,0015±0,0022	0,0132±0,0118	0,1524±0,1218	0,2115±0,1330	n.d.	n.d.	0,0004±0,0005	0,0079±0,0014
JA, 1mg/ml, 2h <sup>a</sup>	0,0020±0,0001	0,0002±0,0001	n.d.	0,0009±0,0003	0,0002±0,0002	n.d.	0,0002±0,0000	0,0004±0,0001
JA, 1mg/ml, 2h <sup>b</sup>	0,0000±0,0001	0,0004±0,0001	0,0005±0,0001	0,0035±0,0013	0,0002±0,0003	n.d.	0,0004±0,0004	0,0032±0,0022
JA, 1mg/ml, 24h <sup>a</sup>	0,0023±0,0013	0,0001±0,0002	0,0001±0,0002	0,0017±0,0006	0,0001±0,0002	n.d.	0,0002±0,0001	0,0004±0,0002
JA, 1mg/ml, 24h <sup>b</sup>	n.d.	0,0002±0,0001	0,0008±0,0006	0,0046±0,0024	n.d.	n.d.	0,0001±0,0001	0,0003±0,0002
JA, 1mg/ml, 48h <sup>a</sup>	0,0020±0,0006	0,0004±0,0001	0,0017±0,0005	0,0035±0,0003	0,0001±0,0001	n.d.	0,0002±0,0001	0,0004±0,0001
JA, 1mg/ml, 48h <sup>b</sup>	n.d.	0,0009±0,0005	0,0223±0,0113	0,0190±0,0078	n.d.	n.d.	0,0001±0,0001	0,0001±0,0002
JA, 1mg/ml, 48h <sup>d</sup>	n.d.	0,0001±0,0001	0,0001±0,0001	0,0027±0,0031	n.d.	n.d.	0,0001±0,0001	0,0001±0,0001

- a) 17.08.2004  
b) 30.08.2004  
c) 21.09.2004  
d) 24.08.2004

Retentionszeit [min]	13,51	13,83	13,98	14,32	14,77	14,87	15,17	15,41
	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)
Kontrolle <sup>a</sup>	0,0015±0,0017	0,0003±0,0006	0,0018±0,0024	0,0002±0,0003	n.d.	0,0006±0,0010	0,0012±0,0015	0,0043±0,0050
Kontrolle <sup>b</sup>	0,0002±0,0001	0,0002±0,0001	0,0008±0,0001	0,0001±0,0000	n.d.	n.d.	0,0008±0,0002	0,0021±0,0018
Kontrolle <sup>c</sup>	0,0012±0,0011	0,0010±0,0009	0,0040±0,0042	0,0005±0,0005	n.d.	n.d.	0,0028±0,0026	0,0087±0,0086
Kontrolle <sup>d</sup>	0,0008±0,0009	0,0001±0,0001	0,0003±0,0004	n.d.	n.d.	0,0001±0,0001	0,0003±0,0001	0,0007±0,0007
JA, 100µg/ml, 24h <sup>a</sup>	0,0017±0,0012	n.d.	0,0007±0,0004	0,0001±0,0001	0,0005±0,0004	0,0015±0,0008	0,0004±0,0003	0,0019±0,0012
JA, 100µg/ml, 24h <sup>b</sup>	0,0001±0,0001	n.d.	0,0015±0,0015	0,0033±0,0055	n.d.	n.d.	0,0004±0,0006	0,0013±0,0016
JA, 100µg/ml, 48h <sup>a</sup>	0,0007±0,0006	n.d.	0,0005±0,0003	0,0001±0,0001	0,0002±0,0001	0,0010±0,0003	0,0003±0,0001	0,0010±0,0005
JA, 100µg/ml, 48h <sup>b</sup>	0,0001±0,0001	n.d.	0,0017±0,0004	0,0002±0,0000	n.d.	n.d.	0,0006±0,0001	0,0057±0,0016
JA, 500µg/ml, 2h <sup>c</sup>	0,0016±0,0004	0,0007±0,0001	0,0027±0,0008	n.d.	n.d.	n.d.	0,0069±0,0030	0,0067±0,0001
JA, 500µg/ml, 24h <sup>c</sup>	0,0017±0,0003	0,0003±0,0004	0,0029±0,0023	n.d.	n.d.	0,0056±0,0050	0,0538±0,0490	0,0087±0,0079
JA, 500µg/ml, 48h <sup>c</sup>	0,0042±0,0047	n.d.	0,0021±0,0025	n.d.	n.d.	0,1129±0,0946	0,2930±0,2195	0,0123±0,0051
JA, 1mg/ml, 2h <sup>a</sup>	0,0006±0,0001	n.d.	0,0004±0,0001	n.d.	n.d.	0,0013±0,0003	0,0008±0,0002	0,0023±0,0004
JA, 1mg/ml, 2h <sup>b</sup>	0,0001±0,0001	0,0003±0,0002	0,0012±0,0010	0,0001±0,0001	n.d.	0,0009±0,0016	0,0014±0,0005	0,0040±0,0033
JA, 1mg/ml, 24h <sup>a</sup>	0,0005±0,0004	n.d.	0,0004±0,0001	0,0000±0,0001	n.d.	0,0010±0,0007	0,0015±0,0009	0,0012±0,0009
JA, 1mg/ml, 24h <sup>b</sup>	0,0001±0,0001	n.d.	0,0002±0,0000	0,0004±0,0001	n.d.	0,0004±0,0004	0,0029±0,0021	0,0006±0,0005
JA, 1mg/ml, 48h <sup>a</sup>	0,0005±0,0000	n.d.	0,0003±0,0000	n.d.	n.d.	0,0020±0,0004	0,0023±0,0006	0,0011±0,0004
JA, 1mg/ml, 48h <sup>b</sup>	0,0001±0,0001	n.d.	0,0001±0,0001	n.d.	n.d.	0,0068±0,0067	0,0087±0,0051	0,0006±0,0003
JA, 1mg/ml, 48h <sup>d</sup>	0,0001±0,0001	n.d.	0,0001±0,0001	n.d.	n.d.	n.d.	0,0017±0,0021	0,0003±0,0002

a) 17.08.2004

b) 30.08.2004

c) 21.09.2004

d) 24.08.2004

Retentionszeit [min]	15,61	15,72	16,05	16,28	16,61	16,82	17,04	17,16
	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)
Kontrolle <sup>a</sup>	0,0027±0,0036	0,0014±0,0027	0,0019±0,0024	0,0027±0,0025	0,0008±0,0015	0,0007±0,0011	0,0260±0,0703	0,0010±0,0016
Kontrolle <sup>b</sup>	0,0019±0,0005	n.d.	0,0011±0,0002	0,0034±0,0013	n.d.	0,0006±0,0001	0,0026±0,0008	n.d.
Kontrolle <sup>c</sup>	0,0065±0,0063	n.d.	0,0041±0,0039	0,0047±0,0043	n.d.	0,0019±0,0018	0,0898±0,1377	n.d.
Kontrolle <sup>d</sup>	0,0006±0,0008	n.d.	0,0001±0,0001	0,0005±0,0007	n.d.	0,0001±0,0001	0,0005±0,0003	0,0008±0,0012
JA, 100µg/ml, 24h <sup>a</sup>	0,0019±0,0026	0,0026±0,0027	0,0000±0,0001	0,0006±0,0005	0,0007±0,0004	0,0002±0,0001	0,0039±0,0017	0,0013±0,0008
JA, 100µg/ml, 24h <sup>b</sup>	0,0011±0,0013	0,0000±0,0001	0,0008±0,0007	0,0018±0,0017	n.d.	0,0003±0,0003	0,0014±0,0014	n.d.
JA, 100µg/ml, 48h <sup>a</sup>	0,0003±0,0002	0,0008±0,0004	0,0000±0,0001	0,0002±0,0001	0,0006±0,0001	0,0001±0,0001	0,0031±0,0010	0,0008±0,0004
JA, 100µg/ml, 48h <sup>b</sup>	0,0036±0,0007	n.d.	0,0018±0,0005	0,0062±0,0014	n.d.	0,0006±0,0000	0,0033±0,0003	n.d.
JA, 500µg/ml, 2h <sup>c</sup>	0,0049±0,0005	n.d.	0,0030±0,0002	0,0056±0,0005	n.d.	0,0012±0,0005	0,0076±0,0007	n.d.
JA, 500µg/ml, 24h <sup>c</sup>	0,0057±0,0030	n.d.	0,0037±0,0015	0,0081±0,0067	n.d.	0,0010±0,0005	0,0060±0,0017	n.d.
JA, 500µg/ml, 48h <sup>c</sup>	0,0060±0,0010	n.d.	0,0029±0,0002	n.d.	n.d.	n	0,0057±0,0004	n.d.
JA, 1mg/ml, 2h <sup>a</sup>	0,0006±0,0002	0,0004±0,0002	0,0001±0,0001	0,0002±0,0001	0,0001±0,0001	n.d.	0,0031±0,0009	0,0003±0,0001
JA, 1mg/ml, 2h <sup>b</sup>	0,0028±0,0021	n.d.	0,0027±0,0020	0,0038±0,0028	n.d.	0,0005±0,0003	0,0024±0,0012	0,0001±0,0001
JA, 1mg/ml, 24h <sup>a</sup>	0,0004±0,0003	n.d.	n.d.	0,0001±0,0000	0,0001±0,0001	n.d.	0,0012±0,0010	0,0004±0,0002
JA, 1mg/ml, 24h <sup>b</sup>	0,0003±0,0002	n.d.	0,0002±0,0000	0,0003±0,0003	n.d.	n.d.	0,0004±0,0001	n.d.
JA, 1mg/ml, 48h <sup>a</sup>	0,0004±0,0002	0,0004±0,0002	n.d.	0,0001±0,0001	0,0001±0,0002	n.d.	0,0039±0,0013	0,0004±0,0002
JA, 1mg/ml, 48h <sup>b</sup>	0,0004±0,0001	n.d.	0,0000±0,0001	0,0001±0,0001	n.d.	n.d.	0,0001±0,0002	n.d.
JA, 1mg/ml, 48h <sup>d</sup>	0,0003±0,0001	n.d.	0,0001±0,0001	0,0001±0,0001	n.d.	0,0002±0,0001	0,0002±0,0000	n.d.

a) 17.08.2004

b) 30.08.2004

c) 21.09.2004

d) 24.08.2004

Retentionszeit [min]	17,37	17,59	17,80	18,18	18,40	18,88	19,06	19,28
	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)
Kontrolle <sup>a</sup>	0,0003±0,0005	0,0204±0,0495	0,0117±0,0172	0,0145±0,0189	0,0012±0,0018	0,0005±0,0007	0,0009±0,0012	0,0001±0,0004
Kontrolle <sup>b</sup>	0,0008±0,0006	0,0149±0,0129	0,0088±0,0118	n.d.	0,0001±0,0001	n.d.	0,0003±0,0001	n.d.
Kontrolle <sup>c</sup>	n.d.	0,0608±0,0993	0,0306±0,0269	0,0090±0,0087	0,0005±0,0006	0,0012±0,0011	0,0010±0,0009	n.d.
Kontrolle <sup>d</sup>	0,0002±0,0003	0,0003±0,0005	0,0016±0,0023	0,0003±0,0003	0,0000±0,0001	n.d.	n.d.	0,0004±0,0008
JA, 100µg/ml, 24h <sup>a</sup>	n.d.	0,0016±0,0013	0,0019±0,0021	0,0128±0,0101	0,0010±0,0005	n.d.	0,0006±0,0004	n.d.
JA, 100µg/ml, 24h <sup>b</sup>	n.d.	0,0103±0,0117	0,0011±0,0011	0,0026±0,0031	n.d.	n.d.	0,0001±0,0002	n.d.
JA, 100µg/ml, 48h <sup>a</sup>	n.d.	0,0006±0,0001	0,0007±0,0004	0,0079±0,0012	0,0008±0,0003	n.d.	0,0003±0,0001	n.d.
JA, 100µg/ml, 48h <sup>b</sup>	n.d.	0,0255±0,0034	0,0026±0,0002	0,0101±0,0034	0,0001±0,0001	n.d.	0,0003±0,0001	n.d.
JA, 500µg/ml, 2h <sup>c</sup>	0,0005±0,0007	0,0228±0,0015	0,0020±0,0022	0,0076±0,0007	0,0005±0,0007	n.d.	0,0003±0,0004	n.d.
JA, 500µg/ml, 24h <sup>c</sup>	0,0016±0,0005	0,0246±0,0142	0,0028±0,0018	0,0027±0,0009	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
JA, 500µg/ml, 48h <sup>c</sup>	0,0004±0,0006	0,0653±0,0440	0,0426±0,0149	0,0028±0,0012	0,0013±0,0001	n.d.	n.d.	n.d.
JA, 1mg/ml, 2h <sup>a</sup>	n.d.	0,0006±0,0002	0,0004±0,0002	0,0018±0,0012	0,0005±0,0005	n.d.	0,0000±0,0001	n.d.
JA, 1mg/ml, 2h <sup>b</sup>	0,0012±0,0007	0,0165±0,0085	0,0014±0,0007	0,0046±0,0028	0,0004±0,0004	0,0004±0,0004	0,0002±0,0001	0,0003±0,0003
JA, 1mg/ml, 24h <sup>a</sup>	n.d.	0,0002±0,0001	0,0003±0,0002	0,0005±0,0004	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
JA, 1mg/ml, 24h <sup>b</sup>	0,0000±0,0001	0,0002±0,0000	0,0002±0,0001	0,0001±0,0001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
JA, 1mg/ml, 48h <sup>a</sup>	n.d.	0,0006±0,0001	0,0005±0,0001	0,0022±0,0011	0,0003±0,0005	n.d.	0,0001±0,0001	n.d.
JA, 1mg/ml, 48h <sup>b</sup>	n.d.	0,0002±0,0003	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
JA, 1mg/ml, 48h <sup>d</sup>	n.d.	0,0001±0,0001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

- a) 17.08.2004  
b) 30.08.2004  
c) 21.09.2004  
d) 24.08.2004

Retentionszeit [min]	19,39	19,52	19,74	19,90
	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)
Kontrolle <sup>a</sup>	n.d.	0,0016±0,0018	n.d.	0,0036±0,0060
Kontrolle <sup>b</sup>	0,0003±0,0001	0,0007±0,0003	n.d.	0,0014±0,0003
Kontrolle <sup>c</sup>	n.d.	0,0024±0,0022	n.d.	0,0017±0,0017
Kontrolle <sup>d</sup>	n.d.	0,0000±0,0001	n.d.	0,0003±0,0003
JA, 100µg/ml, 24h <sup>a</sup>	0,0008±0,0006	0,0008±0,0006	0,0005±0,0004	0,0039±0,0029
JA, 100µg/ml, 24h <sup>b</sup>	0,0001±0,0002	0,0003±0,0005	0,0004±0,0005	0,0006±0,0007
JA, 100µg/ml, 48h <sup>a</sup>	0,0004±0,0002	0,0004±0,0002	0,0003±0,0003	0,0022±0,0004
JA, 100µg/ml, 48h <sup>b</sup>	0,0003±0,0002	0,0014±0,0003	0,0007±0,0005	0,0016±0,0006
JA, 500µg/ml, 2h <sup>c</sup>	n.d.	0,0028±0,0017	n.d.	0,0015±0,0003
JA, 500µg/ml, 24h <sup>c</sup>	n.d.	0,0014±0,0001	n.d.	0,0014±0,0020
JA, 500µg/ml, 48h <sup>c</sup>	n.d.	0,0018±0,0000	n.d.	n.d.
JA, 1mg/ml, 2h <sup>a</sup>	n.d.	0,0005±0,0002	n.d.	0,0006±0,0004
JA, 1mg/ml, 2h <sup>b</sup>	n.d.	0,0008±0,0007	n.d.	0,0007±0,0004
JA, 1mg/ml, 24h <sup>a</sup>	n.d.	0,0004±0,0003	n.d.	0,0006±0,0004
JA, 1mg/ml, 24h <sup>b</sup>	n.d.	0,0001±0,0001	n.d.	0,0002±0,0002
JA, 1mg/ml, 48h <sup>a</sup>	n.d.	0,0005±0,0002	n.d.	0,0006±0,0003
JA, 1mg/ml, 48h <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
JA, 1mg/ml, 48h <sup>d</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

- a) 17.08.2004  
b) 30.08.2004  
c) 21.09.2004  
d) 24.08.2004

Flächenvergleiche der einzelnen Peaks zum internen Standard der GC/MS-Analysen von induzierten derivatisierten *D. dichotoma* Proben (0,1; 0,5 und 1 mg/ml MeJA/Seewasser, 2, 24 und 48 h) mit Kontrollproben (alle Peaks größer 5 % wurden berücksichtigt):

Retentionszeit [min]	6,65	6,79	6,85	7,85	10,03	10,99	11,34	11,56
	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)
Kontrolle <sup>a</sup>	0,0038±0,0056	0,0023±0,0015	0,0038±0,0015	0,0025±0,0010	0,0082±0,0226	0,0079±0,0245	0,0006±0,0006	0,0003±0,0004
Kontrolle <sup>b</sup>	0,0020±0,0004	0,0026±0,0006	0,0055±0,0003	0,0036±0,0001	0,0015±0,0003	0,0005±0,0002	0,0003±0,0003	n.d.
Kontrolle <sup>c</sup>	0,0105±0,0091	0,0031±0,0028	0,0026±0,0023	0,0014±0,0012	0,0281±0,0448	0,0308±0,0474	0,0010±0,0009	0,0003±0,0003
Kontrolle, 24h <sup>d</sup>	0,0005±0,0001	0,0013±0,0013	0,0036±0,0008	0,0026±0,0001	0,0021±0,0004	0,0003±0,0000	0,0001±0,0000	n.d.
MeJA, 100µg/ml, 24h <sup>a</sup>	0,0023±0,0001	0,0011±0,0008	0,0033±0,0005	0,0029±0,0002	0,0023±0,0008	0,0001±0,0000	0,0012±0,0009	0,0014±0,0004
MeJA, 100µg/ml, 24h <sup>b</sup>	0,0020±0,0002	0,0026±0,0008	0,0032±0,0008	0,0025±0,0001	0,0016±0,0006	0,0003±0,0001	0,0003±0,0002	n.d.
MeJA, 100µg/ml, 48h <sup>a</sup>	0,0022±0,0000	0,0006±0,0003	0,0031±0,0006	0,0022±0,0005	0,0019±0,0005	0,0001±0,0000	0,0005±0,0002	0,0006±0,0003
MeJA, 100µg/ml, 48h <sup>b</sup>	0,0011±0,0003	0,0026±0,0019	0,0041±0,0012	0,0029±0,0005	0,0012±0,0005	0,0002±0,0001	0,0001±0,0000	n.d.
MeJA, 100µg/ml, 48h <sup>d</sup>	0,0005±0,0002	0,0010±0,0009	0,0033±0,0007	0,0025±0,0004	0,0020±0,0007	0,0002±0,0000	0,0001±0,0000	n.d.
MeJA, 500µg/ml, 24h <sup>c</sup>	0,0291±0,0167	0,0134±0,0019	0,0028±0,0003	0,0019±0,0001	0,0035±0,0004	0,0023±0,0004	0,0017±0,0011	0,0005±0,0008
MeJA, 500µg/ml, 48h <sup>c</sup>	0,0208±0,0282	0,0325±0,0145	0,0176±0,0179	0,0019±0,0001	0,0023±0,0007	0,0015±0,0002	0,0009±0,0004	n.d.
MeJA, 1mg/ml, 2h <sup>a</sup>	0,0013±0,0002	0,0015±0,0006	0,0026±0,0007	0,0016±0,0002	0,0016±0,0007	n.d.	0,0005±0,0000	0,0006±0,0000
MeJA, 1mg/ml, 2h <sup>b</sup>	0,0012±0,0001	0,0016±0,0012	0,0031±0,0010	0,0025±0,0001	0,0022±0,0011	0,0004±0,0002	0,0002±0,0001	0,0001±0,0001
MeJA, 1mg/ml, 24h <sup>a</sup>	0,0018±0,0006	0,0012±0,0006	0,0027±0,0001	0,0027±0,0001	0,0021±0,0010	n.d.	0,0005±0,0001	0,0006±0,0002
MeJA, 1mg/ml, 24h <sup>b</sup>	0,0008±0,0007	0,0018±0,0018	0,0025±0,0019	0,0022±0,0007	0,0032±0,0011	n.d.	0,0002±0,0001	n.d.
MeJA, 1mg/ml, 48h <sup>a</sup>	0,0026±0,0005	0,0008±0,0000	0,0037±0,0001	0,0018±0,0002	0,0019±0,0005	0,0002±0,0000	0,0007±0,0001	0,0011±0,0001
MeJA, 1mg/ml, 48h <sup>b</sup>	0,0010±0,0002	0,0032±0,0003	0,0044±0,0011	0,0039±0,0019	0,0068±0,0057	0,0003±0,0002	0,0001±0,0000	0,0002±0,0001
MeJA, 1mg/ml, 48h <sup>d</sup>	0,0007±0,0003	0,0026±0,0016	0,0035±0,0008	0,0024±0,0004	0,0018±0,0011	0,0003±0,0001	0,0001±0,0001	n.d.

a) 17.08.2004

b) 30.08.2004

c) 21.09.2004

d) 24.08.2004

Retentionszeit [min]	11,66	11,97	12,15	12,35	12,77	12,86	13,14	13,30
	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)
Kontrolle <sup>a</sup>	0,0006±0,0009	0,0005±0,0005	0,0004±0,0006	0,0008±0,0006	0,0002±0,0004	n.d.	0,0006±0,0007	0,0048±0,0066
Kontrolle <sup>b</sup>	0,0002±0,0000	0,0005±0,0002	0,0003±0,0001	0,0006±0,0003	n.d.	n.d.	0,0003±0,0000	0,0030±0,0006
Kontrolle <sup>c</sup>	0,0003±0,0003	0,0010±0,0009	0,0010±0,0009	0,0013±0,0012	n.d.	n.d.	0,0012±0,0011	0,0119±0,0112
Kontrolle, 24h <sup>d</sup>	n.d.	0,0002±0,0001	0,0001±0,0001	0,0007±0,0002	0,0001±0,0001	n.d.	0,0002±0,0000	0,0005±0,0007
MeJA, 100µg/ml, 24h <sup>a</sup>	0,0034±0,0008	0,0006±0,0001	0,0003±0,0001	0,0008±0,0004	0,0007±0,0002	0,0007±0,0003	0,0011±0,0003	0,0029±0,0021
MeJA, 100µg/ml, 24h <sup>b</sup>	n.d.	0,0001±0,0000	0,0002±0,0000	0,0013±0,0012	0,0001±0,0001	0,0001±0,0001	0,0001±0,0001	0,0009±0,0002
MeJA, 100µg/ml, 48h <sup>a</sup>	0,0015±0,0006	0,0003±0,0001	0,0001±0,0001	0,0007±0,0006	0,0002±0,0001	0,0000±0,0001	0,0003±0,0001	0,0005±0,0002
MeJA, 100µg/ml, 48h <sup>b</sup>	n.d.	0,0003±0,0001	0,0003±0,0000	0,0023±0,0003	0,0001±0,0001	n.d.	0,0001±0,0000	0,0013±0,0002
MeJA, 100µg/ml, 48h <sup>d</sup>	0,0000±0,0001	0,0002±0,0001	0,0001±0,0001	0,0009±0,0000	n.d.	0,0001±0,0000	0,0002±0,0001	0,0004±0,0005
MeJA, 500µg/ml, 24h <sup>c</sup>	n.d.	0,0018±0,0013	0,0095±0,0089	0,0363±0,0256	n.d.	n.d.	0,0009±0,0002	0,0065±0,0031
MeJA, 500µg/ml, 48h <sup>c</sup>	0,0015±0,0022	0,0132±0,0118	0,1524±0,1218	0,2115±0,1330	n.d.	n.d.	0,0004±0,0005	0,0079±0,0014
MeJA, 1mg/ml, 2h <sup>a</sup>	0,0014±0,0003	0,0001±0,0001	0,0001±0,0001	0,0014±0,0003	0,0002±0,0003	n.d.	0,0003±0,0004	0,0010±0,0003
MeJA, 1mg/ml, 2h <sup>b</sup>	0,0000±0,0001	0,0003±0,0001	0,0003±0,0001	0,0023±0,0010	0,0001±0,0001	0,0001±0,0001	0,0002±0,0002	0,0033±0,0034
MeJA, 1mg/ml, 24h <sup>a</sup>	0,0015±0,0005	0,0003±0,0001	0,0002±0,0000	0,0023±0,0008	n.d.	0,0002±0,0001	0,0003±0,0000	0,0008±0,0003
MeJA, 1mg/ml, 24h <sup>b</sup>	n.d.	0,0002±0,0001	0,0006±0,0007	0,0050±0,0016	n.d.	n.d.	0,0000±0,0001	0,0005±0,0001
MeJA, 1mg/ml, 48h <sup>a</sup>	0,0025±0,0004	0,0014±0,0019	0,0002±0,0000	0,0026±0,0005	0,0003±0,0001	n.d.	0,0002±0,0001	0,0004±0,0001
MeJA, 1mg/ml, 48h <sup>b</sup>	0,0007±0,0000	0,0007±0,0004	0,0005±0,0003	0,0073±0,0007	0,0002±0,0001	n.d.	0,0002±0,0000	0,0024±0,0021
MeJA, 1mg/ml, 48h <sup>d</sup>	n.d.	0,0004±0,0001	0,0004±0,0005	0,0016±0,0002	0,0003±0,0001	n.d.	0,0002±0,0001	0,0004±0,0005

a) 17.08.2004

b) 30.08.2004

c) 21.09.2004

d) 24.08.2004



Retentionszeit [min]	13,51	13,83	13,98	14,32	14,77	14,87	15,17	15,41
	AA(Peak)/AA(S)	AA(Peak)/AA(S)	AA(Peak)/AA(S)	AA(Peak)/AA(S)	AA(Peak)/AA(S)	AA(Peak)/AA(S)	AA(Peak)/AA(S)	AA(Peak)/AA(S)
Kontrolle <sup>a</sup>	0,0015±0,0017	0,0003±0,0006	0,0018±0,0024	0,0002±0,0003	n.d.	0,0006±0,0010	0,0012±0,0015	0,0043±0,0050
Kontrolle <sup>b</sup>	0,0002±0,0001	0,0002±0,0001	0,0008±0,0001	0,0001±0,0000	n.d.	n.d.	0,0008±0,0002	0,0021±0,0018
Kontrolle <sup>c</sup>	0,0012±0,0011	0,0010±0,0009	0,0040±0,0042	0,0005±0,0005	n.d.	n.d.	0,0028±0,0026	0,0087±0,0086
Kontrolle, 24h <sup>d</sup>	0,0008±0,0009	0,0001±0,0001	0,0003±0,0004	n.d.	n.d.	0,0001±0,0001	0,0003±0,0001	0,0007±0,0007
MeJA, 100µg/ml, 24h <sup>a</sup>	0,0046±0,0018	0,0001±0,0001	0,0019±0,0012	0,0003±0,0001	0,0015±0,0009	0,0033±0,0009	0,0008±0,0003	0,0067±0,0030
MeJA, 100µg/ml, 24h <sup>b</sup>	n.d.	n.d.	0,0003±0,0000	n.d.	n.d.	n.d.	0,0004±0,0002	0,0007±0,0003
MeJA, 100µg/ml, 48h <sup>a</sup>	0,0012±0,0006	n.d.	0,0005±0,0001	n.d.	0,0002±0,0002	0,0017±0,0008	0,0007±0,0006	0,0026±0,0011
MeJA, 100µg/ml, 48h <sup>b</sup>	0,0001±0,0001	n.d.	0,0004±0,0001	n.d.	n.d.	n.d.	0,0009±0,0000	0,0013±0,0008
MeJA, 100µg/ml, 48h <sup>d</sup>	0,0001±0,0000	n.d.	0,0003±0,0005	n.d.	0,0000±0,0001	n.d.	0,0007±0,0003	0,0009±0,0013
MeJA, 500µg/ml, 24h <sup>c</sup>	0,0017±0,0003	0,0003±0,0004	0,0029±0,0023	n.d.	n.d.	0,0056±0,0050	0,0538±0,0490	0,0087±0,0079
MeJA, 500µg/ml, 48h <sup>c</sup>	0,0042±0,0047	n.d.	0,0021±0,0025	n.d.	n.d.	0,1129±0,0946	0,2930±0,2195	0,0123±0,0051
MeJA, 1mg/ml, 2h <sup>a</sup>	0,0007±0,0000	n.d.	0,0006±0,0001	n.d.	0,0001±0,0002	0,0009±0,0003	0,0014±0,0007	0,0016±0,0008
MeJA, 1mg/ml, 2h <sup>b</sup>	0,0000±0,0001	0,0001±0,0002	0,0006±0,0004	0,0002±0,0002	n.d.	n.d.	0,0010±0,0001	0,0025±0,0021
MeJA, 1mg/ml, 24h <sup>a</sup>	0,0008±0,0003	n.d.	0,0006±0,0001	n.d.	0,0002±0,0001	0,0009±0,0001	0,0022±0,0005	0,0017±0,0005
MeJA, 1mg/ml, 24h <sup>b</sup>	0,0001±0,0001	n.d.	0,0002±0,0000	n.d.	n.d.	0,0004±0,0004	0,0028±0,0025	0,0008±0,0003
MeJA, 1mg/ml, 48h <sup>a</sup>	0,0007±0,0004	n.d.	0,0003±0,0001	n.d.	0,0002±0,0001	0,0018±0,0006	0,0032±0,0008	0,0023±0,0005
MeJA, 1mg/ml, 48h <sup>b</sup>	0,0002±0,0000	0,0001±0,0000	0,0005±0,0002	n.d.	0,0006±0,0006	0,0073±0,0032	0,0073±0,0015	0,0031±0,0022
MeJA, 1mg/ml, 48h <sup>d</sup>	0,0003±0,0002	n.d.	0,0003±0,0003	n.d.	0,0000±0,0001	0,0002±0,0001	0,0017±0,0003	0,0011±0,0008

a) 17.08.2004

b) 30.08.2004

c) 21.09.2004

d) 24.08.2004

Retentionszeit [min]	15,61	15,72	16,05	16,28	16,61	16,82	17,04	17,16
	AA(Peak)/AA(S)	AA(Peak)/AA(S)	AA(Peak)/AA(S)	AA(Peak)/AA(S)	AA(Peak)/AA(S)	AA(Peak)/AA(S)	AA(Peak)/AA(S)	AA(Peak)/AA(S)
Kontrolle <sup>a</sup>	0,0027±0,0036	0,0014±0,0027	0,0019±0,0024	0,0027±0,0025	0,0008±0,0015	0,0007±0,0011	0,0260±0,0703	0,0010±0,0016
Kontrolle <sup>b</sup>	0,0019±0,0005	n.d.	0,0011±0,0002	0,0034±0,0013	n.d.	0,0006±0,0001	0,0026±0,0008	n.d.
Kontrolle <sup>c</sup>	0,0065±0,0063	n.d.	0,0041±0,0039	0,0047±0,0043	n.d.	0,0019±0,0018	0,0898±0,1377	n.d.
Kontrolle, 24h <sup>d</sup>	0,0006±0,0008	n.d.	0,0001±0,0001	0,0005±0,0007	n.d.	0,0001±0,0001	0,0005±0,0003	0,0008±0,0012
MeJA, 100µg/ml, 24h <sup>a</sup>	0,0035±0,0012	0,0059±0,0027	0,0030±0,0017	0,0020±0,0018	0,0016±0,0016	0,0005±0,0003	0,0096±0,0036	0,0034±0,0015
MeJA, 100µg/ml, 24h <sup>b</sup>	0,0007±0,0000	n.d.	0,0004±0,0000	0,0009±0,0004	n.d.	0,0001±0,0001	0,0010±0,0000	n.d.
MeJA, 100µg/ml, 48h <sup>a</sup>	0,0008±0,0004	0,0009±0,0005	0,0001±0,0001	0,0002±0,0001	n.d.	0,0000±0,0001	0,0045±0,0016	0,0007±0,0004
MeJA, 100µg/ml, 48h <sup>b</sup>	0,0009±0,0003	0,0000±0,0001	0,0005±0,0001	0,0014±0,0004	n.d.	0,0002±0,0000	0,0012±0,0002	n.d.
MeJA, 100µg/ml, 48h <sup>d</sup>	0,0007±0,0009	n.d.	0,0001±0,0001	0,0005±0,0008	n.d.	n.d.	0,0004±0,0003	n.d.
MeJA, 500µg/ml, 24h <sup>c</sup>	0,0057±0,0030	n.d.	0,0037±0,0015	0,0081±0,0067	n.d.	0,0010±0,0005	0,0060±0,0017	n.d.
MeJA, 500µg/ml, 48h <sup>c</sup>	0,0060±0,0010	n.d.	0,0029±0,0002	n.d.	n.d.	n	0,0057±0,0004	n.d.
MeJA, 1mg/ml, 2h <sup>a</sup>	0,0004±0,0002	0,0012±0,0009	0,0001±0,0002	0,0005±0,0002	0,0015±0,0008	n.d.	0,0042±0,0017	0,0007±0,0004
MeJA, 1mg/ml, 2h <sup>b</sup>	0,0011±0,0008	0,0001±0,0001	0,0003±0,0001	0,0016±0,0018	n.d.	0,0002±0,0002	0,0016±0,0017	n.d.
MeJA, 1mg/ml, 24h <sup>a</sup>	0,0004±0,0001	0,0010±0,0001	n.d.	0,0004±0,0002	0,0006±0,0004	n.d.	0,0030±0,0006	0,0005±0,0001
MeJA, 1mg/ml, 24h <sup>b</sup>	0,0005±0,0001	n.d.	0,0003±0,0001	0,0005±0,0002	n.d.	n.d.	0,0004±0,0001	n.d.
MeJA, 1mg/ml, 48h <sup>a</sup>	0,0006±0,0002	0,0005±0,0002	n.d.	0,0002±0,0000	0,0003±0,0001	n.d.	0,0038±0,0014	0,0001±0,0001
MeJA, 1mg/ml, 48h <sup>b</sup>	0,0012±0,0004	n.d.	0,0002±0,0003	0,0014±0,0006	n.d.	0,0002±0,0001	0,0013±0,0007	0,0004±0,0006
MeJA, 1mg/ml, 48h <sup>d</sup>	0,0007±0,0009	n.d.	0,0001±0,0001	0,0008±0,0010	0,0001±0,0001	0,0001±0,0001	0,0009±0,0006	0,0004±0,0002

a) 17.08.2004

b) 30.08.2004

c) 21.09.2004

d) 24.08.2004

Retentionszeit [min]	17,37	17,59	17,80	18,18	18,40	18,88	19,06	19,28
	AA(Peak)/AA(S)	AA(Peak)/AA(S)	AA(Peak)/AA(S)	AA(Peak)/AA(S)	AA(Peak)/AA(S)	AA(Peak)/AA(S)	AA(Peak)/AA(S)	AA(Peak)/AA(S)
Kontrolle <sup>a</sup>	0,0003±0,0005	0,0204±0,0495	0,0117±0,0172	0,0145±0,0189	0,0012±0,0018	0,0005±0,0007	0,0009±0,0012	0,0001±0,0004
Kontrolle <sup>b</sup>	0,0008±0,0006	0,0149±0,0129	0,0088±0,0118	n.d.	0,0001±0,0001	n.d.	0,0003±0,0001	n.d.
Kontrolle <sup>c</sup>	n.d.	0,0608±0,0993	0,0306±0,0269	0,0090±0,0087	0,0005±0,0006	0,0012±0,0011	0,0010±0,0009	n.d.
Kontrolle, 24h <sup>d</sup>	0,0002±0,0003	0,0003±0,0005	0,0016±0,0023	0,0003±0,0003	0,0000±0,0001	n.d.	n.d.	0,0004±0,0008
MeJA, 100µg/ml, 24h <sup>a</sup>	n.d.	0,0042±0,0030	0,0050±0,0032	0,0330±0,0157	0,0036±0,0023	n.d.	n.d.	n.d.
MeJA, 100µg/ml, 24h <sup>b</sup>	n.d.	0,0020±0,0018	n.d.	0,0012±0,0007	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MeJA, 100µg/ml, 48h <sup>a</sup>	n.d.	0,0005±0,0003	0,0009±0,0005	0,0084±0,0019	0,0008±0,0007	n.d.	0,0003±0,0001	n.d.
MeJA, 100µg/ml, 48h <sup>b</sup>	n.d.	0,0049±0,0031	0,0009±0,0003	0,0011±0,0004	0,0001±0,0001	n.d.	0,0001±0,0001	n.d.
MeJA, 100µg/ml, 48h <sup>d</sup>	n.d.	0,0002±0,0002	0,0001±0,0001	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MeJA, 500µg/ml, 24h <sup>c</sup>	0,0016±0,0005	0,0246±0,0142	0,0028±0,0018	0,0027±0,0009	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MeJA, 500µg/ml, 48h <sup>c</sup>	0,0004±0,0006	0,0653±0,0440	0,0426±0,0149	0,0028±0,0012	0,0013±0,0001	n.d.	n.d.	n.d.
MeJA, 1mg/ml, 2h <sup>a</sup>	n.d.	0,0008±0,0004	0,0007±0,0005	0,0020±0,0010	0,0028±0,0027	n.d.	n.d.	n.d.
MeJA, 1mg/ml, 2h <sup>b</sup>	0,0009±0,0010	0,0025±0,0016	0,0027±0,0037	0,0028±0,0043	0,0001±0,0001	0,0002±0,0003	n.d.	n.d.
MeJA, 1mg/ml, 24h <sup>a</sup>	0,0003±0,0001	0,0002±0,0001	0,0004±0,0000	0,0024±0,0008	0,0005±0,0002	n.d.	n.d.	n.d.
MeJA, 1mg/ml, 24h <sup>b</sup>	0,0000±0,0001	0,0008±0,0008	0,0003±0,0003	0,0001±0,0001	0,0001±0,0001	n.d.	n.d.	n.d.
MeJA, 1mg/ml, 48h <sup>a</sup>	n.d.	0,0007±0,0002	0,0006±0,0002	0,0027±0,0005	0,0003±0,0000	n.d.	0,0002±0,0000	n.d.
MeJA, 1mg/ml, 48h <sup>b</sup>	0,0005±0,0004	0,0027±0,0017	0,0011±0,0012	0,0006±0,0008	0,0002±0,0001	n.d.	n.d.	n.d.
MeJA, 1mg/ml, 48h <sup>d</sup>	0,0001±0,0002	0,0003±0,0002	0,0006±0,0004	0,0001±0,0001	0,0003±0,0003	n.d.	0,0000±0,0001	n.d.

a) 17.08.2004

b) 30.08.2004

c) 21.09.2004

d) 24.08.2004

Retentionszeit [min]	19,39	19,52	19,74	19,90
	AA(Peak)/AA(S)	AA(Peak)/AA(S)	AA(Peak)/AA(S)	AA(Peak)/AA(S)
Kontrolle <sup>a</sup>	n.d.	0,0016±0,0018	n.d.	0,0036±0,0060
Kontrolle <sup>b</sup>	0,0003±0,0001	0,0007±0,0003	n.d.	0,0014±0,0003
Kontrolle <sup>c</sup>	n.d.	0,0024±0,0022	n.d.	0,0017±0,0017
Kontrolle, 24h <sup>d</sup>	n.d.	0,0000±0,0001	n.d.	0,0003±0,0003
MeJA, 100µg/ml, 24h <sup>a</sup>	n.d.	0,0027±0,0014	0,0015±0,0018	0,0105±0,0070
MeJA, 100µg/ml, 24h <sup>b</sup>	n.d.	0,0001±0,0002	n.d.	0,0003±0,0001
MeJA, 100µg/ml, 48h <sup>a</sup>	0,0005±0,0003	0,0008±0,0003	n.d.	0,0017±0,0009
MeJA, 100µg/ml, 48h <sup>b</sup>	0,0001±0,0001	0,0002±0,0001	n.d.	0,0004±0,0001
MeJA, 100µg/ml, 48h <sup>d</sup>	0,0001±0,0001	n.d.	n.d.	n.d.
MeJA, 500µg/ml, 24h <sup>c</sup>	n.d.	0,0014±0,0001	n.d.	0,0014±0,0020
MeJA, 500µg/ml, 48h <sup>c</sup>	n.d.	0,0018±0,0000	n.d.	n.d.
MeJA, 1mg/ml, 2h <sup>a</sup>	n.d.	0,0006±0,0000	n.d.	0,0013±0,0010
MeJA, 1mg/ml, 2h <sup>b</sup>	n.d.	0,0002±0,0002	0,0060±0,0105	0,0191±0,0232
MeJA, 1mg/ml, 24h <sup>a</sup>	n.d.	0,0004±0,0000	n.d.	0,0013±0,0001
MeJA, 1mg/ml, 24h <sup>b</sup>	n.d.	0,0001±0,0001	n.d.	0,0003±0,0000
MeJA, 1mg/ml, 48h <sup>a</sup>	0,0001±0,0002	0,0005±0,0001	n.d.	0,0007±0,0001
MeJA, 1mg/ml, 48h <sup>b</sup>	n.d.	0,0001±0,0001	n.d.	0,0089±0,0126
MeJA, 1mg/ml, 48h <sup>d</sup>	0,0001±0,0001	n.d.	n.d.	n.d.

a) 17.08.2004

b) 30.08.2004

c) 21.09.2004

d) 24.08.2004

Flächenvergleiche der einzelnen Peaks zum internen Standard der GC/MS-Analysen von induzierten derivatisierten *D. dichotoma* Proben (0,5 und 1 mg/ml LEA/Seewasser, 2, 24 und 48 h) mit Kontrollproben (alle Peaks größer 5 % wurden berücksichtigt):

Retentionszeit [min]	6,65	6,79	6,85	7,85	10,03	10,99	11,34	11,56
	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)
Kontrolle <sup>c</sup>	0,0105±0,0091	0,0031±0,0028	0,0026±0,0023	0,0014±0,0012	0,0281±0,0448	0,0308±0,0474	0,0010±0,0009	0,0003±0,0003
LEA, 500µg/ml, 2h <sup>c</sup>	0,0647±0,0535	0,0345±0,0174	0,0036±0,0031	0,0049±0,0038	0,0037±0,0034	0,0068±0,0064	0,0029±0,0026	n.d.
LEA, 500µg/ml, 24h <sup>c</sup>	0,0481±0,0076	0,0458±0,0131	0,0053±0,0004	0,0024±0,0001	0,0069±0,0094	0,0027±0,0005	0,0039±0,0005	n.d.
LEA, 500µg/ml, 48h <sup>c</sup>	0,1394±0,0217	0,0793±0,0034	0,0170±0,0137	0,0027±0,0038	0,0021±0,0003	0,0032±0,0019	0,0013±0,0003	n.d.
LEA, 1mg/ml, 2h <sup>c</sup>	0,0233±0,0098	0,0101±0,0089	0,0107±0,0071	0,0059±0,0020	0,0053±0,0024	0,0074±0,0008	0,0033±0,0008	n.d.
LEA, 1mg/ml, 24h <sup>c</sup>	0,0764±0,0285	0,0547±0,0122	0,0089±0,0019	0,0010±0,0014	0,0017±0,0000	0,0053±0,0028	0,0027±0,0018	n.d.
LEA, 1mg/ml, 48h <sup>c</sup>	0,0895±0,0715	0,0571±0,0178	0,0133±0,0073	0,0065±0,0047	0,0017±0,0004	0,0054±0,0053	0,0010±0,0013	n.d.

c) 21.09.2004

Retentionszeit [min]	11,66	11,97	12,15	12,35	12,77	12,86	13,14	13,30
	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)
Kontrolle <sup>c</sup>	0,0003±0,0003	0,0010±0,0009	0,0010±0,0009	0,0013±0,0012	n.d.	n.d.	0,0012±0,0011	0,0119±0,0112
LEA, 500µg/ml, 2h <sup>c</sup>	0,0010±0,0017	0,0005±0,0005	0,0011±0,0011	0,0028±0,0012	n.d.	0,0009±0,0010	0,0011±0,0011	0,0159±0,0071
LEA, 500µg/ml, 24h <sup>c</sup>	0,0007±0,0002	0,0049±0,0011	0,0038±0,0011	0,0058±0,0036	n.d.	0,0010±0,0018	0,0029±0,0001	0,0131±0,0096
LEA, 500µg/ml, 48h <sup>c</sup>	n.d.	0,0147±0,0132	0,1070±0,0700	0,1560±0,1503	n.d.	n.d.	n.d.	0,0188±0,0043
LEA, 1mg/ml, 2h <sup>c</sup>	0,0015±0,0015	0,0034±0,0022	0,0024±0,0021	0,0091±0,0089	0,0004±0,0007	0,0020±0,0017	0,0019±0,0017	0,0175±0,0092
LEA, 1mg/ml, 24h <sup>c</sup>	n.d.	0,0362±0,0048	0,1540±0,0532	0,1461±0,0425	n.d.	n.d.	0,0062±0,0031	0,0206±0,0046
LEA, 1mg/ml, 48h <sup>c</sup>	n.d.	0,0302±0,0177	0,1899±0,0515	0,4082±0,0606	n.d.	n.d.	0,0021±0,0019	0,0436±0,0489

c) 21.09.2004

Retentionszeit [min]	13,51	13,83	13,98	14,32	14,77	14,87	15,17	15,41
	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)
Kontrolle <sup>c</sup>	0,0012±0,0011	0,0010±0,0009	0,0040±0,0042	0,0005±0,0005	n.d.	n.d.	0,0028±0,0026	0,0087±0,0086
LEA, 500µg/ml, 2h <sup>c</sup>	0,0031±0,0023	0,0008±0,0008	0,0041±0,0024	0,0002±0,0004	n.d.	n.d.	n.d.	0,0199±0,0146
LEA, 500µg/ml, 24h <sup>c</sup>	0,0025±0,0010	0,0015±0,0001	0,0043±0,0009	0,0003±0,0005	n.d.	n.d.	n.d.	0,0172±0,0043
LEA, 500µg/ml, 48h <sup>c</sup>	0,0179±0,0215	n.d.	0,0046±0,0017	n.d.	0,0023±0,0032	0,0692±0,0724	n.d.	0,0186±0,0003
LEA, 1mg/ml, 2h <sup>c</sup>	0,0053±0,0013	0,0018±0,0020	0,0052±0,0021	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,0182±0,0144
LEA, 1mg/ml, 24h <sup>c</sup>	0,0300±0,0021	n.d.	0,0035±0,0050	n.d.	0,0043±0,0060	0,1529±0,0060	n.d.	0,0210±0,0041
LEA, 1mg/ml, 48h <sup>c</sup>	0,0297±0,0182	0,0037±0,0051	0,0083±0,0050	0,0006±0,0011	n.d.	0,1665±0,0477	n.d.	0,0545±0,0579

c) 21.09.2004

Retentionszeit [min]	15,61	15,72	16,05	16,28	16,61	16,82	17,04	17,16
	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)
Kontrolle <sup>c</sup>	0,0065±0,0063	n.d.	0,0041±0,0039	0,0047±0,0043	n.d.	0,0019±0,0018	0,0898±0,1377	n.d.
LEA, 500µg/ml, 2h <sup>c</sup>	0,0060±0,0104	n.d.	0,0074±0,0037	n.d.	n.d.	0,0014±0,0024	0,0127±0,0084	0,0011±0,0019
LEA, 500µg/ml, 24h <sup>c</sup>	0,0106±0,0009	n.d.	0,0062±0,0006	n.d.	n.d.	0,0023±0,0003	0,0137±0,0016	n.d.
LEA, 500µg/ml, 48h <sup>c</sup>	0,0118±0,0016	n.d.	0,0052±0,0015	n.d.	n.d.	0,0014±0,0020	0,0133±0,0036	n.d.
LEA, 1mg/ml, 2h <sup>c</sup>	0,0117±0,0052	n.d.	0,0136±0,0072	0,0175±0,0082	n.d.	0,0021±0,0020	0,0138±0,0058	n.d.
LEA, 1mg/ml, 24h <sup>c</sup>	0,0140±0,0037	n.d.	0,0107±0,0043	n.d.	n.d.	n.d.	0,0156±0,0016	n.d.
LEA, 1mg/ml, 48h <sup>c</sup>	0,0234±0,0170	n.d.	0,0060±0,0023	0,0140±0,0243	0,0037±0,0063	0,0061±0,0105	0,0093±0,0048	0,0161±0,0278

c) 21.09.2004

Retentionszeit [min]	17,37	17,59	17,80	18,18	18,40	18,88	19,06	19,28
	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)
Kontrolle <sup>c</sup>	n.d.	0,0608±0,0993	0,0306±0,0269	0,0090±0,0087	0,0005±0,0006	0,0012±0,0011	0,0010±0,0009	n.d.
LEA, 500µg/ml, 2h <sup>c</sup>	0,0008±0,0014	0,0241±0,0323	0,0385±0,0471	0,0201±0,0112	0,0006±0,0011	n.d.	0,0011±0,0009	n.d.
LEA, 500µg/ml, 24h <sup>c</sup>	0,0058±0,0015	0,0532±0,0059	0,0087±0,0022	0,0178±0,0015	0,0014±0,0008	0,0007±0,0012	0,0028±0,0013	n.d.
LEA, 500µg/ml, 48h <sup>c</sup>	0,0059±0,0057	0,0614±0,0153	0,0491±0,0592	0,0124±0,0129	0,0036±0,0024	n.d.	0,0008±0,0012	n.d.
LEA, 1mg/ml, 2h <sup>c</sup>	0,0073±0,0070	0,0481±0,0245	0,0080±0,0031	0,0139±0,0096	0,0023±0,0020	0,0018±0,0031	0,0017±0,0015	n.d.
LEA, 1mg/ml, 24h <sup>c</sup>	n.d.	0,0629±0,0223	0,1214±0,0206	0,0060±0,0039	0,0012±0,0017	0,0062±0,0088	0,0060±0,0042	0,0010±0,0014
LEA, 1mg/ml, 48h <sup>c</sup>	0,0108±0,0161	0,1167±0,1060	0,1293±0,0951	0,0078±0,0047	0,0046±0,0049	0,0151±0,0207	0,0239±0,0343	0,0181±0,0272

c) 21.09.2004

Retentionszeit [min]	19,39	19,52	19,74	19,90
	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)	AA(Peak)/AA(IS)
Kontrolle <sup>c</sup>	n.d.	0,0024±0,0022	n.d.	0,0017±0,0017
LEA, 500µg/ml, 2h <sup>c</sup>	n.d.	0,0030±0,0027	0,0006±0,0006	0,0129±0,0178
LEA, 500µg/ml, 24h <sup>c</sup>	n.d.	0,0028±0,0002	n.d.	0,0204±0,0035
LEA, 500µg/ml, 48h <sup>c</sup>	n.d.	0,0036±0,0008	n.d.	0,0034±0,0019
LEA, 1mg/ml, 2h <sup>c</sup>	0,0006±0,0010	0,0031±0,0032	0,0017±0,0029	0,0048±0,0013
LEA, 1mg/ml, 24h <sup>c</sup>	n.d.	0,0042±0,0060	0,0016±0,0023	0,0041±0,0058
LEA, 1mg/ml, 48h <sup>c</sup>	0,0060±0,0104	0,0144±0,0185	0,0073±0,0126	0,2548±0,4413

c) 21.09.2004



Behandlung der *D. dichotoma* Proben mit Linolensäure:

Fettsäuren	C12:0 [µg g <sup>-1</sup> ]	C14:0 [µg g <sup>-1</sup> ]	C16:0 [µg g <sup>-1</sup> ]	C16:1 [µg g <sup>-1</sup> ]	C18:0 [µg g <sup>-1</sup> ]	C18:4 [µg g <sup>-1</sup> ]	C20:0 [µg g <sup>-1</sup> ]	C20:4/5 [µg g <sup>-1</sup> ]	C22:0 [µg g <sup>-1</sup> ]
Kontrolle <sup>c</sup>	n.d.	n.d.	0.20±0.07	n.d.	1.14±0.65	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kontrolle, 2h <sup>a</sup>	36.02±26.00	38.11±17.50	74.21±31.98	n.d.	106.47±55.20	n.d.	294.71±143.21	n.d.	n.d.
Kontrolle, 12h <sup>d</sup>	3.51±4.16	1.57±1.63	5.05±4.07	0.38±0.21	9.26±9.30	7.55±6.39	1.22±1.08	n.d.	9.68±9.88
Kontrolle, 24h <sup>a</sup>	n.d.	0.58±0.25	1.42±0.27	0.06±0.09	1.19±0.05	0.46±0.16	0.26±0.2	0.05±0.09	1.20±0.38
LEA, 500µg/ml, 2h <sup>c</sup>	n.d.	n.d.	0.44±0.34	0.65±1.12	1.08±1.05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
LEA, 500µg/ml, 2h <sup>a</sup>	52.29±24.66	55.27±22.15	99.05±39.26	n.d.	151.23±48.96	n.d.	519.25±294.06	n.d.	n.d.
LEA, 500µg/ml, 10h <sup>c</sup>	n.d.	n.d.	0.29±0.25	n.d.	1.28±1.22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
LEA, 500µg/ml, 12h <sup>a</sup>	n.d.	3.29±0.77	7.24±1.23	1.35±0.58	4.72±0.52	33.53±5.93	5.78±2.37	11.89±11.97	1.99±1.72
LEA, 500µg/ml, 15h <sup>c</sup>	n.d.	0.04±0.05	0.65±0.17	2.33±0.41	1.84±0.41	n.d.	n.d.	0.20±0.29	n.d.
LEA, 500µg/ml, 24h <sup>c</sup>	n.d.	0.06±0.11	0.63±0.36	1.50±2.60	1.23±0.10	n.d.	n.d.	0.11±0.19	n.d.
LEA, 500µg/ml, 24h <sup>d</sup>	n.d.	4.35±1.90	11.64±4.89	0.48±0.41	14.64±8.69	12.66±8.10	0.71±0.63	0.30±0.51	16.22±4.28
LEA, 500µg/ml, 48h <sup>c</sup>	n.d.	1.11±0.59	16.49±15.88	95.00±62.10	1.38±0.19	7.85±8.22	n.d.	3.77±3.58	n.d.
LEA, 1000µg/ml, 2h <sup>c</sup>	n.d.	0.14±0.25	1.03±0.88	n.d.	1.36±0.61	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
LEA, 1000µg/ml, 10h <sup>c</sup>	n.d.	0.14±0.13	0.95±0.55	2.90±3.12	1.44±0.27	n.d.	n.d.	0.66±0.58	n.d.
LEA, 1000µg/ml, 15h <sup>c</sup>	n.d.	n.d.	0.67±0.70	0.63±1.08	0.78±0.71	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
LEA, 1000µg/ml, 24h <sup>c</sup>	n.d.	0.82±0.21	15.44±4.49	136.70±47.20	2.02±0.13	17.11±0.33	n.d.	7.83±2.77	n.d.
LEA, 1000µg/ml, 48h <sup>c</sup>	n.d.	1.60±0.95	32.48±22.75	168.51±45.69	2.72±1.98	18.90±5.41	n.d.	14.52±13.19	n.d.

- a) 17.08.2004  
b) 30.08.20004  
c) 21.09.2004  
d) Roscoff 2006

Flächenvergleiche der einzelnen Peaks zum internen Standard der GC/MS-Analysen von den induzierten derivatisierten Makroalgen *E. fasciculatus*, *C. peregrina*, *F. vesiculosus*, *H. elongata*, *L. saccharina* und *S. muticum* mit den jeweiligen Kontrollproben bezüglich der freien Fettsäuren (500 µg JA und MeJA/ml künstliches Seewasser, 12 und 24 Stunden und die lipophile, hormoninaktive LEA (500 µg/ml künstliches Seewasser, 12 und 24 Stunden):

Fettsäuren	C12:0 [µg g <sup>-1</sup> ]	C18:2 [µg g <sup>-1</sup> ]	C18:5 [µg g <sup>-1</sup> ]	C22:0 [µg g <sup>-1</sup> ]
<b><i>Ectocarpus fasciculatus</i></b>				
Kontrolle, 12h <sup>d</sup>	4.08±7.07	5.08±4.82	63.34±143.3	56.22±26.67
Kontrolle, 24h <sup>d</sup>	3.80±6.58	6.36±5.13	80.87±17.76	24.79±36.98
JA, 500µg/ml, 12h <sup>d</sup>	n.d.	21.36±9.71	36.05±60.1	15.21±18.74
JA, 500µg/ml, 24h <sup>d</sup>	28.36±29.83	22.91±7.93	89.64±29.29	49.48±111.48
MeJA, 500µg/ml, 12h <sup>d</sup>	1.10±1.03	8.80±3.96	61.73±29.03	15.61±7.38
MeJA, 500µg/ml, 24h <sup>d</sup>	2.75±2.01	14.18±2.07	99.33±18.76	25.16±4.11
LEA, 500µg/ml, 12h <sup>d</sup>	16.03±5.59	n.d.	03.53±52.7	73.25±36.29
LEA, 500µg/ml, 24h <sup>d</sup>	15.04±2.05	n.d.	02.76±48.8	74.65±29.66

Fettsäuren	C14:0 [µg g <sup>-1</sup> ]	C18:0 [µg g <sup>-1</sup> ]	C18:1 [µg g <sup>-1</sup> ]	C18:2 [µg g <sup>-1</sup> ]	C20:0 [µg g <sup>-1</sup> ]
<b><i>Colpomenia peregrina</i></b>					
Kontrolle, 12h <sup>d</sup>	7.18±3.67	13.56±12.31	5.53±7.58	17.01±19.56	7.22±7.28
Kontrolle, 24h <sup>d</sup>	2.96±0.71	1.44±0.21	0.89±0.12	2.59±1.25	1.37±0.39
JA, 500µg/ml, 12h <sup>d</sup>	10.06±4.35	10.60±6.56	6.69±4.98	12.12±11.62	8.46±9.03
JA, 500µg/ml, 24h <sup>d</sup>	6.99±4.06	7.93±6.05	2.18±0.52	2.96±1.36	1.83±0.55
MeJA, 500µg/ml, 12h <sup>d</sup>	n.d.	3.68±2.65	1.82±0.27	4.31±1.54	1.89±0.56
MeJA, 500µg/ml, 24h <sup>d</sup>	16.07±11.69	16.50±22.95	4.24±4.20	8.86±5.14	1.21±1.55
LEA, 500µg/ml, 12h <sup>d</sup>	5.04±0.96	3.74±0.38	n.d.	n.d.	2.00±1.92
LEA, 500µg/ml, 24h <sup>d</sup>	28.80±43.41	75.44±127.91	n.d.	n.d.	21.42±34.51

Fettsäuren	C16:0 [µg g <sup>-1</sup> ]	C18:0 [µg g <sup>-1</sup> ]
<b><i>Sargassum muticum</i></b>		
Kontrolle, 12h <sup>d</sup>	1.81±0.40	2.75±0.63
Kontrolle, 24h <sup>d</sup>	0.57±0.31	0.45±0.29
JA, 500µg/ml, 12h <sup>d</sup>	13.77±15.78	5.99±9.73
JA, 500µg/ml, 24h <sup>d</sup>	7.07±9.02	4.17±6.24
MeJA, 500µg/ml, 12h <sup>d</sup>	10.82±8.52	37.48±47.93
MeJA, 500µg/ml, 24h <sup>d</sup>	0.89±0.47	0.65±0.89
LEA, 500µg/ml, 12h <sup>d</sup>	5.03±4.30	4.06±4.46
LEA, 500µg/ml, 24h <sup>d</sup>	9.44±7.50	10.79±12.83

Fettsäuren	C14:0 [µg g <sup>-1</sup> ]	C16:0 [µg g <sup>-1</sup> ]	C18:0 [µg g <sup>-1</sup> ]
<b><i>Himanthalia elongata</i></b>			
Kontrolle, 12h <sup>d</sup>	2.38±0.39	7.15±4.34	5.33±2.51
Kontrolle, 24h <sup>d</sup>	0.12±0.21	4.03±4.32	1.84±0.43
JA, 500µg/ml, 12h <sup>d</sup>	5.41±1.52	15.36±159.7	15.07±18.20
JA, 500µg/ml, 24h <sup>d</sup>	3.27±4.51	9.43±12.97	6.50±8.87
MeJA, 500µg/ml, 12h <sup>d</sup>	35.45±52.11	5.91±8.98	55.55±38.47
MeJA, 500µg/ml, 24h <sup>d</sup>	2.78±1.03	5.65±2.53	7.72±5.65
LEA, 500µg/ml, 12h <sup>d</sup>	0.35±0.61	3.83±2.37	3.55±0.89
LEA, 500µg/ml, 24h <sup>d</sup>	12.49±7.72	39.04±18.96	40.06±41.67

Fettsäuren	C14:0 [µg g <sup>-1</sup> ]	C18:1 [µg g <sup>-1</sup> ]	C18:2 [µg g <sup>-1</sup> ]	C18:5 [µg g <sup>-1</sup> ]	C22:0 [µg g <sup>-1</sup> ]
<b><i>Fucus vesiculosus</i></b>					
Kontrolle, 12h <sup>d</sup>	2.93±3.40	0.45±0.78	1.87±2.31	n.d.	16.58±24.98
Kontrolle, 24h <sup>d</sup>	1.16±0.37	0.58±0.11	2.54±1.57	0.19±0.32	2.23±1.33
JA, 500µg/ml, 12h <sup>d</sup>	7.31±4.44	2.83±2.18	1.18±0.89	5.39±3.54	21.32±21.25
JA, 500µg/ml, 24h <sup>d</sup>	8.67±7.11	3.35±1.79	0.76±0.76	6.19±4.14	43.38±41.96
MeJA, 500µg/ml, 12h <sup>d</sup>	31.11±23.55	0.77±0.20	0.68±0.69	1.22±0.22	8.90±12.10
MeJA, 500µg/ml, 24h <sup>d</sup>	19.59±19.77	4.25±6.19	1.53±2.65	1.42±1.24	70.06±116.03
LEA, 500µg/ml, 12h <sup>d</sup>	3.44±2.04	n.d.	n.d.	n.d.	22.90±13.05
LEA, 500µg/ml, 24h <sup>d</sup>	5.05±2.97	n.d.	n.d.	n.d.	29.89±26.17

Fettsäuren	C16:0 [µg g <sup>-1</sup> ]	C18:0 [µg g <sup>-1</sup> ]	C18:5 [µg g <sup>-1</sup> ]	C22:0 [µg g <sup>-1</sup> ]
<b><i>Laminaria saccharina</i></b>				
Kontrolle, 12h <sup>d</sup>	1.46±0.88	1.25±1.60	3.41±1.45	2.15±2.83
Kontrolle, 24h <sup>d</sup>	0.85±0.62	0.29±0.20	4.15±2.37	0.47±0.27
JA, 500µg/ml, 12h <sup>d</sup>	3.92±2.70	2.07±1.97	2.62±1.16	4.19±3.30
JA, 500µg/ml, 24h <sup>d</sup>	4.89±1.80	3.87±0.62	6.13±4.09	25.60±4.43
MeJA, 500µg/ml, 12h <sup>d</sup>	4.87±0.38	4.23±1.99	4.11±0.19	9.78±10.84
MeJA, 500µg/ml, 24h <sup>d</sup>	2.71±3.04	0.56±0.24	6.25±1.87	0.92±0.93
LEA, 500µg/ml, 12h <sup>d</sup>	3.40±1.17	1.41±0.69	3.38±0.56	4.28±2.52
LEA, 500µg/ml, 24h <sup>d</sup>	9.61±6.47	14.60±11.73	31.96±18.88	38.31±57.09

## Danksagung

Eine Dissertation wird bekanntlich nicht im Alleingang durchgeführt, und so möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich unterstützt haben:

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Georg Pohnert, der mir die vorliegende Arbeit ermöglicht hat. Sowohl sein kritischer wissenschaftlicher Blick als auch die Gewährung großer Freiheiten waren außerordentlich hilfreich und haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso möchte ich meinem Betreuer von der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Prof. Dr. Dieter Klemm, für die rasche, unkomplizierte und hilfreiche Unterstützung danken.

Ich bedanke mich bei Prof. Wilhelm Boland für die Möglichkeit den ersten großen Teil der Arbeit innerhalb seines Arbeitskreises anfertigen zu dürfen sowie für die Bereitstellung der Geräte, Materialien und die finanzielle Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Mark Hay, in dessen Arbeitskreis am Georgia Institute of Technology in Atlanta ich für 3 Wochen als Gastwissenschaftler aufgenommen wurde, für die vielfältige Unterstützung sowie für die wertvollen Anregungen, ohne die die Bioassays und deren statistische Auswertung nicht möglich gewesen wären. Insbesondere danke ich Niels Lindquist und Johanna Kertesz für die Hilfe bei der Beschaffung der Flohkrebse.

Ich bedanke mich bei Dr. Akira Peters, Dr. Florian Weinberger und Dr. Serge Poulet für die Versorgung mit Algenmaterial, die Bereitstellung von Laborplatz in Roscoff und die nette Betreuung vor Ort. Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe für ihre herzliche Aufnahme und für die Unterstützung, die ich von ihr während meines Aufenthaltes erfahren habe.

Ich bedanke mich bei Dr. Bernd Schneider und Dr. Renate Ellinger für die Messung der NMR-Spektren.

Mein besonderer Dank gilt Karsten Jahn, der mir bei fast allen Feldversuchen und Bioassays als „Flohkrebs-Dompteur“ tatkräftig zur Seite stand und für eine abendliche Entspannung sorgte.



Aber ich danke auch Sven Adolph, der mich während der gesamten Doktorandenzeit begleitete und in vielen Diskussionen durch konstruktive Anregungen zum Fortgang dieser Arbeit beigetragen hat.

Der gesamten Arbeitsgruppe Boland danke ich für die freundliche Unterstützung, die dazu beigetragen hat, dass ich mich im Institut immer wohlfühlt habe.

Mein besonderer Dank gilt hierbei:

Janine Rattke und Kerstin Ploss für die Hilfe bei notwendigen Reparaturen der Trace, aber auch insbesondere für die Hilfe bei den GC/MS-Analysen.

Dr. Thomas Wichard und Dr. Ulrich Lion für interessante Unterhaltungen im Büro, das Abwenden kleinerer Katastrophen und Korrekturlesen.

Dr. Birgit Schulze für die Hilfe bei der verzweifelten Suche nach Jasmonsäure aber auch für die Gartenpartys mit Swimmingpool.

Dr. Christian Kost für die kleine Einführung in die Statistik.

Dr. Rita Büchler für die Hilfe bei den SDS-PAGE.

Bei Grit Winnefeld für die Hilfe bei der Überwindung jeglicher bürokratischer Hindernisse.

Bei Anja David für die unkomplizierte schnelle Hilfe in allen Fragen. Bei Vera Roman für das Herstellen des Seewassers. Bei Angelika Berg für die Bereitstellung sauberer Laborutensilien.

Bei Dr. Stefan Bartram, Dr. Axel Mithöfer, Margit Leitner und Heiko Maischak für inspirierende Gespräche auf der Dachterrasse.

Vielen Dank auch an Jens Ille, der mir bei sämtlichen organisatorischen Fragen helfen konnte und den In- und Export von Algen und Chemikalien organisiert hat.

Ich bedanke mich auch bei meiner „neuen Arbeitsgruppe“ in der Schweiz: Jerrit Weissflog, Alexandra Barofsky, Matthew Welling und Charles Vidoudez. Und insbesondere bedanke ich mich auch bei Christina Zamanos Epremian. Ich bedanke mich bei Zacharias Grote für die Einführung in das Lausanner Stadtleben und das Korrekturlesen.

Last but not least:

Gilt mein besonderer Dank Anna für das Korrekturlesen und vor allem die seelische und moralische Unterstützung. Meiner Mutter danke ich, dass sie mir bei allen Höhen und Tiefen während der Arbeit zur Seite stand.

Ich danke auch Birgit (für die schöne Zeit in Roscoff) und Ulli (für die Hilfe in computertechnischen und sonstigen Fragen).

## Curriculum vitae

Name: Theresa Wiesemeier  
geboren am: 08.01.1977 in Berlin

### Schulbildung:

09.1991 – 08.1996 Hochschulreife: St. Theresien, Berlin  
09.1996 – 08.1997 Freiwilliges Ökologisches Jahr

### Studium:

10.1997 – 03.2000 Grundstudium an der Universität Berlin  
Studiengang „Chemie“  
04.2000 – 04.2003 Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Abschluss: „Diplomchemikerin (Umweltchemie)“

### Promotion:

Thema: Verwundungsaktivierte Verteidigung von marinen Makroalgen

06.2003 – 07.2005 Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena  
seit 01.08.2005 Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Schweiz

### Tätigkeiten:

08.2001 – 09.2001 Praktikum bei Anteam GmbH, Berlin  
Analytik in Technik und Umwelt  
07.2001 – 08.2001 Studentische Hilfskraft am Max-Planck-Institut  
11.2001 – 03.2002 für chemische Ökologie, Jena

## Veröffentlichungen

### Publikationen

Lion, U., Wiesemeier, T., Weinberger, F., Beltran, J., Flores, V., Faugeron, S., Correa, J. & Pohnert, G. (2006) Phospholipases and galactolipases trigger oxylipin-mediated wound-activated defence in the red alga *Gracilaria chilensis* against epiphytes. *Chembiochem* 7, 457-462.

Wiesemeier, T., Pohnert, G. (2006) Direct quantification of dimethylsulfoniopropionate (DMSP) in marine micro and macro algae using HPLC or UPLC/MS. *Journal of Chromatography B*, im Druck

### Vorträge

Wiesemeier, T., Pohnert, G., „Wahrnehmung flüchtiger Stoffe durch marine Herbivoren und ihre Rolle in der chemischen Verteidigung von Makroalgen“, Fränkisch-Mitteldeutsches Naturstofftreffen, Halle, 4. Mai 2005

Wiesemeier, T., Hay, M., Pohnert, G., „The role of volatile in the chemical defence of the brown alga *Dictyota dichotoma*: Blend recognition by marine herbivores“, 4th International Symposium on Biological and Environmental Chemistry of DMS(P) and Related Compounds, Norwich, U.K., 2. – 6. Mai 2006

### Poster

Wiesemeier, T., Pohnert, G., „Activated chemical defence in marine macroalgae: The brown alga *Dictyota dichotoma*“, Institutssymposium 2004 des Max – Planck – Institutes für chemische Ökologie, Jena, 30. – 31. Januar 2004

Wiesemeier, T., Pohnert, G., „Blend recognition of marine herbivores: The role of volatiles in the chemical defense of algae (*Dictyota dichotoma*)“, IV. Symposium Hochschule trifft Industrie, Wermelskirchen, 10. – 12. November 2005

# Erklärung

Lausanne, den 10.01.2007

Ich erkläre,

dass mir die geltende Promotionsordnung der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der Friedrich- Schiller-Universität bekannt ist;

dass ich die vorliegende Dissertation selbst angefertigt und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben habe;

dass mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts die in der Danksagung meiner Dissertation genannten Personen unterstützt haben;

dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen;

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe;

dass ich nicht die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

.....  
Theresa Wiesemeier