

Aus dem Institut für Landschafts- und Pflanzenökologie
Universität Hohenheim

Fachgebiet: Pflanzenökologie und Ökotoxikologie Betreuer: Prof. Dr. Andreas Fangmeier

**Reaktionen einer Weizen-Wildkraut Gemeinschaft
auf erhöhtes CO₂ im FACE Experiment:
Proteomik, Physiologie und Bestandesentwicklung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Agrarwissenschaften

vorgelegt

der Fakultät Agrarwissenschaften

von

Simone Weber
aus Lahn-Wetzlar

2006

Die vorliegende Arbeit wurde am 31.08.2006 von der Fakultät Agrarwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften“ angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung: 12.10.2006

Dekan: Prof. Dr. W. Bessei

1. Prüfer und Berichterstatter: Prof. Dr. A. Fangmeier

2. Prüfer und Berichterstatter: PD Dr. F. von Eggeling (Universität Jena)

3. Prüfer: Prof. Dr. N. von Wirén

FÜR MEINE ELTERN

In der Natur setzen sich Aktion und Reaktion immer weiter fort. Alles ist mit allem verbunden. Nirgendwo gibt es etwas, das getrennt ist. Alles hat miteinander zu tun und ist wechselseitig abhängig. Überall ist jedes Ding mit allen anderen Dingen verbunden.

Auf jede Frage gibt es eine entsprechende Antwort.

(Swami Prajnanpad 1891-1974)

ABKÜRZUNGEN

B 6	Blatt 6 des Sommerweizens
B7	Blatt 7 des Sommerweizens
BM	Biomasse
CHL a	Chlorophyll a-Konzentration
C/N	Kohlenstoff zu Stickstoff-Verhältnis
DE	Deckungsgrade
2 DE	zweidimensionale Gelelektrophorese
ENT	phänologische Entwicklung
FACE	Free Air Carbon Dioxide Enrichment
FS	Fahnenblatt
Frucht E.	Fruchtentwicklung
GP	Gesamtprotein-Konzentration
GRM	General Regression Model
ID	Identifizierung ausgewählter Peaks
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Kö	Körner
LRR	Leucin rich repeat
Milchr.	Milchreife
MS	Massenspektrometer
P	Proteomik
PM	Proteinmuster
PR	pathogenesis related
TNA	Tage nach der Aussaat
TOF	Time of Flight
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase
SAX	strong anion exchanger, Anionenaustauscher-Oberfläche
SELDI	Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation
s. Milchr.	späte Milchreife
voll E.	Pflanze ist voll entwickelt
WCX	weak cation exchanger, Kationenaustauscher-Oberfläche

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Zielsetzung.....	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Versuchsaufbau.....	12
2.1.1 Bodenbearbeitung und Etablierung des Pflanzenbestandes.....	12
2.1.2 Wasser- und Nährstoffversorgung.....	14
2.1.3 Das Mini-Free Air Carbon Dioxide (FACE)-System.....	15
2.1.4 Erhebung der Klimadaten	17
2.2 Übersicht der durchgeführten Untersuchungen.....	18
2.2.1 Zeitplan der Untersuchungen.....	19
2.2.2 Schema der Zwischenernten.....	20
2.2.3 Erfassung der Chlorophyll a-Konzentration und der Bestandesentwicklung.....	22
2.3 Proteomik.....	23
2.3.1 Bestimmung der Proteinmuster mittels SELDI-TOF-MS.....	23
2.3.2 Identifizierung ausgewählter Peaks.....	28
2.4 Physiologische Untersuchungen.....	33
2.4.1 Bestimmung der Gesamtkonzentration an löslichem Protein.....	33
2.4.2 Bestimmung der Gesamtstickstoff- und Gesamtkohlenstoff-Konzentration.....	33
2.4.3 Relative Chlorophyll a-Konzentration.....	33
2.4.4 Oberirdische Biomasse der Einzelpflanzen.....	34
2.5 Methoden zur Erfassung der Bestandesentwicklung.....	35
2.5.1 Phänologische Untersuchungen.....	35
2.5.2 Bestimmung der Deckungsgrade.....	36
2.6 Statistische Methoden.....	36
2.6.1 T-Test.....	37
2.6.2 GRM (General Regression Model)	37
2.6.3 Multipler Vergleichstest (PostHoc Test).....	37
3 Ergebnisse	38
3.1 Wirkungskriterien in Sommerweizen (<i>Triticum aestivum</i> L.).....	38
3.1.1 Reaktionen des Proteoms.....	38

3.1.1.1	Proteinmuster in Blättern und Körnern.....	39
3.1.1.2	Identifizierung von Proteinen in Fahnenblättern und Körnern.....	55
3.1.2	Physiologische Reaktionen auf erhöhte CO ₂ -Konzentrationen.....	61
3.1.2.1	Konzentration an löslichen Proteinen in Sommerweizen.....	61
3.1.2.2	Kohlenstoff-Konzentration, Stickstoff-Konzentration und C/N-Verhältnis.....	64
3.1.2.3	Relative Chlorophyll a-Konzentration.....	70
3.1.2.4	Oberirdische Biomasse des Sommerweizens.....	73
3.2	Wirkungskriterien in Ackersenf (<i>Sinapis arvensis</i> L.).....	78
3.2.1	Proteinmuster in Blättern.....	78
3.2.2	Reaktionen auf physiologischer Ebene.....	79
3.2.2.1	Konzentration an löslichen Proteinen in Blättern.....	79
3.2.3	Relative Chlorophyll a-Konzentration.....	80
3.3	Bestandesentwicklung der Weizen-Wildkraut-Gemeinschaft.....	84
3.3.1	Entwicklung des Weizens.....	84
3.3.2	Phänologische Entwicklung des Ackersenfs und weiterer Wildkräuter.....	85
3.3.3	Deckungsgrade des Bestandes.....	86
3.4	Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse.....	90
4	Diskussion	92
4.1	Fazit und Ausblick.....	113
5	Zusammenfassung	115
6	Summary	117
7	Literaturverzeichnis	119
8	Abbildungsverzeichnis	133
9	Tabellenverzeichnis	135
10	Anhang	137

1 EINLEITUNG

Die Kohlendioxid-Konzentration in unserer Atmosphäre kann mittels Analysen von Eisbohrkernen aus der Antarktis derzeit bis zu 650000 Jahre zurückverfolgt werden. So stellten Forscher im Rahmen des europäischen Eisbohrprojektes EPICA fest, dass während der letzten acht Eiszeitzyklen bislang in keinem Interglazial CO₂-Konzentrationen über 280 ppm vorherrschten (AUGUSTIN ET AL. 2004, SIEGENTHALER ET AL. 2005). Damit ist die heutige CO₂-Konzentration in unserer Atmosphäre rund 27 % höher als während der letzten 650000 Jahre (SIEGENTHALER ET AL. 2005). Zu einer Überschreitung der 280 ppm-Grenze und einem weiteren Anstieg der CO₂-Konzentrationen kam es erst Mitte des 19. Jahrhunderts zu Beginn der Industrialisierung (IPCC 2001). Dieser Anstieg der atmosphärischen Kohlendioxid-Konzentration stellt eine der wichtigsten globalen Veränderungen dar und ist durch anthropogene Faktoren, wie dem Einsatz fossiler Brennstoffe (MARLAND ET AL. 2000) oder der Änderung der Landnutzung, insbesondere im tropischen Bereich (WILSON 1978, RICHARDS ET AL. 1983), bedingt. Die CO₂-Konzentrationen sind von ca. 280 ppm im Jahr 1850 auf heute ca. 390 ppm gestiegen.

Da der Mensch auch zukünftig und in immer stärkerem Ausmaß in den Naturhaushalt eingreift, gilt als gesichert, dass die atmosphärische CO₂-Konzentration weiter steigen wird. Einige Modellsimulationen des globalen Kohlenstoff-Kreislaufes sagen Konzentrationen zwischen 540 und 970 ppm bis zum Jahr 2100 voraus. (siehe Abb. 1.1, COX ET AL. 2000). Dies kommt einer Steigerung um 90-250% gegenüber der vorindustriellen Konzentration von 280 ppm gleich. Mit welchem Ausmaß und wie schnell diese extrem hohen Konzentrationen an atmosphärischem Kohlendioxid in Zukunft erreicht werden, hängt maßgeblich von dem Ausmaß des anthropogenen Energieverbrauches, der Art des verwendeten Energieträgers, aber auch von der künftigen Landnutzung ab (PRITCHARD & AMTHOR 2005).

Kohlendioxid hat zwei wesentliche Effekte. In seiner Rolle als Treibhausgas bewirkt es aufgrund seiner Strahlungsabsorption im Infrarotbereich eine Erwärmung der Erdoberfläche, was wiederum eine Verschiebung der Klima- und Vegetationszonen zur Folge hat. So ist die Lufttemperatur im vergangenen Jahrhundert weltweit um durchschnittlich 0,8°C gestiegen (UBA 2005). Eine weitere Folge aufgrund des globalen Wandels ist die zunehmende Erwärmung der Meere.

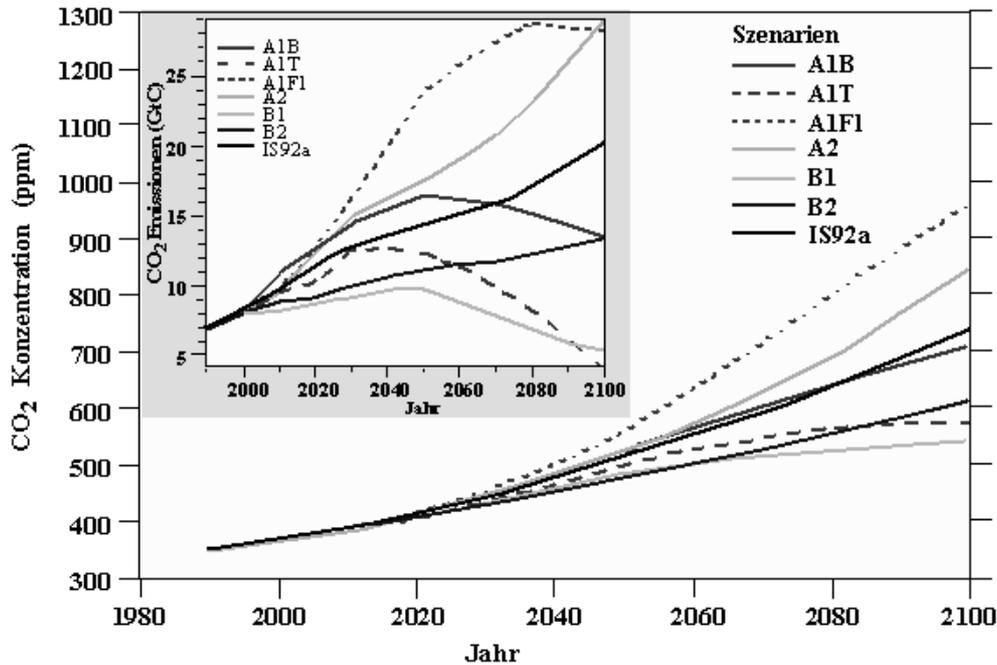


Abb. 1.1: Emissionen und atmosphärische Konzentration von CO₂ 1990-2100. (Quelle: IPCC: Climate Change 2001: Synthesis Report)

Da diese Erwärmung nach bisherigen Kenntnissen einen wichtigen Faktor darstellt, der mit dem Auftreten und der Stärke von Orkanen korreliert (EMANUEL 2005, WEBSTER ET AL. 2005), erwarten Klimaforscher zukünftig ein verstärktes Vorkommen dieser Naturkatastrophen (WITZE 2006). Darüber hinaus werden häufigere Wetterextreme, beispielsweise Hitzewellen oder sintflutartige Regenfälle, und ein drastischer Rückgang der Gebirgsgletscher prognostiziert (UBA 2005).

Andererseits ist CO₂ das wichtigste Nährelement der Pflanzen, so dass ein Anstieg der CO₂-Konzentration direkte Folgen für die Vegetation haben wird. Eine erhöhte Kohlendioxid-Konzentration hat Auswirkungen auf verschiedene Stoffwechselwege der Pflanzen sowie auf die daran beteiligten Enzyme.

Erhöhtes CO₂ und der Primärstoffwechsel

Die Reaktionen des Primärstoffwechsels und insbesondere der Photosynthese sind die bisher am besten untersuchten Gebiete der CO₂-Wirkungsforschung. Die Reaktionen der Pflanzen sind hierbei abhängig von der Art der Photosynthesefixierung. So weisen C₃ Pflanzen, deren Photosyntheseleistung unter momentanen atmosphärischen Kohlendioxid-Konzentrationen limitiert ist, stärkere Reaktionen auf als C₄ Pflanzen (PRITCHARD & AMTHOR 2005).

Viele Studien der letzten 50 Jahren zeigten, dass die Photosyntheseleistung von C₃ Pflanzen unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen ansteigt (IDSO & KIMBALL 1992, TESKEY

1995, POORTER ET AL. 1996). Diese Förderung der Photosynthese ist darauf zurückzuführen, dass die Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RubisCO), das Zentralenzym der Photosynthese bei C₃ Pflanzen, unter atmosphärischer Kohlendioxid-Konzentration CO₂-limitiert ist. Darüber hinaus kommt es durch das erhöhte [CO₂]:[O₂]-Verhältnis in den Chloroplasten zu einer Reduktion der Photorespiration (DRAKE ET AL. 1999). Erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen können über kurze Zeit die Photosynthese von C₃ Pflanzen um bis zu 60% steigern (BOWES 1991, 1993, DRAKE ET AL. 1997). Allerdings wurde die Förderung bei einer Begasung über längere Zeiträume geringer oder war nahezu gleich null. Es kam folglich zu einer Anpassung der Photosyntheseleistung der Testpflanzen (WEBBER ET AL. 1994, KAUDER ET AL. 2000, VON CAEMMERER ET AL. 2001, ADAM ET AL. 2004).

Während dieser Akklimatisierung kam es in den meisten Fällen zu einer Reduzierung der RubisCO sowie anderer Proteine, die an der Photosynthese der Pflanzen beteiligt sind (SICHER ET AL. 1994, ROBERTSON & LEECH 1995, ROGERS & ELLSWORTH 2002). Diese Studien zeigen, dass man von den Reaktionen der Pflanzen auf kurzzeitige Begasung nicht auf die langfristigen Auswirkungen von erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen schließen kann.

Eine verminderte Stomataleitfähigkeit sowie eine Reduzierung der Stomatadichte, ohne dass dadurch jedoch die Photosynthese negativ beeinträchtigt wird, sind weitere Effekte erhöhter CO₂-Konzentrationen auf den Primärstoffwechsel der Pflanzen (EAMUS 1996, DRAKE ET AL. 1997, MORRISON 1998). Die Folge dieser Effekte ist vielmehr eine erhöhte Wassernutzungseffizienz der Pflanzen (WOODWARD & KELLY 1995, BEERLING ET AL. 1998, LAWLOR & MITCHELL 2000).

Viele Studien konnten unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen eine erhöhte Stickstoff-Nutzungseffizienz nachweisen (HOCKING & MEYER 1991, PETERSON ET AL. 1993, MCKEE & WOODWARD 1994, FANGMEIER ET AL. 1999). Dies lässt sich mit einer Reduzierung der Photorespiration und der dazu benötigten Proteine in Folge eines erhöhten [CO₂]:[O₂]-Verhältnisses in den Zellen erklären (FANGMEIER & JÄGER 2001). Darüber hinaus steigt die Carboxylierungsrate der RubisCO unter dem erhöhten CO₂/O₂-Partialdruck an, so dass weniger Enzym notwendig ist, um die gleiche Assimilationsrate zu erreichen. Mit erhöhten CO₂-Konzentrationen begaste Pflanzen benötigen demnach eine geringere Enzymausstattung, um die gleiche Photosyntheseleistung zu erzielen wie Kontrollpflanzen (WOODROW 1994, KÖRNER 2001). Der aus den Enzymen der Photosynthese und Photorespiration gewonnene Stickstoff kann innerhalb der Zelle in den Aufbau anderer Proteine investiert (SAGE ET AL. 1989) oder in andere Pflanzenorgane, wie etwa die Wurzeln oder generative Organe, transportiert (STITT & KRAPP 1999) werden.

Die bisher beschriebenen Effekte von erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen beschränken sich auf den Primärstoffwechsel in photosynthetisch aktiven Organen, den Quellen-Organen der Pflanzen. Diese Organe versorgen die nicht-photosynthetisch aktiven Organe, auch als Senken-Organen bezeichnet, mit Photosyntheseassimilaten. Eine Änderung im Stoffwechsel der Quellen-Organen unter erhöhtem Kohlendioxid wirkt sich folglich auch auf den Stoffwechsel der Senken-Organen, wie beispielsweise generative Organe oder Wurzeln, aus. So wiesen beispielsweise FANGMEIER ET AL. (1999) und KIMBALL ET AL. (2001) unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen eine verminderte Kornqualität bei Weizen nach.

Bisher liegen mehrere Theorien zu den Regulationsmechanismen der Protein- und Stickstoff-Konzentration unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen vor. Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführte Literaturrecherche ergab drei mögliche Modelle zur Erklärung physiologischer Reaktionen unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen. Die am besten erforschte Theorie geht von einer *Feedback-Regulation* photosynthetischer Gene aus (MOORE ET AL. 1999). In den Blättern werden hierbei weit mehr Kohlenhydrate gebildet als abtransportiert, was in den vegetativen Pflanzenteilen zu einer Akkumulation der Kohlenhydrate, insbesondere Stärke und Saccharose führt. Diese Anhäufung von Kohlenhydraten bewirkt eine Inhibition von Genen, die photosynthetische Enzyme kodieren oder eine Inaktivierung bereits existierender Proteine (CHENG ET AL. 1998, VU ET AL. 1983, VAN OOSTEN & BESFORD 1994, PAUL & PELLNY 2003). So wurden zum Beispiel bei einer Langzeitbegasung reduzierte Konzentrationen der RubisCO sowie anderen photosynthetischen Enzyme und parallel dazu eine Kohlenhydrat-Akkumulation nachgewiesen (BOWES ET AL. 1996, ROGERS ET AL. 1996, DRAKE et al. 1997). Viele Studien berichten auch in diesem Zusammenhang von einer Abnahme der Gesamtkonzentration löslicher Proteine sowie der Carotinoide und der Chlorophylle a und b (SURANO ET AL. 1986, POLLE ET AL. 1993, PRITCHARD ET AL. 2000). Die Akkumulierung von Zuckern ist auch auf Proteinebene nachweisbar. Einige Studien dokumentierten erhöhte Konzentrationen von Proteinen, die an der Bildung von Saccharose beteiligt sind. LI ET AL. (2002) konnten beispielsweise eine Zunahme der Saccharose-Phosphat-Synthase und der Saccharose-Synthase und eine gleichzeitige Abnahme der RubisCO feststellen.

Geht man von einer zuckerabhängigen Regulation der Photosynthese aus, so müssten Prozesse, die zu einem Abbau der Kohlenhydrate in den Blättern führen, das Ausmaß der Reaktion verringern. Diese Hypothese wurde in einigen Studien bestätigt. Hierbei war die Akklimatisierungsrate der Photosynthese abhängig von der Senkenkapazität der nicht-photosynthetisch aktiven Organe. Beispielsweise wiesen DRAKE ET AL. (1997) nach, dass es bei

einem unbeschränkten Bodenvolumen und guter Nährstoffversorgung der Pflanzen zu einer geringeren Akklimatisierung der Photosynthese kommt. Dies ist auf die erhöhte Kapazität eines Senkenorgans, in diesem Fall der Wurzeln, zurückzuführen. Die Kohlenhydrate können aus den photosynthetisch aktiven Quellen-Organen abtransportiert werden, wodurch die Akklimatisierung der Photosynthese verringert wurde.

Andere Studien konnten allerdings eine Abnahme der Protein- und Stickstoff-Konzentrationen sowie eine Akklimatisierung der Photosynthese feststellen, obwohl keine Kohlenhydrate in den Zellen akkumulierten.

Das zweite Modell wurde von MILLER ET AL. (1997) beschrieben und geht von einer früher einsetzenden oder verstärkten Seneszenz unter erhöhtem Kohlendioxid aus. Es wird im folgenden Verlauf der Arbeit als *Seneszenzmodell* bezeichnet. Aufgrund der früher einsetzenden Seneszenz der vegetativen Organe kommt es zu einem früheren Proteinabbau inklusive der RubisCO, der Gesamtstickstoff-Konzentration und der Chlorophyll-Konzentration. Die Konzentrationsabnahme der RubisCO und weiterer Photosynthese-relevanter Proteine führen zu einer Erniedrigung der Photosyntheseleistung. Auch COOK ET AL. (1998) stellten fest, dass die Abnahme der Photosyntheserate auf eine verfrühte Seneszenz von Borstgras zurückzuführen war.

Eine weitere Erklärung zur Reduktion der Protein- und Stickstoff-Konzentration liefert eine *Umverteilung des Stickstoffs* in der Pflanze. Mit erhöhten CO₂-Konzentrationen begaste Pflanzen wiesen häufig eine erhöhte Stickstoff-Nutzungseffizienz aufgrund einer verringerten Transpirationsrate und einer Abnahme der Protein- und Stickstoff-Konzentration in den photosynthetisch aktiven Organen auf. Der bei diesem Prozess frei werdende Stickstoff kann entweder innerhalb der Zellen für den Aufbau anderer Proteine verwendet oder in andere Pflanzenorgane transportiert werden (SAGE ET AL. 1989). Darüber hinaus stellten auch andere Autoren einen engen Zusammenhang zwischen Stickstoffhaushalt und den Wirkungen erhöhter CO₂-Konzentrationen fest. So sind die Folgen erhöhter Kohlendioxid-Konzentrationen abhängig von der Nährstoff-, insbesondere der Stickstoff-Versorgung der Pflanzen (STITT & KRAPP 1999, KAWAMURA & UEMARA 2003). Unter Stickstoffmangel zeigten die Pflanzen vermehrte und verstärkte Reaktionen auf erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen im Gegensatz zu Reaktionen von Pflanzen mit optimaler Stickstoffversorgung (STITT & KRAPP 1999). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die RubisCO neben ihrer Funktion als Photosynthese-Enzym eine Funktion als Stickstoff-Speicher besitzt. Bei einer Stickstoff-Mangel-Situation wird der Stickstoff aus der RubisCO gewonnen und das Defizit dadurch behoben. Es ist nicht

bekannt, ob auch andere Proteine als Stickstoff-Speicher dienen und in solchen Situationen abgebaut werden können.

Die vorliegende Literatur zur CO₂-Wirkungsforschung zeigt, dass die Reaktionen der Pflanzen auf langfristig erhöhtes CO₂ nicht nur durch das Gas selbst verursacht werden, sondern von Interaktionen mit dem Stickstoffhaushalt oder den verfügbaren Senken und Senkenkapazitäten von Kohlenhydraten und N-Verbindungen abhängen. Darüber hinaus spielen auch klimatische Faktoren oder das Entwicklungsstadium der Pflanzen eine entscheidende Rolle. Beispielsweise stellten GRÜTERS ET AL. (2000) fest, dass die Biomasse des Halmes von Weizen erst nach der Blüte der Pflanzen auf die langfristige Begasung mit CO₂ reagierte. Um ein möglichst breites Spektrum der Veränderungen aufgrund erhöhter CO₂-Konzentrationen zu erfassen, ist es daher wichtig, die Pflanzen an mehreren Zeitpunkten und damit in unterschiedlichen Entwicklungsstadien zu untersuchen.

Zusammenfassend betrachtet verursachen erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen viele Veränderungen im Primärstoffwechsel der Pflanzen, meist in Verbindung mit einer Reduktion der Gesamtkonzentration an Proteinen und der Stickstoff-Konzentration. Allerdings ist bisher nicht geklärt, über welchen Mechanismus die erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen in den Primärstoffwechsel eingreifen.

Erhöhtes CO₂ und der Sekundärstoffwechsel

Es ist davon auszugehen, dass die erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen über Veränderungen im Primärstoffwechsel auch Komponenten des Sekundärstoffwechsels beeinflussen. Eine direkte Auswirkung von erhöhtem Kohlendioxid auf Faktoren des Sekundärstoffwechsels etwa in Form eines CO₂-Sensors konnte bisher nicht nachgewiesen werden (SAGE 2002).

Aufgrund der unter erhöhten CO₂-Konzentrationen verringerten Photorespiration kam es in Folge einer verminderten Bildung von H₂O₂ zu einer Verringerung des antioxidativen Systems der Pflanzen (SCHWANZ & POLLE 1998, PRITCHARD ET AL. 2000). Andere Umweltveränderungen, wie etwa Dürre oder Hitzestress, bewirkten Veränderungen in der Resistenzantwort der Pflanzen über eine erhöhte Bildung von Polyaminen oder Hitze-Schock Proteinen (HSPs) (NGUYEN 1994, AGRAWAL ET AL. 2005). Die Auswirkungen von erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen auf diese Mechanismen sind allerdings bisher unklar (AMTHOR & PRITCHARD 2005).

Es liegen bisher wenige Studien zu den Auswirkungen von erhöhtem Kohlendioxid auf Pathogene vor. Es wird vermutet, dass die Resistenz der Pflanzen gegenüber den Pilzen oder

Bakterien erhöht wird. Dies wird auf die reduzierte Stickstoff-Konzentration unter erhöhtem Kohlendioxid zurückgeführt. Da der Pathogenbefall mit der Stickstoff-Konzentration positiv korreliert (THOMPSON ET AL. 1993), ist ein reduzierter Befall der Pflanzen eine Folge des unter erhöhtem CO₂ reduzierten N-Gehaltes. MCELDRONE ET AL. (2005) fanden heraus, dass ein reduzierter Pilzbefall auf Änderungen in der biochemischen Zusammensetzung der Blätter zurückzuführen war. Darüber hinaus hatte die Reduktion der Stomataleitfähigkeit unter erhöhtem CO₂ auch einen negativen Effekt auf die Pathogene, da das Eindringen der in dieser Studie untersuchten Pilze über die Stomata verringert wurde. Inwiefern die Produktion von Abwehrsubstanzen oder die Induktion von Abwehrsystemen durch erhöhtes Kohlendioxid beeinflusst werden, ist allerdings bisher nicht eindeutig geklärt (PRITCHARD & AMTHOR 2005).

Die bisher durchgeführten Studien zeigen, dass erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen in mehrere Stoffwechselwege der Pflanze eingreifen, wobei bisher nur limitierte Kenntnisse hinsichtlich der Reaktionen des Sekundärstoffwechsels vorliegen. Ein geeignetes Methodenspektrum zur Untersuchung der biochemischen Veränderungen in der Pflanze bietet die Proteomik.

Erhöhtes CO₂ und Pflanzenproteomik

Die Proteomik beschreibt die Analyse der Gesamtheit der gebildeten Proteine einer Zelle, eines Gewebes oder eines Organismus unter bestimmten physiologischen Bedingungen oder von verschiedenen Entwicklungsstadien. Darüber hinaus werden mittels der Proteomik die Proteineigenschaften, wie etwa Interaktionen mit anderen Proteinen oder post-translationale Modifikationen, untersucht (BARBIER-BRYGOO 2004, BOLWELL ET AL. 2004). Die Analyse der Proteine ist von entscheidender Bedeutung für das Verständnis der molekularen Grundlagen von Lebensvorgängen, da die Informationen der Genomik, das heißt die Analyse der Gesamtheit aller Gene eines Organismus, beispielsweise mittels Sequenzierung, alleine nicht ausreichen. Untersuchungen ergaben, dass bei manchen Genen eine Korrelation, aber teilweise auch große Unterschiede in der vorhandenen Menge der mRNA und den dazu gehörigen Proteinen auftraten (ANDERSON & SEILHAMER 1997, GYGI ET AL. 1999). Darüber hinaus liefern die Information über die DNA oder die mRNA keinerlei Informationen über post-translationale Modifizierungen oder die Struktur der Proteine. Aus diesen Gründen ist es von bedeutender Wichtigkeit, die Proteine selbst zu untersuchen (HIRANO ET AL. 2004).

Die Entwicklung der Massenspektrometrie Ende der 80er Jahre und deren Einsatz in der Proteinanalytik ermöglichte es, immer kleinere Konzentrationen an Proteinen in komplexen

Proteingemischen zu identifizieren. Die *Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry* (SELDI-TOF-MS) stellt eine erweiterte Möglichkeit der Massenspektrometrie dar und wird neben der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2DE) zur Erfassung von Proteomen angewandt (CHAPMAN 2002, REHM 2002). Diese Methode wurde von HUTCHENS und YIP (1993) beschrieben und kombiniert Proteinchips mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer. Die Proteine binden in Abhängigkeit ihrer Eigenschaften an die Proteinchips und werden anschließend mittels TOF-MS analysiert. Die Auswertung liefert die Masse und relative Konzentration eines Proteins, was einen quantitativen und qualitativen Vergleich zweier Proben ermöglicht. Die SELDI-TOF-MS ist eine etablierte Methode in der klinischen Forschung und wird beispielsweise in der Erforschung von Biomarkern oder Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt (VON EGGELING 2001, MELLE ET AL. 2004, 2005, BUSCH ET AL. 2005, LEHMANN ET AL. 2005).

Die meisten Studien im Bereich der Analyse der Pflanzenproteome wurden mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (2DE) und anschließender Massenspektrometrie durchgeführt (THIELLEMENT ET AL. 1999). So wurden beispielsweise die Membranproteine von Kleeblättern (WATSON ET AL. 2004), das Endosperm von Maiskörnern (MÉCHIN ET AL. 2004), die Blattproteine von Weizen (DONELLY ET AL. 2005) und das Apoplasten-Proteom von Reis, der Ackerschmalwand und des Weizens (HASLAM ET AL. 2003) mittels dieser Technik untersucht. Die Proteomik fand bisher auch in Studien zu veränderten Umweltbedingungen und deren Auswirkungen auf Pflanzen Anwendung. So wurden beispielsweise die Proteome der Ackerschmalwand (KAWAMURA & UEMURA 2003) und Pappeln unter Kältestress (RENAUT ET AL. 2004), von Bohne und Tomate unter Hitzestress oder von Reis unter Dürre (SALEKDEH ET AL. 2002) untersucht.

Allerdings standen die Auswirkungen von erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen auf das Pflanzenproteom nur selten im Mittelpunkt der bisherigen Arbeiten. BAE & SICHER (2004) untersuchten die Proteinexpression von *Arabidopsis thaliana* unter Freilandbedingungen. Die Autoren stellten fest, dass unter erhöhten CO₂-Konzentrationen die Konzentrationen einiger Proteine aus verschiedenen Stoffwechselwegen verändert wurden. Diese Studie wurde jedoch mittels 2DE durchgeführt, während bisher keine Untersuchungen des Pflanzenproteoms unter erhöhten CO₂-Konzentrationen mittels SELDI-TOF-MS vorliegen.

Die SELDI-TOF-MS-Technologie weist einige Vorteile gegenüber der 2DE auf. Im Gegensatz zu der sehr zeitaufwendigen 2DE liefert die SELDI-TOF-MS-Technologie sehr schnell reproduzierbare Resultate (WIESNER 2004). Darüber hinaus zeichnet sich die SELDI-Technologie durch eine hochsensitive Quantifizierung der Ergebnisse aus (VORDERWÜHL-

BECKE ET AL. 2005). Ein weiterer großer Vorteil der Methode ist die Analyse von Proteinen mit sehr geringen Konzentrationen, wie etwa Proteinkinasen oder regulatorische Proteine, was mittels der häufig verwendeten 2DE nicht möglich ist (DUBEY & GROVER 2001, HIRANO ET AL. 2004). Ferner können mit der ProteinChip-Technologie Proteine mit sehr niedrigem Molekulargewicht untersucht werden, da Proteine zwischen 2 und 25 kDa besonders gut aufgelöst werden (REHM 2002). Untersuchungen des Pflanzenproteoms mittels SELDI-TOF-MS ermöglichen es daher, ein anderes Spektrum an Proteinen zu untersuchen, als dies mit den bisherigen Methoden der Fall war. Vor allem auf dem Gebiet der CO₂-Wirkungsforschung ist dies von besonderem Interesse, da mit der Möglichkeit zur Analyse niedermolekulare Proteine neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet gewonnen werden können.

Erhöhtes CO₂ und die Reaktionen eines Pflanzenbestandes

Die Veränderungen des Pflanzenproteoms auf die erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen können Änderungen in der Pflanzenentwicklung bewirken und sich auf die Pflanzenbiomasse auswirken. So zeigen durchweg alle experimentellen Untersuchungen zur Wirkung von steigenden CO₂-Konzentrationen auf Nutz- und Wildpflanzenarten erhöhte Biomasseproduktionen bzw. Erträge (KIMBALL 1983, CURE & ACOCK 1986, ROGERS & DAHLMAN 1993, POORTER ET AL. 1996, COWLING & SAGE 1998, FANGMEIER & JÄGER 2001, CRAIGON ET AL. 2002). Allerdings profitieren nicht alle Arten gleichermaßen vom höheren CO₂-Angebot, so dass Verschiebungen im Konkurrenzgefüge der Vegetation innerhalb von Ökosystemen zu erwarten sind.

Das Ausmaß der Wachsförderung ist hierbei von verschiedenen Faktoren, wie etwa dem CO₂-Fixierungstyp, abhängig (POORTER 1993). Hinsichtlich des CO₂-Fixierungswegs treten die stärksten Photosynthese- und Wachsförderungen bei C₃-Arten auf, da die CO₂-Fixierung bei den derzeitigen Konzentrationen weit unterhalb des Sättigungsbereichs der RubisCO arbeitet (BOWES 1993). Weniger stark ist die Reaktion von CAM-Pflanzen, und C₄-Arten schließlich reagieren kaum, da sie mit der CO₂-Vorfixierung eine sehr effektive „CO₂-Pumpe“ besitzen, die dafür sorgt, dass ihre CO₂-Fixierung auch bei den heute herrschenden CO₂-Konzentrationen schon im Sättigungsbereich liegt (LARCHER 1994, PRITCHARD & AMTHOR 2005). Aufgrund der art- und genotyp-spezifischen CO₂-Antwort müssen Veränderungen der Vegetationsstruktur erwartet werden (LEADLEY ET AL. 1999).

Die Mehrzahl der CO₂-Anreicherungsexperimente wurde unter naturfernen oder freiland-simulierenden Bedingungen in Klimakammern oder Gewächshäusern durchgeführt. In den vergangenen 15 Jahren sind zunehmend Studien unter Freilandbedingungen hinzugekommen

(Übersicht in FANGMEIER & JÄGER 2001), diese zeigten allerdings keine einheitlichen oder vergleichbaren Ergebnisse bzw. sie haben aus Laborexperimenten nicht vorhergesagte Effekte nachgewiesen. Aus diesem Grund ist es wichtig, die Effekte erhöhter Kohlendioxid-Konzentrationen unter Freilandbedingungen zu untersuchen, was mittels der Free Air Carbon Dioxide Enrichment (FACE)-Technologie möglich ist. Zurzeit sind weltweit mehr als 30 FACE-Anlagen in Betrieb (siehe <http://cdiac.esd.ornl.gov/>). Die meisten dieser Studien untersuchen die Reaktionen von Kulturarten in Monokultur oder Pflanzengemeinschaften auf erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen.

In der vorliegenden Arbeit sollen die Auswirkungen von erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen auf eine Kulturart in Zusammenstellung mit einer realistischen Wildkrautflora in einem FACE-Experiment untersucht werden. Im besonderen Fokus liegen hierbei die physiologischen Reaktionen des Sommerweizens (*Triticum aestivum* L.) und des Ackersenfs (*Sinapis arvensis* L.) als Modellorganismen für eine Kultur- und Wildkrautart.

1.1 ZIELSETZUNG

Das Ziel der vorliegenden Studie ist, die Auswirkungen von erhöhten CO₂-Konzentrationen auf eine Pflanzen-Gemeinschaft hinsichtlich (i) des Pflanzenproteoms, (ii) der Physiologie, (iii) der Bestandesentwicklung sowie (iv) die potentiellen Beziehungen zwischen diesen Wirkungskriterien unter Freilandbedingungen zu untersuchen.

Um diese Ziele zu erreichen werden folgende Arbeitshypothesen formuliert.

Arbeitshypothese 1: Das Proteinmuster der Kulturart Sommerweizen und der Wildkrautart Ackersenf reagiert auf erhöhtes Kohlendioxid mit Änderungen in den Proteinkonzentrationen, es werden aber keine spezifischen Proteine aufgrund der CO₂-Begasung gebildet.

Arbeitshypothese 2: Die Proteine des Primär- und Sekundärstoffwechsels werden aufgrund der erhöhten CO₂-Konzentrationen beeinflusst.

Arbeitshypothese 3: Die Gesamtprotein-, Stickstoff- und Chlorophyll a-Konzentration der vegetativen Pflanzenorgane wird aufgrund erhöhter CO₂-Konzentrationen erniedrigt, während das C/N-Verhältnis erhöht wird. Diese Wirkungsparameter werden ebenfalls in den generativen Organen aufgrund der erhöhten CO₂-Konzentrationen beeinflusst.

Arbeitshypothese 4: Die Biomasseförderung der vegetativen Pflanzenorgane wirkt sich auch auf die Biomasse der generativen Organe aus.

Arbeitshypothese 5: Die vegetative und generative Entwicklung von Weizen und assoziierten Wildkräutern wird aufgrund der erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen beeinflusst.

Arbeitshypothese 6: Während der Vegetationsperiode kommt es zu einer artspezifischen Wachsförderung, wodurch Änderungen in der Vegetationsstruktur der Pflanzengemeinschaft auftreten. Die Deckung des gesamten Pflanzenbestandes wird während der Vegetationsperiode aufgrund der erhöhten CO₂-Konzentrationen gefördert.

2 MATERIAL & METHODEN

Eine Pflanzengemeinschaft, bestehend aus einer Kulturpflanzenart und einer Auswahl assoziierter Wildkrautarten, wurde mittels eines Mini-Free Air Carbon Dioxide Enrichment (FACE)-Systems erhöhten CO₂-Konzentrationen ausgesetzt. Die folgenden Kapitel beschreiben den Versuchsaufbau inklusive der Beschreibung der Mini-FACE Anlage (Kap. 2.1), das Untersuchungsdesign (Kap. 2.2) sowie die verwendeten Methoden für die Labor- und Feldversuche (Kap. 2.4 bis 2.5).

2.1 VERSUCHSAUFBAU

Die Untersuchungsflächen befinden sich auf dem Gelände der Versuchsstation für Pflanzenzüchtung, dem so genannten „Heidfeldhof“ der Universität Hohenheim. Vor Beginn des Projektes im Jahr 2002 wurde das Areal genutzt, die angrenzenden Flächen werden bis heute bewirtschaftet. Die vorherrschende Bodenart ist schluffiger Lehm mit einem pH-Wert von 6,5. Das Gelände liegt 385 m über NN und ist leicht nach Süden geneigt. Auf dem Gelände wurden 15 kreisförmige Untersuchungsflächen (Plots) mit einem Durchmesser von 2 m angelegt. Die folgenden Kapitel beschreiben die Etablierung des Pflanzenbestandes, die Behandlung der Pflanzen inklusive des Aufbaus der Begasungsanlage sowie die Erfassung klimatischer Parameter.

2.1.1 Bodenbearbeitung und Etablierung des Pflanzenbestandes

Zu Beginn des Projektes im Jahr 2002 wurde das vorhandene Erdreich auf 0,5 m Tiefe ausgehoben und nach einer Homogenisierung wiedereingefüllt. Zu Beginn des jeweiligen Untersuchungsjahres wurde der Boden bis auf Spatentiefe umgebrochen und die bereits auf den Flächen vorhandenen Pflanzen wurden entfernt. Die im Projekt zu untersuchende Pflanzengemeinschaft bestand aus der Kulturart Weizen (*Triticum aestivum* L.) und einer Auswahl assoziierter Wildkrautarten. Um die gewünschten Saatedichten (siehe Tab. 2.1 und 2.2) für jede Art zu erreichen, wurden zunächst die optimalen Saatenmengen pro Untersuchungsfläche bestimmt.

Dies geschah mittels der in Keimversuchen ermittelten Keimrate und des Tausendkorngewichtes jeder Art.



Abb. 2.1: Versuchsgelände mit Klimamessstation, Versuchsflächen und Bauwagen mit technischer Ausstattung

Die Pflanzen wurden in beiden Untersuchungsjahren 2003 und 2004 zu Beginn der Vegetationsperiode (März bis April) von Hand ausgesät. Dabei wurde der Weizen in Reihen mit einer Saattiefe von 2-3 cm und einem Reihenabstand von 10-15 cm gesät. Um ein gleichmäßiges Auflaufen der Pflanzen zu gewährleisten, wurden die Samen in einem Abstand von 1,5-2 cm in vorgezogene Rillen abgelegt. Nach dem Schließen der Rillen erfolgte das Ausbringen des Wildkräuter-Saatguts getrennt nach Licht- und Dunkelkeimern. Die Dunkelkeimer wurden gleichmäßig auf der Fläche verteilt und mit einer Erdschicht von ca. 1 cm bedeckt, während die Lichtkeimer ohne Bedeckung auf die Versuchsflächen abgelegt wurden. Nach der Aussaat wurden die Flächen bewässert und mittels Vogelschutznetzen vor Vogelfraß geschützt. Die Artenzusammensetzung und die Saaddichten in den beiden Untersuchungsjahren sind den Tabellen 2.1 und 2.2 zu entnehmen.

Tab. 2.1: Ausgesäte Arten und Pflanzendichten im Jahr 2003

Artname	Deutscher Name	Pflanzendichte pro m ²
<i>Triticum aestivum</i> cv. Transit	Winterweizen	150
<i>Agrostemma gigatho</i>	Kornrade	10
<i>Alopecurus myosuroides</i>	Acker-Fuchsschwanz	10
<i>Amaranthus retroflexus</i>	Zurückgebogener Fuchsschwanz	10
<i>Anagallis arvensis</i>	Acker-Gauchheil	25
<i>Anthemis tinctoria</i>	Färber-Hundskamille	10
<i>Avena fatua</i>	Flughafer	10
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Hirtentäschelkraut	25
<i>Centaurea cyanus</i>	Kornblume	10
<i>Chenopodium album</i>	Weißer Gänsefuß	10
<i>Cirsium arvense</i>	Acker-Kratzdistel	10
<i>Convolvulus arvensis</i>	Ackerwinde	2
<i>Echinochloa crus-galli</i>	Hühnerhirse	10
<i>Erodium cicutarium</i>	Gewöhnlicher Reiherschnabel	15
<i>Euphorbia helioscopia</i>	Sonnenwend-Wolfsmilch	15
<i>Fumaria officinalis</i>	Gemeiner Erdrauch	10
<i>Lamium amplexicaule</i>	Stengelumfassende Taubnessel	15
<i>Lamium purpureum</i>	Rote Taubnessel	15
<i>Matricaria discoidea</i>	Strahllose Kamille	25
<i>Matricaria perforata</i>	Geruchlose Kamille	15
<i>Melampyrum arvense</i>	Acker-Wachtelweizen	10
<i>Papaver rhoeas</i>	Klatsch-Mohn	25
<i>Poa annua</i>	Einjähriges Rispengras	25
<i>Poa trivialis</i>	Gemeines Rispengras	15
<i>Polygonum aviculare</i>	Vogel-Knöterich	10
<i>Polygonum persicaria</i>	Floh-Knöterich	10
<i>Thlaspi arvense</i>	Acker-Hellerkraut	10
<i>Stellaria media</i>	Vogelmiere	25
<i>Veronica hederifolia</i>	Efeu-Ehrenpreis	15
<i>Viola arvensis</i>	Acker-Stiefmütterchen	25
Gesamt		572

Basierend auf den Erfahrungen des ersten Untersuchungsjahres wurde die Gesamtpflanzendichte sowie die Anzahl der Arten im zweiten Jahr erniedrigt, um eine homogenere Pflanzengemeinschaft zu erhalten. Im ersten Untersuchungsjahr wurde aufgrund einer Verwechslung des Saatgutes Winter- anstatt Sommerweizen ausgesät. Es handelte sich um die Winterweizensorte TRANSIT. Im zweiten Untersuchungsjahr wurde die Sommerweizensorte TRISO ausgesät.

Tab. 2.2: Ausgesäte Arten und Pflanzendichten im Jahr 2004

Artname	Deutscher Name	Pflanzendichte pro m ²
<i>Triticum aestivum</i> cv. Triso	Sommerweizen	200
<i>Agrostemma githago</i>	Kornrade	17
<i>Amaranthus retroflexus</i>	Zurückgebogener Fuchsschwanz	17
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Akerschmalwand	37
<i>Capsella bura-pastoris</i>	Hirtentäschelkraut	42
<i>Centaurea cyanus</i>	Kornblume	17
<i>Chenopodium album</i>	Weißer Gänsefuß	17
<i>Echinochloa crus-galli</i>	Hühnerhirse	17
<i>Euphorbia helioscopia</i>	Sonnenwend - Wolfsmilch	20
<i>Matricaria perforata</i>	Geruchlose Kamille	42
<i>Papaver rhoeas</i>	Klatsch-Mohn	42
<i>Polygonum persicaria</i>	Floh-Knöterich	17
<i>Sinapis arvensis</i>	Ackersenf	20
<i>Thlaspi arvense</i>	Acker-Hellerkraut	15
Gesamt		520

2.1.2 Wasser- und Nährstoffversorgung

Der Pflanzenbestand wurde zur Aussaat ausreichend mit Wasser manuell mittels eines Gartenschlauches versorgt. Zusätzlich wurde in beiden Untersuchungsjahren auch nach der Aussaat bewässert (siehe Anhang, Tab. 10.1 & 10.2).

Um den Nährstoffstatus der Versuchsflächen zu bestimmen, wurden vor Versuchsbeginn 2003 und 2004 Bodenproben in bis zu 10 cm Tiefe entnommen. Diese wurden in der Landesanstalt für Landwirtschaftliche Chemie hinsichtlich ihres Gehaltes an Nitrat-Stickstoff untersucht. Da der Boden der Untersuchungsflächen im ersten Untersuchungsjahr im Mittel einen sehr niedrigen Wert (3,13 kg NO₃-N ha⁻¹) aufwies, musste eine Düngung durchgeführt werden. Sie erfolgte im ersten Untersuchungsjahr am 21.5.03 mit Kalkammonsalpeter (50 kg N ha⁻¹) und Thomaskali (15 kg P ha⁻¹, 30 kg K ha⁻¹).

Im zweiten Untersuchungsjahr wurden insgesamt 140 kg N ha⁻¹ (Calciumnitrat) und 15 kg K ha⁻¹, 30 kg P ha⁻¹ ausgebracht. Der Dünger wurde auf drei Gaben verteilt: 50% beim Auflaufen (EC 13-29), 25% beim Schossen (EC 30-39) und 25% bei Blühbeginn (EC 40-59) des Weizens. Am zweiten Düngetermin wurde zusätzlich ein Spurenelementdünger (Mikrotop,

1% Mn, 15% Mg, 12% S, 1% B) verwendet. In beiden Untersuchungsjahren wurde ein zur Umwelt verändertes $^{14}/^{15}\text{N}$ Verhältnis unter Einsatz von ^{15}N markiertem Kaliumnitrat (Chemotrade) verwendet.

2.1.3 Das Mini-Free Air Carbon Dioxide (FACE) - System

Um die Versuchspflanzen mit einer erhöhten CO_2 -Konzentration zu versorgen, wurde ein kammerloses Mini-Freilandexpositionssystem (Mini-FACE = Free Air Carbon dioxide Enrichment) eingesetzt (siehe Abb. 2.2). Im Gegensatz zu den vielfach verwendeten open-top-Kammern ermöglicht dieses System eine Exposition unter maximaler Freilandnähe ohne störende Kammereinflüsse. Die CO_2 -Konzentration wurde in Abhängigkeit



Abb. 2.2: Plot mit CO_2 - Begasung

der vor Ort gemessenen CO_2 -Konzentration der Außenluft um 150 ppm erhöht. Um die Kohlenstoffflüsse in den beobachteten Ökosystemausschnitten untersuchen zu können, wurde zur Konzentrationserhöhung Kohlendioxid mit verringerten Konzentrationen an ^{13}C eingesetzt, dessen $\delta^{13}\text{C}$ -Verhältnis bei -48‰ lag.

Die Begasung der Plots erfolgte unter Berücksichtigung der vor Ort gemessenen Windrichtung und -geschwindigkeit ohne den Einsatz von Gebläsen. Das definierte CO_2 -Luftgemisch gelangte über Teflonschläuche zu den Plots und wurde dort auf die Flächen entlassen. Die Schläuche waren an ein um die Plots gespanntes Plastikband fixiert. Durch dieses „aerodynamische Hilfsmittel“ konnte eine gleichmäßige Verteilung des CO_2 -Luftgemisches über

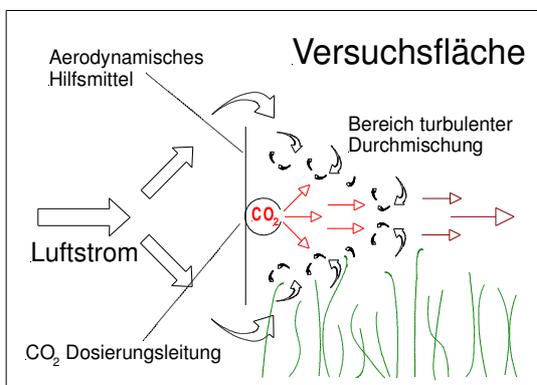


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Begasung (aus ERBS & FANGMEIER 2006)

die Fläche gewährleistet werden (siehe Abb. 2.3). Das Plastikband wurde in zwei verschiedenen Höhen angebracht, um eine optimale Begasung der Pflanzen in jedem Entwicklungsstadium zu gewährleisten. Eine Analyseeinrichtung in der Mitte jedes Plots kontrollierte die tatsächlich auf den Plots vorhandene CO_2 -Konzentration. Weitere technische Details zur Begasungsanlage sind ERBS & FANGMEIER (2006) zu entnehmen.

Insgesamt wurden 15 Untersuchungsflächen (Plots) angelegt. Folgende Behandlungsvarianten wurden bei jeweils fünf Plots eingesetzt:

1. Begasung mit erhöhten CO₂- Konzentrationen (CO₂-Konzentration der Außenluft (ca. 380 ppm) + 150 ppm) (= *FACE*)
2. Kontrolle ohne Begasung, mit Versuchsaufbauten (= *Ambient*)
3. Kontrolle ohne Begasung, ohne Versuchsaufbauten (= *Kontrolle*)

Die folgenden Untersuchungen wurden auf den *FACE*- und *Ambient*-Flächen durchgeführt, wobei die *Ambient*-Behandlung als Kontrolle diente. Die Flächen ohne Begasung und Versuchsaufbauten wurden nicht berücksichtigt.

Die Begasung erfolgte ganztägig und begann in beiden Untersuchungsjahren mit dem Auf-
laufen der ausgesäten Arten und endete mit dem Ende der Vegetationsdauer der ausgesäten
Arten.

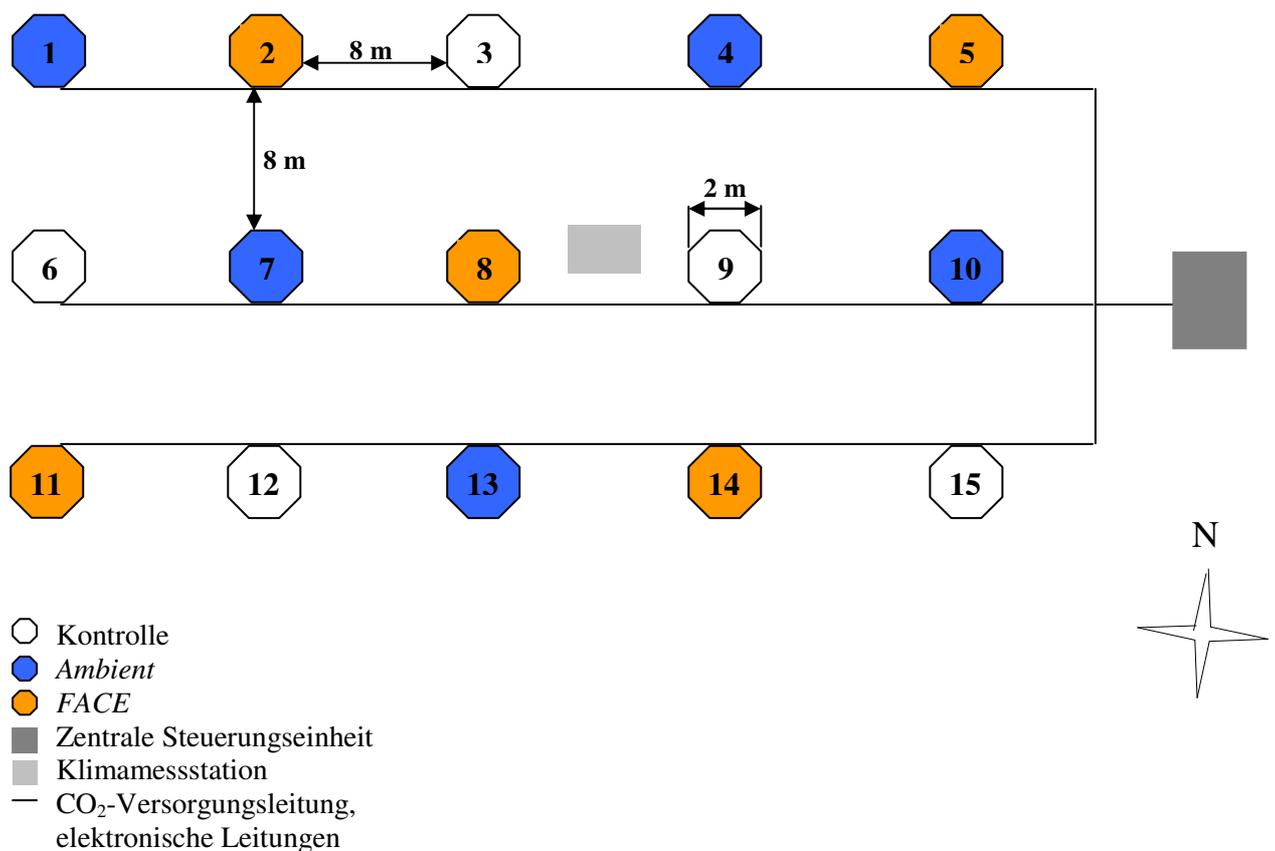


Abb. 2.4: Schema der Versuchsfläche

2.1.4 Erhebung der Klimadaten

Eine spezifisch der FACE-Anlage zugeordnete Messstation erfasste die photosynthetisch aktive Strahlung (PAR) (Typ: CM11, Kipp & Zonen) sowie die Lufttemperatur und -feuchte (Typ: MP100H, Rotronics) auf der Versuchsfläche. Diese Parameter wurden in einem 10-Minuten-Rhythmus erfasst.

Im Boden jedes Plots waren Sensoren zur Bestimmung der Bodenfeuchte (Typ: Trime-EZ, Imko) sowie Sensoren zur Bestimmung der Bodentemperatur (Typ: TM3 Thermistor, UP) installiert. Die Bodenfeuchte- und Bodentemperatur-Sensoren waren in 10 cm Tiefe angebracht. Zusätzlich dazu wurde die Bodentemperatur auf zwei Plots in 20 cm und 30 cm Tiefe gemessen. Die Bestimmung der Bodenparameter erfolgte in einem Messintervall von einer Stunde.

2.2 ÜBERSICHT DER DURCHFÜHRTEN UNTERSUCHUNGEN

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Proteomik sowie zu physiologischen Parametern durchgeführt. Die physiologischen Parameter setzten sich aus Untersuchungen zur Gesamtprotein-, Chlorophyll a-, Kohlenstoff- und Stickstoff-Konzentration sowie zur Biomasse zusammen. Darüber hinaus wurden Daten zur Bestandesentwicklung erhoben, die sich aus der phänologischen Pflanzenentwicklung und der Bestimmung der Deckungsgrade während der Vegetationsperiode zusammensetzen. Die Methodik dieser Untersuchungen wird in den Kapiteln 2.3 bis 2.5 beschrieben. Eine Auflistung der hierzu verwendeten Materialien befindet sich im Anhang (Kap. 10). Die Tabelle 2.3 zeigt eine Übersicht der untersuchten Parameter in den Untersuchungsjahren 2003 und 2004.

Tab. 2.3: Übersicht der untersuchten Parameter während des Untersuchungszeitraums (X = Untersuchungen im Jahr 2004, x = Untersuchungen in den Jahren 2003 und 2004, PM = Proteinmuster, ID = Identifizierung ausgewählter Peaks, GP = Gesamtprotein, CHL a = Chlorophyll a, C/N = Gesamt C und N, BM = Biomasse, ENT = phänologische Entwicklung, DE = Deckungsgrade)

	Proteomik		Physiologie				Bestandes - entwicklung	
	PM	ID	GP	CHL a	C / N	BM	ENT	DE
<i>Triticum aestivum</i>	X	X	X	X	X	X	x	x
<i>Sinapis arvensis</i>	X	X	X	X	X	X	x	x
andere Wildkräuter							x	x

In beiden Jahren wurde die Pflanzengemeinschaft hinsichtlich ihrer Bestandesentwicklung untersucht. Die Ergebnisse des ersten Untersuchungsjahres lieferten Indizien für Veränderungen auf biochemischer Ebene, so dass im zweiten Untersuchungsjahr zusätzliche Analysen durchgeführt wurden. Alle Untersuchungen fanden auf den Flächen mit CO₂-Begasung (*FACE*) und den Flächen mit Versuchsaufbauten und ohne CO₂-Begasung (*Ambient*) statt. Die *Ambient*-Behandlung diente als Kontrollfläche in dieser Untersuchung.

Zur Bestimmung einiger Parameter, etwa bei Analysen des Proteoms, war es notwendig, während der Vegetationsperiode Pflanzenmaterial zu ernten.

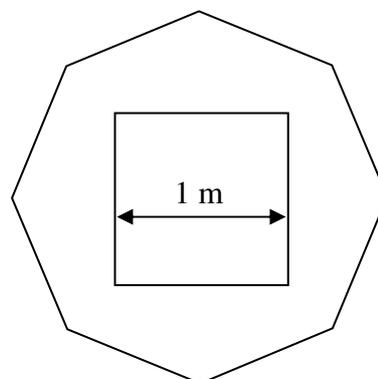


Abb. 2.5: Räumliche Unterteilung der Plotfläche

Zur Beobachtung der Bestandesentwicklung war es allerdings von großer Wichtigkeit, dass die natürliche Beschaffenheit des Pflanzenbestandes erhalten wurde. Dies galt insbesondere für die Bestimmung der Deckungsgrade. Um eine optimale Datenaufnahme für beide Arten von Untersuchungen zu ermöglichen, wurde die Fläche jedes Plots räumlich aufgeteilt. Der innere Quadratmeter wurde für die nicht-destruktiven Untersuchungen der Bestandesentwicklung und der Chlorophyll a-Konzentration genutzt, während die destruktiven Zwischenernten außerhalb dieses Quadratmeters stattfanden (siehe Abb. 2.5).

2.2.1 Zeitplan der Untersuchungen

Die Zwischenernten von Sommerweizen (*Triticum aestivum* L. cv. Triso) und Ackersenf (*Sinapis arvensis* L.) wurden an mehreren Zeitpunkten während der Vegetationsperiode 2004 durchgeführt. Diese dienten zur späteren Analyse des Pflanzenmaterials hinsichtlich des Proteoms (P) sowie der physiologischen Parameter Gesamtproteinkonzentration (GP), Kohlenstoff- und Stickstoff-Konzentration (C/N) und Biomasse (BM).

Der Sommerweizen wurde an fünf Terminen beerntet. Die erste Ernte fand 49 Tage nach der Aussaat (19.5.04) statt. Zu diesem Zeitpunkt war das Fahnenblatt voll entfaltet. Die darauf folgenden Ernten wurden im wöchentlichen Rhythmus zu gleicher Tageszeit durchgeführt, um diurnale Schwankungen biochemischer Parameter auszuschließen zu können (siehe Tab. 2.4). Zusätzlich zu den biochemischen Analysen wurde die relative Chlorophyll a-Konzentration des Weizens an sieben Terminen photometrisch bestimmt, d.h. die Pflanzen mussten nicht geerntet werden. Die erste Messung fand statt, als das Blatt Nr. 3 voll entwickelt war.

Tab. 2.4: Übersicht der Untersuchungen und Termine im Jahr 2004. T = *Triticum aestivum*, S = *Sinapis arvensis*, STW = *Sinapis arvensis*, *Triticum aestivum* und Wildkräuter (W)

Zwischenernte P, GP, C / N, BM			S	S			T	T	T	T	T		
Chlorophyll a - Messung		S	S	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST		
Phänologische Entwicklung		STW	STW	STW	STW	STW	STW	STW	STW	STW	STW	STW	
Deckungsgrade				STW		STW		STW		STW			
Woche	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
		Mai 04				Juni 04				Juli 04			

Der Ackersenf (*Sinapis arvensis*) wurde an zwei Terminen geerntet. Die erste Beprobung fand statt, als die Pflanzen zu 50 % entwickelt waren (19.5.04), und die zweite, als die Pflanzen voll entwickelt waren (27.5.04). Die relative Chlorophyll a-Konzentration des Ackersenfs

wurde an neun Terminen bestimmt. Die erste Messung dieses Parameters fand statt, als das Blatt Nr. 3 des Ackersensfs voll entwickelt war. Die phänologische Entwicklung aller Pflanzen wurde in beiden Untersuchungsjahren wöchentlich, die Deckungsgrade wurden zweiwöchentlich bestimmt (siehe Tab. 2.4).

2.2.2 Schema der Zwischenernten

Zur Analyse einiger Parameter in Sommerweizen (*Triticum aestivum*) wurden fünf Zwischenernten durchgeführt. Das Pflanzenmaterial des Ackersensfs (*Sinapis arvensis*) wurde an zwei Zwischenernteterminen durchgeführt. Die Ernten des Ackersensfs werden im folgenden Verlauf mit Buchstaben gekennzeichnet, die von *Triticum aestivum* mit Zahlen. Eine Übersicht der Zwischenernten zeigt Tabelle 2.5.

Tab. 2.5: Übersicht der Zwischenernten von *Sinapis arvensis* und *Triticum aestivum* im Jahr 2004 (TNA = Tage nach der Aussaat)

Art	Datum	TNA	Entwicklungsstadium
<i>Sinapis arvensis</i>	19.05.04	49	50% entwickelt
<i>Sinapis arvensis</i>	27.05.04	57	voll entwickelt
<i>Triticum aestivum</i>	17.06.04	78	voll entwickelt
<i>Triticum aestivum</i>	25.06.04	86	Blüte
<i>Triticum aestivum</i>	01.07.04	92	Fruchtentwicklung
<i>Triticum aestivum</i>	08.07.04	99	Milchreife
<i>Triticum aestivum</i>	15.07.04	106	späte Milchreife

Pro Plot wurden fünf Pflanzen von *Triticum aestivum* geerntet. Hierbei wurde die gesamte Pflanze abgeschnitten und in Haupttrieb und Nebetrieb getrennt. Im besonderen Fokus der Untersuchungen stand der Haupttrieb des Sommerweizens, der in die vier Fraktionen Fahnenblatt (FB), Blatt 7 (B7), Blatt 6 (B6) und Körner (Kö) unterteilt wurde (siehe Abb. 2.5). Die jeweiligen Blätter bzw. Körner der fünf Pflanzen wurden zu einer Mischprobe vereint. Um Veränderungen des Pflanzenmaterials zwischen Ernte und Aufbereitung zu verhindern, wurde das Blattmaterial unmittelbar nach der Zwischenernte in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -86 °C aufbewahrt. Der Stängel des Haupttriebes sowie die Nebentriebe der Pflanzen wurden in Tüten verpackt und bei 60 °C getrocknet.

Die Gesamtbio­masse der Pflanzen wurde mittels einer speziell entwickelten Erntemethodik bestimmt (siehe Kap. 2.4.4). Zusätzlich dazu wurden die jüngsten voll entwickelten Blätter von *Sinapis arvensis* geerntet. Insgesamt wurden pro Plot fünf Pflanzen je Art geerntet und die jeweiligen Blätter bzw. Körner dieser Pflanzen zu einer Mischprobe vereint. Das Pflanzenmaterial wurde direkt vor Ort schockgefroren. An einigen Untersuchungsterminen konnte nicht genügend Pflanzenmaterial von *Triticum aestivum* zur Analyse aller biochemischer Parameter geerntet werden, so dass das Untersuchungsprogramm eingeengt wurde. So lieferten zum Beispiel die Körner von Sommerweizen nur an den letzten beiden Ernteterminen genügend Material zur Analyse aller Parameter. Am 1.7.04 wurde die Kohlenstoff- und Stickstoff-Konzentration der Körner bestimmt, während auf die Analyse des Proteoms sowie der Konzentration an löslichem Protein verzichtet werden musste. Die Fahnenblätter lieferten an den ersten vier Zwischenernten ausreichend Material zur Durchführung aller Analysen, am letzten Erntetermin konnten jedoch die C/N-Konzentrationen nicht bestimmt werden. Das Untersuchungsprogramm wurde bei Blatt 6 nur am ersten Untersuchungstermin eingeengt, an diesem Termin wurde auf die Analyse der Proteoms und der Konzentration an löslichem Protein verzichtet (siehe Tab. 2.6).

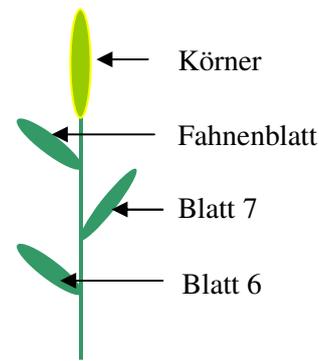


Abb. 2.6: Unterteilung der Hauptähre in vier Fraktionen

Tab. 2.6: Beprobte Pflanzenteile von *Triticum aestivum* im Jahr 2004 und gemessene Parameter (P = Proteomik, GP = Konzentration an löslichem Protein, C+N = Kohlenstoff- und Stickstoff-Konzentration)

	17.06.2004	25.06.2004	01.07.2004	08.07.2004	15.07.2004
Körner				P	P
				GP	GP
			C+N	C+N	C+N
Fahnenblatt	P	P	P	P	P
	GP	GP	GP	GP	GP
	C+N	C+N	C+N	C+N	
Blatt 7	P	P	P	P	
	GP	GP	GP	GP	
	C+N	C+N	C+N	C+N	
Blatt 6		P			
		GP			
	C+N	C+N			

2.2.3 Erfassung der Chlorophyll a-Konzentration und der Bestandesentwicklung

Zur Bestimmung der relativen Chlorophyll a-Konzentration wurde kein Pflanzenmaterial entnommen, da diese Messung photometrisch an der lebenden Pflanze durchgeführt wurde. Dazu wurden im inneren Quadratmeter jedes Plots (siehe Abb. 2.5) zehn Sommerweizenpflanzen markiert. Die relative Chlorophyll a-Konzentration wurde an den Blättern Nr. 3, 5, 7 und dem Fahnenblatt des Haupttriebes von Sommerweizen bestimmt. An den Blättern Nr. 3, 5, 7 und dem jüngsten voll entwickelten Blatt des Ackersenfes wurde die relative Chlorophyll a-Konzentration an fünf markierten Pflanzen pro Plot bestimmt. Die Messmethodik wird in Kap. 2.4.3 beschrieben.

In beiden Untersuchungsjahren wurden die vegetativen und generativen Entwicklungsstadien aller Pflanzenarten erfasst. Die phänologischen Erhebungen der Kulturart Sommerweizen und der Wildkräuter wurden mittels unterschiedlicher Schlüssel durchgeführt. Zur Untersuchung des Sommerweizens wurde der speziell für Getreide entwickelte Boniturschlüssel nach TOTTMANN & BROAD (1987) verwendet. Dazu wurden 10 Sommerweizenpflanzen pro Plot markiert und wöchentlich untersucht (siehe Abb. 2.7).

Die Entwicklung der Wildkräuter wurde mit Hilfe des Schlüssels nach DIERSCHKE (1972) dokumentiert. Aufgrund des großen Datenaufwandes wurde je Wildkrautart ein Mittelwert pro Fläche gebildet. Eine detaillierte Beschreibung der Methoden wird in Kapitel 2.5.1 gegeben.

Die Deckung des Pflanzenbestandes wurde zweiwöchentlich mittels der Quadratmethode (siehe Kap. 2.5.2) bestimmt. Hierbei wurde ein Metallrahmen verwendet, der den inneren Quadratmeter jeder Plotfläche abdeckte und in 25 Kleinquadrate unterteilte. Die Gesamtdeckung und die Deckung jeder einzelnen Pflanzenart wurden in jedem dieser Kleinquadrate visuell geschätzt. Diese Untersuchungen fanden im Jahr 2003 und 2004 zweiwöchentlich statt.



Abb. 2.7: Markierung einer Weizenpflanze

2.3 PROTEOMIK

Die proteomischen Untersuchungen unterteilten sich in zwei Teilbereiche. Ein großer Bereich war die Erstellung der Proteinmuster inklusive der Ermittlung unterschiedlich exprimierter Proteine bzw. Peptide (siehe Kap.2.3.1). Die Proteinmuster wurden mittels SELDI-TOF-MS (PCS 4000 TOF-MS Personal, Ciphergen) bestimmt und lieferten Aussagen zur Größe eines vorhandenen Proteins oder Peptids (Peaks) und zur relativen Menge (Intensität). Mittels einer integrierten Software wurden die Spektren zweier Gruppen, in diesem Fall der *Ambient*- und *FACE*-Behandlung, miteinander verglichen und Unterschiede in der Intensität der Signale ermittelt. Die Masse und Intensität eines Proteins bzw. Peptides liefern allerdings keine hinreichenden Informationen über dessen Identität. Aus diesem Grund wurden die in den Behandlungen *FACE* und *Ambient* unterschiedlichen Peaks mit einer weiterführenden Methodik identifiziert (siehe Kap. 2.3.2). Diese Identifizierung der Proteine stellt den zweiten Teilbereich der Untersuchungen dar.

2.3.1 Bestimmung der Proteinmuster mittels SELDI-TOF-MS

Die Proteinmuster der Blätter und Körner von Sommerweizen sowie der Blätter von Ackersef wurden mittels eines ProteinChip-Systems (Ciphergen) erstellt (siehe Abb. 2.8). Diese Methode beruht auf der SELDI-TOF-MS (*Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry*)-Technologie.

Die SELDI-TOF-MS-Technik wird unter anderem dazu benutzt, große Teile von Proteomen zu erfassen. Diese Technik verbindet Proteinchip Arrays mit einem Massenspektrometer. Hierbei werden die Proteine an eine spezifische Oberfläche gebunden und mittels eines Flugzeitanalysators (TOF) analysiert.

Ein Proteinchip ist mit acht identischen chemisch aktiven Oberflächen (*Spots*) bestückt. Man unterscheidet zwei Gruppen von Oberflächen, chemische und biologische Oberflächen. Zu den chemischen Oberflächen zählen Proteinchips mit hydrophiler, hydrophober Anionenaustauscher- und Kationenaustauscher-Oberfläche. Proteinchips mit Metallbindender Oberfläche zählen auch zu dieser Gruppe. Die Chips mit chemischer Oberfläche werden zur Analyse von Proteinmustern bzw. Proteinexpressionsmustern benutzt, da ein relativ breites Spektrum an Proteinen untersucht werden kann.

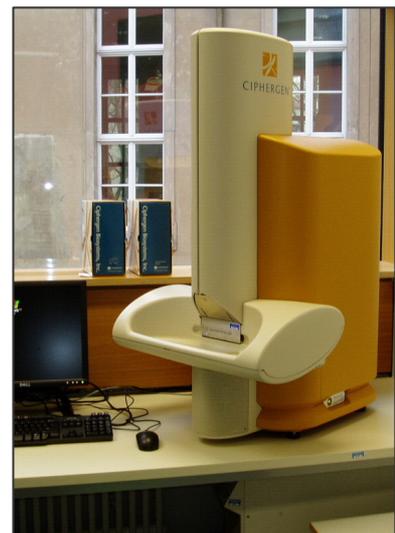


Abb. 2.8: SELDI-TOF-MS ProteinChip System

Biologische Chipoberflächen mit Bindemolekülen wie DNA, RNA oder Proteinen werden für Protein-Interaktionsstudien eingesetzt, diese Oberflächen binden folglich sehr speziell (siehe Abb. 2.9).

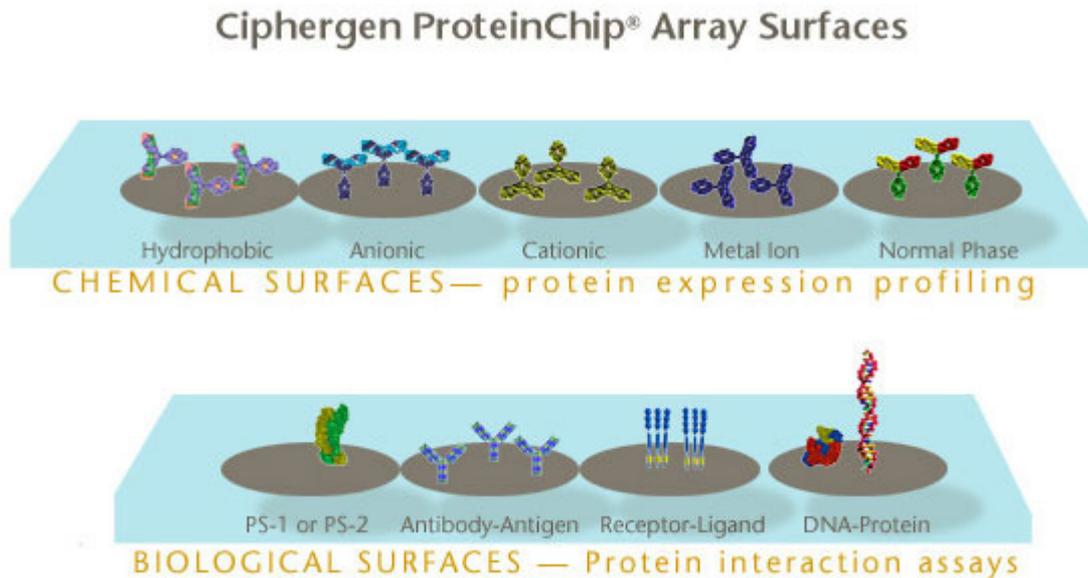


Abb. 2.9: Bindeoberflächen für *ProteinChip Arrays*. Es wird zwischen chemischen und biologischen Oberflächen unterschieden. Chemische Oberflächen dienen zur Analyse komplexer Gemische. An biologische Oberflächen sind spezielle Moleküle (z. Bsp. Proteine, DNA, Antikörper) gebunden. Mit Hilfe dieser Chipoberflächen werden Protein-Interaktionsstudien durchgeführt (www.ciphergen.com).

Pro *Spot* wird eine Probe aufgetragen und entsprechende Proteine bzw. Peptide werden auf Grund ihrer Charakteristika (z. Bsp. pI-Wert) spezifisch gebunden. Unspezifisch gebundene Proteine sowie Salze und weitere störende Detergenzien werden in mehreren Waschschrritten entfernt. Die gebundenen Proteine und Peptide werden mit Matrix (z. Bsp. Sinapinsäure) überschichtet, wodurch diese in Kristallen gebunden werden. Die sauren Matrix-Moleküle übertragen nun Protonen auf die Proteine bzw. Peptide. Anschließend werden die positiv geladenen Biomoleküle unter Hochvakuum mittels eines Lasers aus dem Matrix/Protein-Mischkristall in die ionische Phase überführt. Die Protein- und Peptid-Ionen gehen in die Gasphase über und werden mittels eines elektrischen Feldes beschleunigt. Die Ionen erhalten eine Geschwindigkeit, die proportional zu eins durch die Wurzel aus dem Quotienten Masse und Ladung ist. Zwei Proteine mit gleicher Ladung, aber unterschiedlicher Masse fliegen also unterschiedlich schnell, wobei die Masse proportional zur Flugzeit ist. Die Proteinionen treten in eine feldfreie Vakuum-Flugröhre. Diese bezeichnet man als den Flugzeitanalysator oder TOF (*Time of Flight*). Die Proteine treffen am Ende der Flugröhre auf einen Detektor, wobei Proteine mit unterschiedlichen Masse/Ladungsverhältnissen auch zu unterschiedlichen Zeiten

auf den Detektor treffen. Mittels der gemessenen Flugzeiten werden die Molekulargewichte der Proteine bestimmt (siehe Abb. 2.10).

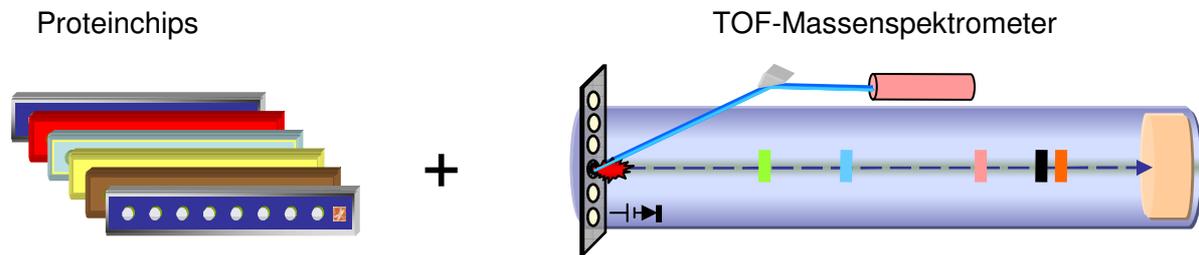


Abb. 2.10: Prinzip der SELDI-TOF-MS. Die Proteine/Peptide werden auf Proteinchip Arrays gebunden und anschließend in einem Time of Flight-Massenspektrometer analysiert. Die Biomoleküle werden auf den Chips mittels einer Matrix in Kristalle eingebettet und ionisiert. Ein Laser löst die positiv geladenen Proteine bzw. Peptide aus der Matrix. Mit Hilfe eines elektrischen Feldes „fliegen“ diese auf einen Detektor zu. Anhand der Flugzeiten werden die Molekulargewichte der Peaks bestimmt.

Zur Untersuchung des Proteinmusters in Weizen und Ackersenf wurden zwei chemische Chipoberflächen nach Voruntersuchungen ausgewählt. Es wurden Chips mit Anionenaustauscher-Oberflächen (SAX = Strong Anion Exchanger) und Kationenaustauscher-Oberflächen (WCX = Weak Cation Exchanger) verwendet. Die Chipoberflächen sind durch Merkmale wie den pI-Wert (pH-Wert, bei dem die Nettoladung der Moleküle gleich Null ist) der daran bindenden Proteine charakterisiert.

Die SAX-Proteinchips besitzen eine positiv geladene Oberfläche, so dass sie Proteine mit negativer Nettoladung binden. An diese Oberfläche binden hauptsächlich Proteine mit einem pI-Wert im sauren Bereich ($pI < 7$). Mit Hilfe eines Bindepuffers im basischen Bereich dissoziieren die Protonen von den Proteinen, diese sind demnach negativ geladen und binden an die SAX-Oberfläche (siehe Abb. 2.11 A).

Die Kationenaustauscher (WCX)-Proteinchips zeichnen sich durch eine negativ geladene Oberfläche aus, an der Proteine mit positiver Nettoladung binden. Der pI-Wert dieser Proteine liegt im basischen Bereich ($pI > 7$). Durch die Verwendung eines sauren Bindepuffers werden die Proteine protoniert, weisen folglich eine positive Ladung auf und binden an die WCX-Oberfläche (siehe Abb. 2.11 B).

So weisen Proteine bzw. Peptide, die an WCX-Oberflächen binden, einen pI-Wert auf, der im basischen Bereich liegt, wogegen Proteine, die an SAX-Oberflächen binden, einen pI-Wert aufweisen, der geringer als 7.0 ist. Diese Informationen spielen bei der späteren Identifizierung der Proteine eine wichtige Rolle.

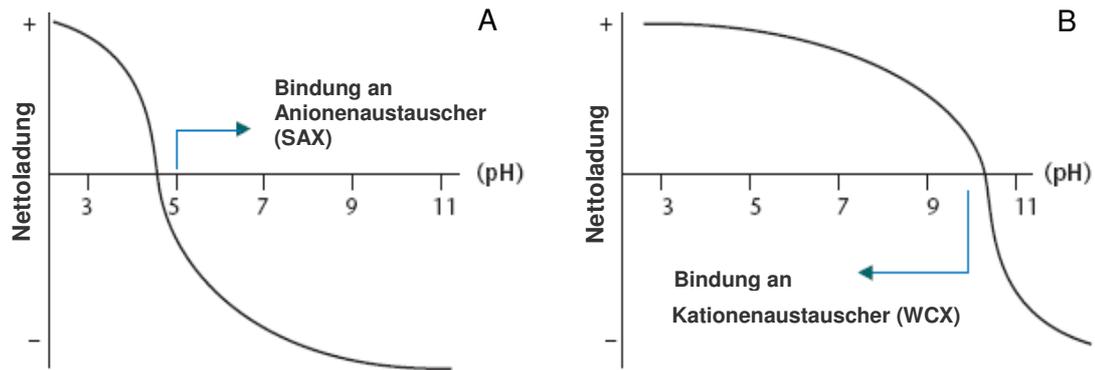


Abb. 2.11: Nettoladung von Proteinen in Abhängigkeit des pH Wertes des Bindepuffers, **A** Bindung eines sauren Proteins an die SAX-Oberfläche in Abhängigkeit des pH Wertes des Bindepuffers, **B** Bindung eines basischen Proteins an die WCX-Oberfläche in Abhängigkeit des pH Wertes des Bindepuffers (ProteinChip Application Guide, CIPHERGEN)

Um die Proteinmuster der Blätter und Körner-Proben zu bestimmen, wurden folgende Teilschritte durchgeführt. Zunächst wurde das Pflanzenmaterial in Lysepuffer aufgenommen (*Zellyse*), so dass die löslichen Proteine in Lösung gebracht wurden. Anschließend wurden die Spots der Proteinchips für die Messungen vorbereitet und mit den Proben beladen (*Vorbereitung und Beladen der Proteinchips*). Danach erfolgte die Messung der Proteinchips mittels des ProteinChip System Series 4000 (PCS 4000 TOF-MS Personal, CIPHERGEN) und eine Auswertung der Spektren mittels einer internen Software (*Messung und Auswertung der Proteinspektren*). Die Durchführung dieser Teilschritte wird im Folgenden detailliert beschrieben.

Zellyse, Vorbereitung und Beladen der Proteinchips

0,03 g gefrorenes Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und in 400 μ l Lysepuffer aufgenommen. Anschließend folgte eine 30 minütige Inkubation auf Eis, danach wurden die Proben bei 15000 rpm und 4 $^{\circ}$ C für 15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zur Analyse verwendet.

Die Spots der WCX-Chips wurden mit 5 μ l 10mM HCl für 5 Minuten in einer Kammer mit hoher Luftfeuchtigkeit (Plastikschale mit befeuchtetem Papier) inkubiert und anschließend dreimal mit 5 μ l HPLC-Wasser gewaschen. Die hohe Luftfeuchte verhinderte ein Austrocknen der aktivierten Chipoberfläche. Die folgenden Arbeitsschritte waren für beide Chipoberflächen (WCX- und SAX-Oberfläche) identisch.

Auf die Spots wurde dreimal je 5 μ l Waschpuffer pipettiert und 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Spots mit 4 μ l der verdünnten Probe (1:2 in Waschpuffer) in einer

feuchter Kammer bei Raumtemperatur für 1,5 h inkubiert. Nach Abnahme der Probenflüssigkeit wurden die Spots dreimal mit Waschpuffer und zweimal mit HPLC-Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen der Spots wurde zweimal 0,5 µl Matrix (Sinapinsäure) aufgetragen. Nach dem Eintrocknen der Matrix folgte die Messung der Proteinchips mittels SELDI-TOF-MS.

Lysepuffer:

0,1 M Na-Phosphat (pH 7,5)
5 mM EDTA
2 mM MgCl₂
3 mM β-2-Mercaptoethanol
1 % CHAPS
500 µM Leupeptin
0,1 mM PMSF

Waschpuffer für WCX-Chips

0,1 M Natrium Acetat (pH 4,5)
0,02 % Triton X-100

Waschpuffer für SAX-Chips

0,1 M Tris (pH 8,5)
0,02 % Triton X-100

Matrix

5 mg Sinapinsäure
125 µl Acetonitril
125 µl 1%-ige Trifluoressigsäure

Messung und Auswertung der Proteinspektren

Pro *Spot* wurden 53 Positionen mit Laserenergie beschossen. Zuerst wurden pro Position zwei so genannte *warming shots* durchgeführt, um die Matrix zu ionisieren. Anschließend wurde jede Position 15mal mit dem Laser bestrahlt (*data shots*), um die Proteine bzw. Peptide aus der Matrix zu lösen und in die Gasphase zu überführen. Die hierzu benötigte Laserenergie ist abhängig davon, wie groß die Biomoleküle sind, wobei die Laserenergie proportional zum Molekulargewicht (MG) ist. Um ein möglichst breites Spektrum an Proteinen zu erfassen, wurden die *Spots* mit zwei verschiedenen Laserintensitäten bestrahlt.

Für Proteine mit niedrigem MG (*lowbereich*, 2-30 kDa) wurden folgende Einstellungen gewählt: Energie für *warming shots*: 2000 nJ für WCX-Chips, 1700 nJ für SAX-Chips; Energie für *data shots*: 1500 nJ für WCX-Chips, 1200 nJ für SAX-Chips. Für Proteine mit einem größeren MG (*highbereich*, 30-300 kDa) wurde folgende Einstellungen gewählt: Energie für *warming shots*: 4000 nJ für Blatt- und Körnerproben, Energie für *datashots*: 3500 nJ für WCX- und SAX-Chips. Mittels automatisch generierter Messprogramme wurden die *Spots* gemessen und die Proteinspektren erstellt.

Die Spektren wurden mittels eines Peptidstandards (all-in-one peptide standard, Ciphergen) kalibriert. Anschließend folgte die Auswertung der Spektren mit Hilfe der Software Express Client 3.0. (Ciphergen). Die Spektren wurden zunächst normalisiert. Anschließend wurden die Peaks automatisch detektiert, wobei folgende Vorgaben eingehalten wurden: *Signal to Noise ratio: 10, valley depth: 5, Minimum peak treshold: 50% of all spectra, cluster*

mass window: 1% peak width. Darüber hinaus wurden Peaks, deren Intensität unter $1 \mu\text{A}$ lag, aus der Auswertung ausgeschlossen.

Es lagen pro Erntetermin und Art fünf Spektren je Behandlung (*FACE* und *Ambient*) vor. Die Spektren wurden hinsichtlich ihrer CO_2 -Behandlung verglichen. Hierbei wurden zunächst die Anzahl der Peaks in den beiden Behandlungen und eventuelle Veränderungen aufgrund erhöhter CO_2 -Konzentrationen ermittelt. Anschließend erfolgte ein Vergleich der Intensitäten der Signale mittels eines t-Tests (siehe Kap. 2.6). Die Signale, die nur in einer Behandlung auftraten oder signifikante Unterschiede in den Intensitäten zwischen den Behandlungen aufzeigten, wurden zur Identifizierung ausgewählt.

2.3.2 Identifizierung ausgewählter Peaks

Die Identifizierung eines Proteins setzt sich aus mehreren Schritten zusammen. Zuerst wird das Probenmaterial in einem Lysepuffer aufgenommen. Eine detaillierte Beschreibung der Zelllyse befindet sich in Kapitel 2.3.1.1. Anschließend muss das Protein separiert und aufkonzentriert werden. In dieser Arbeit wurde dies mittels zweier unterschiedlicher Methoden durchgeführt, um ein möglichst breites Spektrum an Proteinen zu identifizieren. Zum einen wurden die Proteine mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (2 DE) aufkonzentriert und getrennt. Die zweite Methode beinhaltete eine chromatographische Fraktionierung mit anschließender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) (siehe Abb. 2.12, Schritt 2a und b).

Nach der Separation und Aufkonzentrierung des Proteins wird dieses tryptisch verdaut und die Molekulargrößen der entstandenen Fragmente werden mittels eines Massenspektrometers bestimmt (siehe Abb. 2.12, Schritt 3 + 4). Anhand dieser Molekulargewichte wird das Protein über Vergleiche in Internetdatenbanken identifiziert (Peptide Mass Finger Printing).

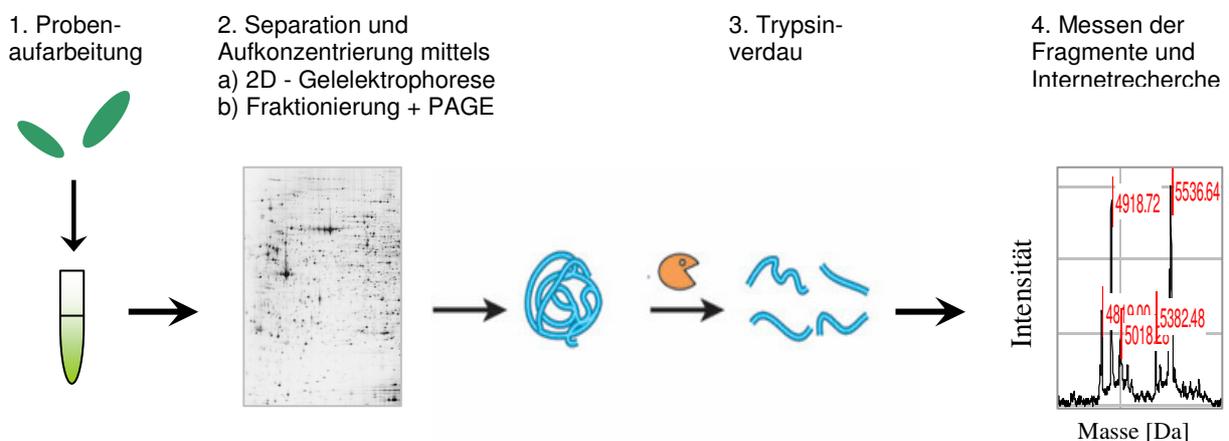


Abb. 2.12 : Ablauf der Identifizierung eines Proteins.

Separation der Proteine mittels Zweidimensionaler Gelelektrophorese (2DE)

Die Proteine wurden mittels dieser Methode in zwei Dimensionen aufgetrennt. In der ersten Dimension wurden die Proteine mittels Isoelektrischer Fokussierung (IEF) nach ihrem pI-Wert und in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht getrennt.

Zur Probenvorbereitung wurde das Lysat im Verhältnis 1:2 mit Fällungspuffer für 30 Minuten bei -20 °C, danach zwei Stunden auf Eis inkubiert. Die Proben wurden bei 4 °C für 15 Minuten bei 10000 rpm abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde zweimal mit 80%igem Aceton gewaschen, anschließend in 125 µl Rehydrierungspuffer wieder aufgenommen und über Nacht bei 4 °C inkubiert, wobei die Proteine rehydriert wurden. Die IPG Gel Strips wurden über Nacht mit den rehydrierten Proteinen inkubiert und anschließend in der ersten Dimension isoelektrisch aufgetrennt. Das hierfür verwendete Programm bestand für ein 11 cm IPG Gel Strip aus 1 min, 200 V, 1 h Erhöhen der Spannung auf 3500 V, 6 h, 3500 V, 1 min Verringern der Spannung auf 500 V und 1 h 500 V. Die Stromstärke und die Leistung waren jeweils konstant bei 2 mA bzw. 5 W.

Nach Beendigung des Programms wurden die IPG Gel Strips zur Vorbereitung auf die zweite Dimension zuerst mit 10ml Equilibrierungspuffer (versetzt mit 100 mg DTT) für 15 Minuten inkubiert. Dieser Vorgang wurde mit 10ml Equilibrierungspuffer (versetzt mit 250 mg Iod-acetamid) wiederholt.

Ein SDS-Polyacrylamidgel wurde mit dem IPG Gel Strip beladen und mit einem 2%-igem Agarosegel bedeckt. Die Versuchsbedingungen der Elektrophorese in Laemmli-Puffer betragen 200 V bei 0,8 h Zur späteren Molekulargewichtsbestimmung dienten die Marker *Mark12 Unstained Standard* (Invitrogen) und *BenchMark Prestained Protein Ladder* (Invitrogen). Die Gele wurden mittels der Coomassie-Brilliant Blue Färbung angefärbt (s.u.).

Fällungspuffer

20 % TFA
50 % Aceton
0,1 M DTT

Equilibrierungspuffer

30 % Glycerol
0,1 % (w/v) SDS
50 mM Tris
6 M Urea

Rehydrierungspuffer

2 % (v/v) IPG Puffer
0,5 % CHAPS
0,2 % DTT
8 M Urea
0,002 % Bromphenolblau

Separation der Proteine mittels Fraktionierung und anschließende PAGE

Die Fraktionierung mittels *Reverse Phase Chromatographic Beads* wurde in dieser Untersuchung zur Aufkonzentrierung und Fraktionierung der Proteine im Lysepuffer verwendet. Die anschließende eindimensionale Gelelektrophorese (PAGE) diente zur Separation der Proteine.

Reverse Phase Chromatographic Beads (Chromatographie-Matrix) besitzen die Eigenschaft, einen großen Teil der löslichen Proteine zu binden. Diese Proteine werden dann stufenweise mittels eines ansteigenden Acetonitril-Gradienten von der Matrix gelöst. Da Proteine aufgrund ihrer verschiedenen Bindeeigenschaften in unterschiedlichen Fraktionen in Lösung gehen, bewirkt diese Methode eine Separation und Aufkonzentrierung des Proteingemisches.

Zuerst musste die Matrix vorbehandelt werden. Hierzu wurden ca. 30 µl Matrix mit 30 µl 50% ACN, 0,1% TFA versetzt und für 30 Minuten inkubiert. Die Probenlösung wurde im Verhältnis 1:2 in 10% ACN 0,1% TFA gelöst und auf die Matrix gegeben. Ein Großteil der Proteine haftete an der Matrix, ein Teil blieb jedoch in Lösung. Das Gemisch wurde für 30 Minuten geschüttelt, danach wurde der Überstand abgenommen, der die erste Fraktion bildete. Die noch an der Matrix gebundenen Proteine wurden mit zunehmenden Konzentrationen an Acetonitril (30-70%, 100%), 0,1% TFA gelöst. Insgesamt ergaben sich sieben lösliche Fraktionen.

Ein Teil jeder Fraktion wurde nach dem *NP20 ProteinChip Array Protokoll* (Ciphergen) auf NP20-Chips gemessen. Dadurch konnten die Intensitäten der zur Identifizierung ausgewählten Peaks in den Fraktionen bestimmt werden. Die Fraktionen mit den höchsten Konzentrationen der ausgewählten Signale wurden zur eindimensionalen Gelelektrophorese verwendet.

Durch elektrophoretische Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen ist es möglich, Proteine ihrer Größe nach im SDS-Polyacrylamidgel zu trennen. Das Verfahren wurde mit dem Ready Gel System (Bio Rad) und dem von LAEMMLI (1970) beschriebenen Puffersystem durchgeführt. Um die Proteine negativ zu laden, wurde den Lysaten im 4:1-Verhältnis 4*SDS-Auftragspuffer (Laemmli) zugesetzt. Anschließend wurden die Lysate für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert und auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 90 min bei 25 mA in 1*Laemmli-Laufpuffer. Zur späteren Molekulargewichtsbestimmung diente eine *prestained* kDa-Leiter (Invitrogen, Karlsbad).

4 * SDS-Auftragspuffer (Laemmli)
 40 mM Tris/HCl pH 6.75
 4 % SDS
 10 % 2-β-Mercaptoethanol
 40 % Glycerin
 0,002 % Bromphenolblau

1 * Laemmli-Laufpuffer
 25 mM Tris/HCl pH 8.3
 193 mM Glycin
 0,1 % SDS

Die folgenden Methoden wurden für die Gele aus beiden Separationsmethoden (2D-Elektrophorese und Fraktionierung mit anschließender PAGE) angewandt. Die Gele wurden zunächst angefärbt (siehe *Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung*). Nach der Färbung der Proteinbanden wurden diese ausgeschnitten und für den Verdau mittels Trypsin vorbereitet (siehe *Ausstechen der Banden und Vorbereitung der Gelstücke*). Die Massen der Verdaufragmente wurden mittels SELDI-TOF-MS bestimmt und zur Identifizierung der Proteine in Internetdatenbanken verwendet (siehe *Tryptischer In-Gel Verdau und Messung der Verdaufragmente*).

Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung

Die Färbereagenz Coomassie-Brilliant-Blue ermöglicht es, Proteine im Polyacrylamidgel zu detektieren. Die Gele sowohl der PAGE als auch der 2D-Elektrophorese wurden über Nacht in der Färbelösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Gele mit Wasser gewaschen und für 3 h mit Entfärbelösung versetzt. Zur weiteren Entfärbung wurden die Gele in Wasser geschüttelt bis sich Proteinbanden und Hintergrund klar trennen ließen.

Färbelösung
 0,02 % Coomassie-Brilliant-Blue G-250
 5% Aluminiumsulfat
 2% Phosphorsäure
 10% Ethanol
 in Wasser

Entfärbelösung
 10% Ethanol
 2% Phosphorsäure
 in Wasser

Ausstechen der Banden und Vorbereitung der Gelstücke

Durch die Kenntnis der Eigenschaften der benutzten *ProteinChip*[®] Arrays, mit denen interessierende Signale detektiert wurden, konnten die Banden in den gesuchten Größen- und pI-Bereichen manuell ausgestochen und mittels Trypsin im Gel verdaut werden (tryptischer In-Gel Verdau). Zuerst müssen die Gelstücke auf den tryptischen In-Gel Verdau vorbereitet werden, da im Gelstück vorhandene Reagenzien wie Coomassie Blue und SDS den Verdau stören können.

Das Entfärben des Gelstücks, das Entfernen von SDS und das Trocknen der Gelstücke in einer Vakuumzentrifuge wurden nach der Methode des *ProteinChip[®] Peptide Mapping Kits* von Ciphergen durchgeführt.

Tryptischer In-Gel Verdau und Messung der Verdaufragmente

Die vorbereiteten Gelstücke wurden in 10 µl Trypsinlösung (10 ng/µl in 25mM Ammoniumbicarbonat) rehydriert, nach 30 Minuten mit 10 µl 25mM Ammoniumbicarbonat überschichtet und anschließend über Nacht inkubiert.

Die verdauten Fragmente wurden auf einem NP20 Chip im SELDI-TOF-MS gemessen. Die Massen der Verdaufragmente dienten als Grundlage zur Identifizierung der Proteine in Internetdatenbanken (*Peptide Mass Fingerprinting*).

Weitere Bearbeitungen der Proben erfolgten wieder entsprechend dem *ProteinChip[®] Peptide Mapping Kit* von Ciphergen auf einem NP20-Proteinchip und dem SELDI-TOF-MS. Die anschließende Datenverarbeitung und Auswertung erfolgte mit dem ExPASy Proteinidentifikationsprogramm (http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe).

2.4 PHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

Zur Beantwortung physiologischer Fragestellungen wurden Untersuchungen zur Gesamtprotein-, Kohlenstoff- und Stickstoff-Konzentration durchgeführt. Darüber hinaus wurde die relative Chlorophyll a-Konzentration sowie die Biomasse bestimmt. In den folgenden Kapiteln 2.4.1 bis 2.4.4 werden die Untersuchungsmethoden vorgestellt.

2.4.1 Bestimmung der Gesamtkonzentration an löslichem Protein

Die Bestimmung der Gesamtkonzentration an löslichem Protein wurde mittels einer photometrischen Methode nach BRADFORD (1976) durchgeführt. Bei dieser Messung kommt es durch die Bindung löslicher Proteine an den Farbstoff Coomassie-Brilliant Blue zu einem Farbumschlag der Lösung von braun nach blau. Die Stärke des Farbumschlags ist proportional zur Menge an löslichem Protein und wird im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt.

Die Messung der Proben wurde nach dem *96 Well Plate Assay* Protokoll (Sigma) durchgeführt. Eine aus einer geeichten Proteinlösung hergestellte Eichkurve diente zur Berechnung der Proteinkonzentration der Proben.

2.4.2 Bestimmung der Gesamtstickstoff- und Gesamtkohlenstoff-Konzentration

Die Blätter- und Körnerproben wurden mittels einer Gefriertrocknungsanlage (Alpha 1-4, Christ) gefriergetrocknet und anschließend mit einer Kugelmühle gemahlen. Je 1,5-2,0 mg der getrockneten Proben wurden in Zinnkappen eingewogen, luftfrei verschlossen und bei ca. 1150°C unter Sauerstoff-Überschuss verbrannt. Die Kohlenstoff- und Stickstoff-Konzentrationen wurden mittels eines CHN-Euro EA-Elementaranalysators (Eurovector, Instruments & Software) bestimmt, der zur vollautomatischen Quantifizierung der Elemente Kohlenstoff und Stickstoff konzipiert ist.

2.4.3 Relative Chlorophyll a-Konzentration

Die relative Chlorophyll a-Konzentration wurde mit Hilfe einer photometrischen Methode bestimmt. Hierzu wurde ein transportables Chlorophyllmessgerät (SPAD- Meter 502, Minolta Co., Japan) verwendet. Das Blatt wird zerstörungsfrei in eine Messkammer gespannt und mit Rotlicht ($\lambda = 650$ nm) und Infrarotlicht ($\lambda = 940$ nm) bestrahlt. Die Absorption durch Chlorophyll a ist bei Rotlicht hoch und bei Infrarotlicht gering. Das Licht strahlt durch das Blatt hindurch auf einen gegenüberliegenden Photodetektor, der die ankommende Reststrahlung misst, sie in elektrische Signale umwandelt und als SPAD-Werte anzeigt. Die Kalibrierung

des Gerätes erfolgte bei geschlossener Messkammer. Pro Blatt wurden fünf Messungen durchgeführt und der Mittelwert wurde berechnet.

2.4.4 Oberirdische Biomasse der Einzelpflanzen

Nach der Ernte der Pflanzen an den fünf Ernteterminen (siehe Kap. 2.2) wurde die oberirdische Biomasse der Sommerweizenpflanzen bestimmt.

Aufgrund der Fragestellungen dieser Arbeit war die Bestimmung der oberirdischen Biomasse mit der konventionellen Methodik, nämlich dem Wiegen des getrockneten Erntematerials, nicht möglich. Die Notwendigkeit des Erhaltes unverfälschter Daten für die Proteinanalytik erforderte es, eine differenzierte Erntemethodik zu entwickeln.

Das Pflanzenmaterial jeder Ernte wurde in zwei Fraktionen aufgeteilt, Fraktion A für biochemische Analysen und Fraktion B zur Bestimmung der oberirdischen Gesamtbiomasse. Das für die biochemischen Analysen notwendige Pflanzenmaterial (Fraktion A) wurde unmittelbar nach den Zwischenernten schockgefroren, um den biochemischen Momentzustand der Pflanzen zu erhalten. Diese Proben wurden im frischen, tief gefrorenen Zustand gewogen. Hiervon waren das Fahnenblatt, Blatt 7, Blatt 6 und die Ähre des Haupttriebes betroffen.

Die restlichen Pflanzenteile, die Nebentriebe und der Stängel des Haupttriebes mitsamt den restlichen Blättern wurden geerntet und bei 60 °C getrocknet. Anschließend wurde die Trockenmasse dieser Pflanzenteile bestimmt. Zur Rückberechnung der Trocken- auf die Frischgewichte wurden 60 tief gefrorene Proben gewogen und anschließend getrocknet. Aus diesen Daten wurde ein organspezifischer Korrelationsfaktor berechnet, der zur Umrechnung der Daten eingesetzt wurde.

2.5 METHODEN ZUR ERFASSUNG DER BESTANDESENTWICKLUNG

Die synökologischen Erhebungen wurden während der gesamten Vegetationsperiode 2003 und 2004 durchgeführt. Sie setzen sich aus den Untersuchungen zur phänologischen Entwicklung sowie der Bestimmung der Deckungsgrade zusammen. Die Methodik dieser Untersuchungen wird in den beiden folgenden Kapiteln 2.5.1 und 2.5.2 erläutert.

2.5.1 Phänologische Untersuchungen

Während der Vegetationsperiode wurden Untersuchungen zum Entwicklungszustand aller Pflanzenarten durchgeführt. Dazu wurden zwei verschiedene Untersuchungsmethoden angewandt. Die phänologische Entwicklung der Kulturarten Winter- und Sommerweizen wurde mit Hilfe des Boniturschlüssels nach TOTTMANN & BROAD (1987) bestimmt. Dieser speziell an die Entwicklung von Getreide angepasste Schlüssel beschreibt verschiedene phänologische Stadien des Getreides (Keimung, Blattentwicklung, Bestockung, Schossen usw.). Er ist ein zuverlässiges Hilfsmittel, um die Weizenentwicklung sehr genau zu dokumentieren. Zur Erfassung der Entwicklungsstadien der Wildkräuter wurde der Schlüssel von DIERSCHKE (1972) verwendet, der die vegetative und generative Entwicklung in 12 Phasen unterteilt (siehe Tab. 2.7).

Tab. 2.7: Aufnahmeschlüssel nach DIERSCHKE (für Kräuter gelten nicht- eingeklammerten Definitionen, für Gräser die Definitionen in Klammern)

Code	Vegetative Entwicklung	Code	Generative Entwicklung
0	ohne neue oberirdische Triebe	0	ohne Blütenknospen (ohne erkennbaren Blütenstand)
1	neue Triebe ohne entfaltete Blätter	1	Blütenknospen erkennbar (Blütenstand erkennbar, eingeschlossen)
2	erstes Blatt entfaltet / bis 25 % entwickelt	2	Blütenknospen stark geschwollen (Blütenstand sichtbar, nicht entfaltet)
3	2 - 3 Blätter entfaltet / bis 50 % entwickelt	3	kurz vor der Blüte (Blütenstand entfaltet)
4	mehrere Blätter entfaltet / bis 75 % entw. (beginnende Halmentwicklung)	4	beginnende Blüte (erste Blüten stäubend)
5	fast alle Blätter entfaltet / fast voll entw. (Halme teilweise ausgebildet)	5	bis 25 % erblüht (bis 25 % stäubend)
6	voll entwickelt	6	bis 50 % erblüht (stäubend)
7	Vergilbung bis 5 %	7	Vollblüte
8	Vergilbung von 25 – 50 %	8	abblühend
9	Vergilbung von 50 – 75 %	9	völlig verblüht
10	oberirdisch abgestorben	10	fruchtend
11	oberirdisch verschwunden	11	Ausstreuen der Samen / Abwerfen der Früchte

2.5.2 Bestimmung der Deckungsgrade

Die Deckung des Bestandes wurde visuell bestimmt. Für diesen Zweck wurde ein Metallrahmen (1 m * 1 m) verwendet, der in 25 Kleinquadrate mit je einer Fläche von 400 cm² unterteilt war (siehe Abb. 2.13).

Innerhalb jedes Kleinquadrates wurde die Deckung jeder Pflanzenart in 10%-Schritten bestimmt. Zusätzlich dazu wurde die Gesamtdeckung des Bestandes in jedem Quadrat erfasst. Da sich in der Mitte jedes Plots eine Kontrolleinrichtung zur Überwachung der aktuellen CO₂-Konzentration befand (siehe Kap. 2.1.3), wurde das zentrale Quadrat bei der Erhebung der Daten nicht berücksichtigt, so dass die Daten von 24 Kleinquadraten pro Plot in die Auswertungen einfließen. Zur Berechnung der Deckung einer Pflanzenart bzw. Gesamtdeckung pro Plot wurden die Werte aus 24 Quadraten gemittelt. Diese Mittelwerte wurden zur statistischen Analyse verwendet.



Abb. 2.13: Metallrahmen zur Schätzung der Deckungsgrade

2.6 STATISTISCHE METHODEN

Die statistische Auswertung der Proteinpuster erfolgte mit Hilfe des Programms *Ciphergen Express Client 3.0*, wobei zur Untersuchung signifikanter Effekte der Man Whitney U-Test diente.

Für die Wirkungsparameter zur Untersuchung der Bestandesentwicklung wurden statistische Verfahren mit Hilfe von SPSS Version 10.0 (*SPSS Inc., Chicago, USA*) durchgeführt. Die Homogenität der Daten wurde mit Hilfe des Levene-Tests überprüft. Falls nötig wurden die Daten transformiert ($\log(x+1)$, $\ln(x)$).

Die Auswertung der physiologischen Parameter wurden mittels STATISTICA 6.0 für Windows (STATSOFT, Tulsa, USA) am Institut für Spezielle Zoologie und Tierökologie der Universität Gießen Regressionsanalysen (General Regression Model = GRM) durchgeführt. Als signifikant wurden p-Werte $< 0,05$ betrachtet. Da das GRM eine Normalverteilung der Daten voraussetzte, wurden die Daten dahingehend überprüft und gegebenenfalls logarithmiert. Zusätzlich dazu wurde ein multipler Vergleichstest (post-hoc Test) durchgeführt.

2.6.1 t-Test

Bei Homogenität und Normalverteilung der Daten wurde der t-test für unabhängige Variablen durchgeführt. Hierbei wird die Nullhypothese getestet, die besagt, dass alle Mittelwerte gleich sind. Als Ergebnis wird das Signifikanzniveau bzw. der p-Level angegeben. Dieses Niveau beschreibt die Irrtumswahrscheinlichkeit. Je niedriger das Signifikanzniveau ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass der beobachtete Effekt kein Zufall ist. Ab einem Signifikanzniveau von kleiner als 0,05 wird die Nullhypothese abgewiesen, d.h. die Mittelwerte sind zu einer 95% igen Wahrscheinlichkeit unterschiedlich.

2.6.2 GRM (General Regression Model)

Mit Hilfe des GRMs können nach der Methode der kleinsten Quadrate Modelle erstellt werden, die Effekte unabhängiger Variablen auf abhängige Parameter überprüfen. Diese Modell nutzen sowohl Techniken der Varianzanalyse als auch der Regression. Somit können sowohl kategoriale als auch kontinuierliche Variablen in ein einziges Modell aufgenommen werden.

Als abhängige Variable wurden der Konzentration an löslichen Proteinen, C- und N-Konzentration, das C/N-Verhältnis, der SPAD-Wert und die Biomasse eingesetzt. Als unabhängige Variable wurden die Kohlendioxid-Behandlung und die Untersuchungstermine als Tage nach der Aussaat (TNA) verwendet.

Die GRMs wurden im forward-stepwise-Verfahren gerechnet. Hierdurch werden nur Variablen in die Berechnung einbezogen, deren p-Wert unter dem Signifikanzniveau von 0,05 liegt. Alle anderen Parameter beeinflussen das Modell nicht. Bei der tabellarischen Darstellung der GRM-Ergebnisse wurden der p-Wert und die Einflussrichtung signifikanter Ergebnisse angegeben sowie die Varianzaufklärung (VA) der einzelnen Variablen. Diese wurde als prozentualer Anteil der Gesamtaufklärung der Variablen einschließlich des Fehlers errechnet. Als weiteres wurden p-Wert und R^2 des Gesamtmodells angegeben.

2.6.3 Multipler Vergleichstest (posthoc Test)

Um herauszufinden, an welchem Untersuchungstermin signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen auftreten, wurde im Anschluss an die GRMs ein multipler Vergleichstest, der N unequal HSD-Test, durchgeführt. Diese Methode vergleicht die Mittelwerte unter Berücksichtigung aller Faktoren auf signifikante Unterschiede.

3 ERGEBNISSE

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse zu den Reaktionen von Weizen und Wildkräutern auf erhöhte atmosphärische Kohlendioxid-Konzentrationen vorgestellt. Die vorliegende Arbeit umfasst Untersuchungen sowohl auf der Ebene einzelner Arten und ihrer physiologischen Antworten als auch auf der Ebene des gesamten Pflanzenbestandes. Zunächst werden die Reaktionen der Kulturart Sommerweizen (*Triticum aestivum* cv. Triso) und der Wildkrautart Ackersenf (*Sinapis arvensis*) in den Kapiteln 3.1 und 3.2 erläutert. Diese Kapitel gliedern sich jeweils in Untersuchungen des Proteoms sowie verschiedener physiologischer Parameter der beiden Pflanzenarten. Das Kapitel 3.3 beinhaltet die Reaktionen des gesamten Pflanzenbestandes auf erhöhte CO₂-Konzentrationen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse folgt im abschließenden Kapitel 3.4.

3.1 WIRKUNGSKRITERIEN IN SOMMERWEIZEN (*TRITICUM AESTIVUM*)

Im Sommerweizen wurden die Reaktionen des Proteoms sowie verschiedener physiologischer Wirkungsparameter auf erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen untersucht. In dem folgenden Kapitel 3.1.1 werden zunächst die Reaktionen des Proteoms beschrieben. Die physiologischen Wirkungsparameter werden in Kapitel 3.1.2 beschrieben. Sie setzen sich aus den Untersuchungen zur Gesamtproteinkonzentration, der Kohlenstoff- und Stickstoff-Konzentration, der relativen Chlorophyll a-Konzentration sowie der Biomasse des Sommerweizens zusammen. Die Untersuchungen des Proteoms und der Physiologie wurden in Weizenblättern unterschiedlicher Altersstufen und Sommerweizenkörnern an mehreren Untersuchungsterminen durchgeführt. Die Gliederung der Ergebnisse innerhalb der Kapitel erfolgt zunächst nach Pflanzenorgan und anschließend nach Erntetermin.

3.1.1 Reaktionen des Proteoms

Die Untersuchungen des Proteoms gliedern sich in zwei Teilbereiche: die Bestimmung der Proteinmuster in Blättern und Körnern (siehe Kapitel 3.1.1.1) und die Identifizierung ausgewählter Peaks (siehe Kapitel 3.1.1.2). Im folgenden Kapitel werden zunächst die Proteinmuster der Blätter und Körner von Sommerweizen vereinfacht beschrieben. Anschließend werden die signifikanten Unterschiede zwischen den Proteinmustern der Kontroll- und Versuchspflanzen getrennt nach Pflanzenorgan und Erntetermin dargestellt. Die Identifizierung der zwischen den Behandlungen signifikant unterschiedlichen Peaks wird in Kapitel 3.1.1.2 detailliert beschrieben.

3.1.1.1 Proteinmuster in Blättern und Körnern von Sommerweizen

Die Ergebnisse zu den Untersuchungen des Proteoms in Sommerweizen werden in diesem Kapitel vorgestellt. Die Proteinmuster von verschiedenen Blattaltersstufen und der Körner wurden an mehreren Untersuchungsterminen erstellt (siehe Kap. 2.2).

Die Proteinmuster wurden mittels zwei verschiedener Chipoberflächen erstellt. Mittels eines Proteinchips mit Kationenaustauscher-Oberfläche (WCX) wurden basische Proteine bzw. Peptide detektiert, während ein Proteinchip mit Anionenaustauscher-Oberfläche (SAX) die Proteinspektren für saure Proteine und Peptide lieferte. Beide Chipoberflächen lieferten auswertbare Proteinspektren für alle untersuchten Blattalter und Körner von Sommerweizen, d. h. in allen untersuchten Pflanzenteilen konnten saure Proteine bzw. Peptide nachgewiesen werden. Die Proteinmuster der Körner unterschieden sich generell von denen der Blätter. So wurden beispielsweise in den Körnern mehr Peaks detektiert als in den Fahnenblättern (siehe Abb. 3.1). Vergleicht man die Spektren der Körner und Blätter, kann klar gefolgert werden, dass in den beiden Organen Peaks mit unterschiedlichen Molekulargewichten auftraten. Die Verschiedenheit der Proteinmuster von Körnern und Blättern wurde an allen Untersuchungsterminen deutlich und wird in Abbildung 3.1 beispielhaft dargestellt.

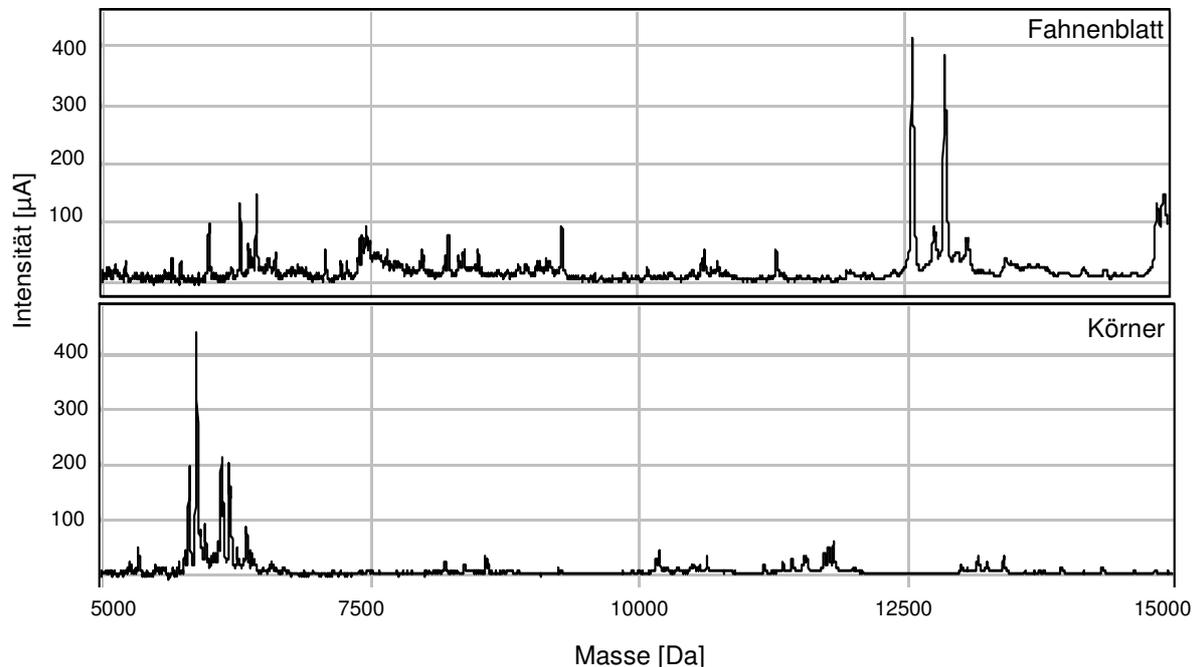


Abb. 3.1: Ausschnitt eines Proteinspektrums von Sommerweizen (Massenbereich 5000 bis 15000 Da). Abgebildet sind die *Ambient*-Spektren der Fraktionen Fahnenblatt und Körner an jeweils einem Untersuchungstermin. Beide Spektren wurden mittels SAX-Chips erstellt, d.h. es wurden saure Proteine und Peptide nachgewiesen.

Interessanterweise wiesen die nachgewiesenen Peaks in den Fahnenblättern, in Blatt 7 und in Blatt 6 einige Übereinstimmungen bezüglich des Proteinmusters auf. Darüber hinaus lassen die ermittelten Daten darauf schließen, dass die Summe der detektierten Peaks über den Untersuchungszeitraum mit dem Blattalter abnahm (siehe Abb. 3.2). So wurden im ältesten Blatt (Blatt 6) lediglich 55 Peaks detektiert, während im nächst-jüngeren Blatt (Blatt 7) 70 Peaks nachgewiesen wurden. Das Proteinmuster des Fahnenblattes, welches das jüngste Blatt während der Untersuchungen war, wies 77 Peaks auf. Hinsichtlich der Molekulargewichte wurden sowohl in Blättern als auch in Körnern von Sommerweizen deutlich mehr Peaks mit einer Masse kleiner als 30 kDa nachgewiesen. Diese Peaks erreichten zusätzlich stärkere Intensitäten bzw. relative Konzentrationen als Peaks, deren Molekulargewicht höher als 30 kDa war (siehe Abb. 3.2).

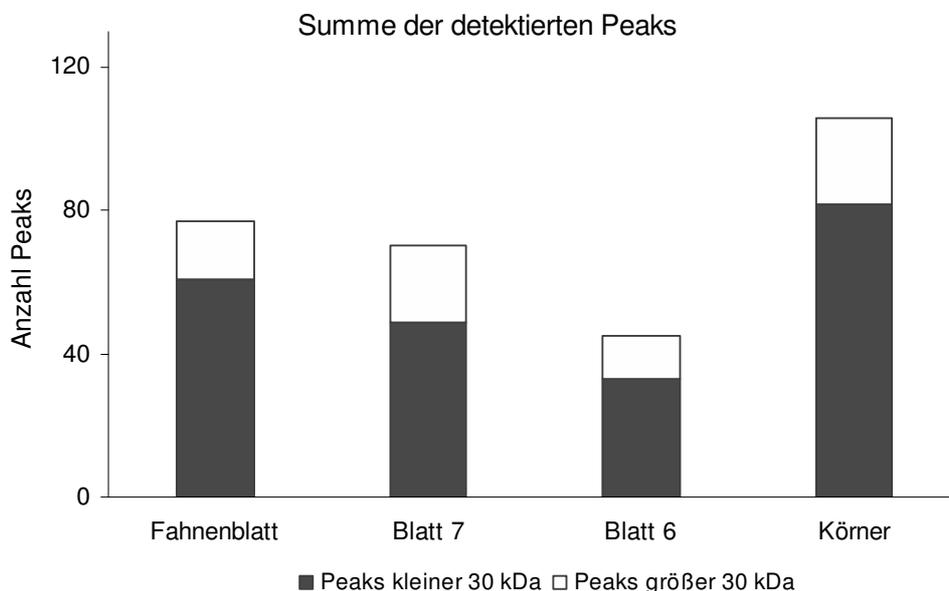


Abb. 3.2: Summe der detektierten Signale über den gesamten Untersuchungszeitraum in Fahnenblatt, Blatt 7 Blatt 6 und Körnern von Sommerweizen. Die Peaks wurden in zwei Gruppen unterteilt: Peaks mit einem Molekulargewicht (MG) kleiner als 30 kDa (Peaks kleiner 30 kDa) und größer als 30 kDa (Peaks größer 30 kDa).

Die Reaktionen des Proteoms auf erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen wurden hinsichtlich zweier Aspekte untersucht (siehe Abb. 3.3). Zum einen wurden die Proteinmuster bezüglich ihres Proteinspektrums analysiert, wobei das Vorkommen der Peaks in beiden Behandlungen verglichen wurde. Die untersuchten Pflanzenorgane zeigten hierbei in ihrem Proteinspektrum keinerlei Reaktionen auf die Begasung mit erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen. Demzufolge wurden die jeweiligen Peaks sowohl in den Kontroll- als auch in den behandelten Pflanzenteilen nachgewiesen. Die erhöhten CO₂-Konzentrationen bewirkten somit keine Veränderungen in der Zusammensetzung der Proteine.

Zum anderen wurden die Proteinmuster quantitativ ausgewertet. In diesem Fall zeigte das Proteinmuster von Sommerweizen eine klare Beeinflussung aufgrund der erhöhten CO₂-Konzentrationen. Die Proteinmuster der exponierten Pflanzen wiesen eine Großzahl signifikanter Effekte hinsichtlich der relativen Konzentration (Intensitäten) auf. Auffallend ist, dass diese Beeinflussung durch erhöhte CO₂-Konzentrationen in den Proteinmustern aller Pflanzenfraktionen auftrat (siehe Abb. 3.3).

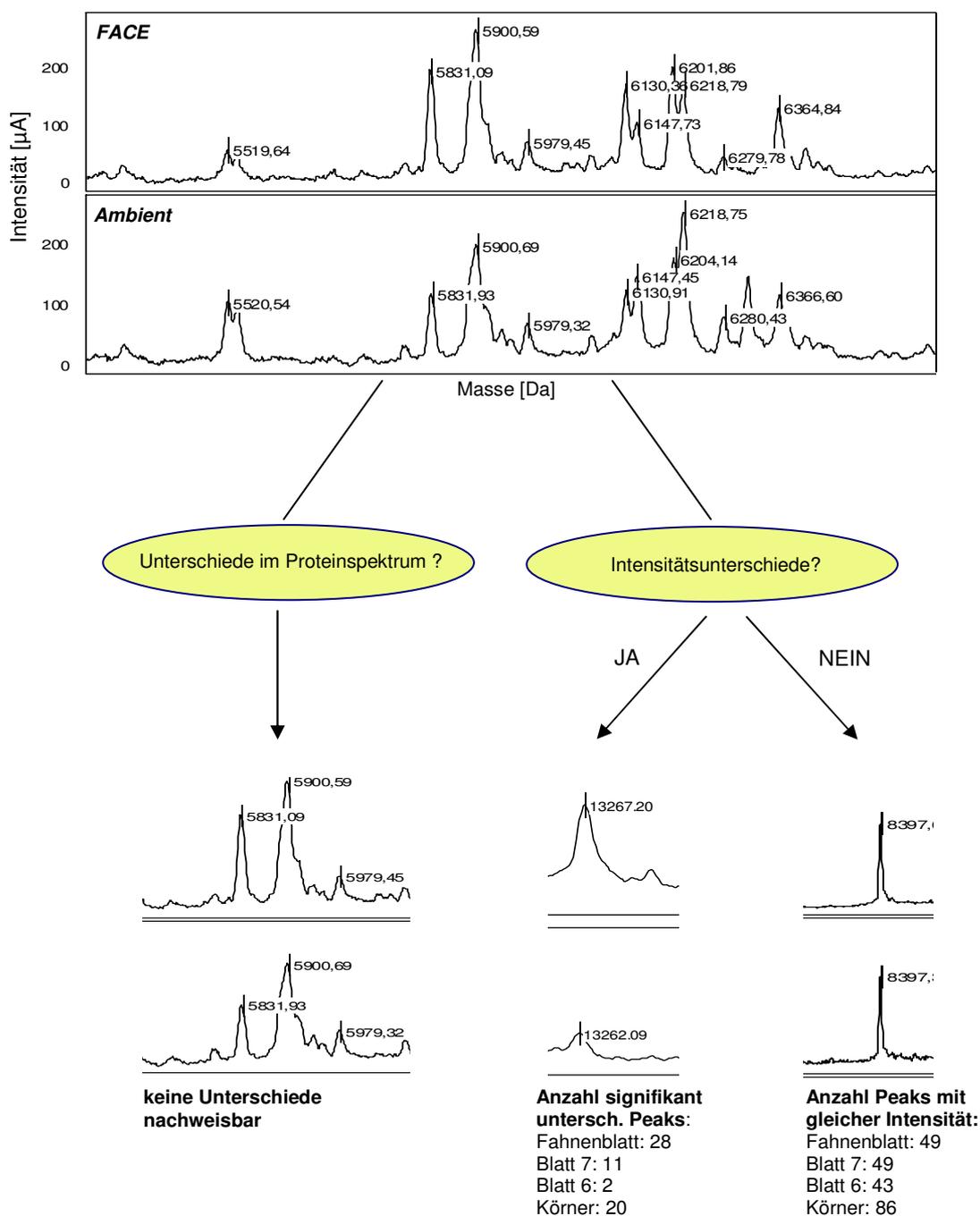


Abb. 3.3: Schema der Ergebnisse. Vergleich der Proteinmuster von Kontrollpflanzen (*Ambient*) und begasten Pflanzen (*FACE*) während der Untersuchungsperiode. Die Spektren wurden zum einen auf die Proteinzusammensetzung (Proteinspektrum) und zum anderen auf signifikante Intensitätsunterschiede der Peaks ausgewertet.

Im Fahnenblatt wurden während der gesamten Untersuchungsperiode 28 Veränderungen im Proteinmuster aufgrund erhöhter CO₂-Konzentrationen nachgewiesen, was 36% der ermittelten Peaks entspricht. In den Fahnenblättern wurden im Vergleich zu den anderen Fraktionen die meisten Veränderungen aufgrund erhöhter CO₂-Konzentrationen nachgewiesen. Darüber hinaus nahm die Anzahl der signifikanten Effekte mit dem Blattalter ab. In den Körnern wurden die Intensitäten von insgesamt 20 Peaks aufgrund der CO₂-Behandlung beeinflusst.

Die Proteinmuster der untersuchten Fraktionen wurden an mehreren Terminen während der Vegetationsperiode untersucht. Die Reaktionen der Proteinmuster auf erhöhte CO₂-Konzentrationen unterschieden sich an den Untersuchungsterminen hinsichtlich ihrer Anzahl. Im Folgenden werden die Ergebnisse gegliedert nach Pflanzenfraktionen und Untersuchungsterminen detailliert beschrieben. Die Ergebnisse werden in Bezug auf die Entwicklungsstadien des Sommerweizens betrachtet.

Proteinmuster in Fahnenblättern (FB)

Die Proteinmuster wurden vom Zeitpunkt der vollen Pflanzenentwicklung bis hin zur Kornentwicklung untersucht. Die Analysen fanden wöchentlich statt und dauerten fünf Wochen (17.6.-15.7.2004) an. 86 Tage nach der Aussaat (TNA) fand die Blüte des Sommerweizens statt, danach begannen die Fruchtentwicklung (92 TNA) und die Kornentwicklung mit den Stadien „Milchreife“ (99 TNA) und „späte Milchreife“ (106 TNA) (siehe Tab. 3.1).

Sowohl die Anzahl der insgesamt nachgewiesenen als auch der signifikant unterschiedlichen Peaks variierten zwischen den Untersuchungsterminen. Zu dem Zeitpunkt, als die Weizenpflanze voll entwickelt war (78 TNA), blieb der erhöhte Kohlendioxid-Konzentration ohne Einfluss auf das Proteinmuster. Im Gegensatz dazu traten im Zeitraum der Blüte von Sommerweizen die meisten Veränderungen im Proteinmuster der Fahnenblätter auf. Während der Blüte veränderte die Exposition mit erhöhter CO₂-Konzentration die relativen Konzentrationen von 32,6 % der insgesamt detektierten Peaks. Zum Zeitpunkt der Fruchtentwicklung hingegen wurden nur 20 % aller nachgewiesenen Peaks beeinflusst (siehe Tab. 3.1).

Die Fahnenblätter der exponierten Pflanzen wiesen während der Blüte auffallend mehr Reaktionen im Proteinmuster auf als zum Zeitpunkt der Milchreife und späten Milchreife. Hier konnte sich die Nullvariante in circa 18% der Fälle signifikant von der Behandlung absetzen (siehe Tab. 3.1). Allerdings ist nicht nur die Anzahl, sondern auch die Art der Reaktion auf erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen entscheidend. Aus diesem Grund werden in den

folgenden Abschnitten die Reaktionen der Proteinmuster an den einzelnen Untersuchungs-terminen detailliert beschrieben.

Tab. 3.1: Proteinmuster der Fahnenblätter von Sommerweizen: Anzahl der detektierten und signifikant unterschiedlichen Peaks an den jeweiligen Untersuchungsterminen (TNA = Tage nach der Aussaat)

Datum	TNA	physiol. Entwicklung des Weizens	Anzahl det. Peaks	Anzahl sign. untersch. Peaks	rel. Änderung [%]
17.06.04	78	Pfl. voll entwickelt (voll E.)	59	0	0,0
25.06.04	86	Blüte	46	15	32,6
01.07.04	92	Fruchtentwicklung (Frucht E.)	47	23	48,9
08.07.04	99	Milchreife (Milchr.)	38	7	18,4
15.07.04	106	späte Milchreife (s. Milchr.)	33	6	18,2

Vergleicht man die Proteinmuster hinsichtlich der CO₂-Behandlung, so wird deutlich, dass die Proteinspektren nicht einheitlich auf die erhöhten CO₂-Konzentrationen reagierten. An allen Untersuchungszeitpunkten kam es sowohl zu Erhöhungen als auch zu Erniedrigungen der relativen Konzentrationen aufgrund der Kohlendioxid-Exposition.

Zum Zeitpunkt der Blüte (86 TNA) war die relative Konzentration (Intensität) von vier Proteinen in der *FACE*-Behandlung erhöht (siehe Tabelle 3.1). Als Beispiel dient der Peak mit dem Molekulargewicht von 8222 Da. Aufgrund von erhöhten CO₂-Konzentrationen wurde die Intensität dieses Peaks um das Doppelte erhöht (siehe Tab. 3.2). Alle Peaks mit erhöhten Intensitäten wurden mittels eines WCX-Proteinchips nachgewiesen, folglich lag der pI-Wert dieser Proteine bzw. Peptide im basischen Bereich.

Die Mehrzahl der Peaks reagierte auf die CO₂-Exposition jedoch mit einer Erniedrigung der relativen Konzentration. Am 25.6.04, 86 Tage nach der Aussaat (TNA), traf dies für 11 Peaks aus dem Proteinmuster der Fahnenblätter zu. Beispielsweise zeigte der Peak mit einem Molekulargewicht von 14900 Da durch erhöhte CO₂-Konzentrationen eine signifikante Abnahme der Intensität von 66,9 μ A in der *Ambient*-Behandlung auf 22,4 μ A in der *FACE*-Behandlung. Insgesamt reagierten drei saure (Nachweis mittels SAX-Chips) und acht basische (Nachweis mittels WCX-Chips) Proteine bzw. Peptide auf die Kohlendioxid-Begasung mit einer Erniedrigung ihrer relativen Konzentrationen (siehe Tab. 3.2).

Insgesamt gesehen zeigte das Proteinmuster während der Blüte ein heterogenes Bild: einige Peaks reagierten mit einer Konzentrationserhöhung, andere mit einer -erniedrigung aufgrund der CO₂-Exposition. Während der Fruchtentwicklung, die 92 Tage nach der Aussaat stattfand, reagierten die Fahnenblätter mit insgesamt neun Veränderungen auf die erhöhte

CO₂-Konzentration. Nur zwei Peaks reagierten auf die erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen mit einer Erhöhung ihrer Intensität.

Tab. 3.2: Proteinmuster in Fahnenblättern (FB) während der Blüte (86 TNA, 25.6.04). Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Konzentrationen (Intensitäten) von Fahnenblättern fünf paralleler Plots. (WCX = weak cation exchanger - Nachweis von basischen Proteinen, SAX = strong anion exchanger - Nachweis von sauren Proteinen, ● = Intensität ist in der *FACE*-Behandlung erhöht, ○ = Intensität ist in der *FACE*-Behandlung erniedrigt, signifikant falls $p \leq 0,05$)

Masse [Da]	Intensität FB <i>Ambient</i> [μA]	Intensität FB <i>FACE</i> [μA]	Chipober- fläche	p	CO ₂ - Effekt
5100	27,2 ± 12,9	13,8 ± 4,4	SAX	0,050	○
6454	186,2 ± 40,2	257,1 ± 31,8	WCX	0,016	●
8222	52,9 ± 14,1	94,4 ± 25,2	WCX	0,016	●
10270	23,9 ± 2,2	14,6 ± 4,0	SAX	0,014	○
10658	49,6 ± 13,9	23,7 ± 11,3	WCX	0,009	○
13019	57,6 ± 10,9	77,9 ± 8,9	WCX	0,016	●
13117	85,6 ± 18,5	115,9 ± 13,7	WCX	0,016	●
14900	66,9 ± 36,2	22,4 ± 10,5	WCX	0,028	○
16503	84,9 ± 30,6	48,1 ± 15,2	WCX	0,047	○
34798	6,0 ± 1,6	3,0 ± 0,8	WCX	0,028	○
39199	28,5 ± 7,6	13,7 ± 3,2	WCX	0,009	○
41848	17,2 ± 2,1	9,6 ± 3,6	WCX	0,016	○
42025	31,6 ± 19,3	11,2 ± 3,7	SAX	0,014	○
53441	5,8 ± 1,4	3,0 ± 0,5	WCX	0,009	○
56882	4,6 ± 1,5	2,1 ± 0,4	WCX	0,009	○

Beide Proteine bzw. Peptide wiesen einen pI-Wert im basischen Bereich auf. Während der Fruchtentwicklung, 92 TNA, wurden zusätzlich die relativen Konzentrationen von sieben Peaks in der *FACE*-Behandlung erniedrigt. Die Mehrzahl dieser Peaks wurde mittels SAX-Oberflächen nachgewiesen, d.h. sie wiesen einen pI-Wert im sauren Bereich auf. Der Peak mit dem Molekulargewicht (MG) von 10651 Da wies an diesem Untersuchungstermin die höchste Intensität auf, welche aufgrund erhöhter CO₂-Konzentrationen erniedrigt wurde (siehe Tab. 3.3). Das Proteinmuster der Fahnenblätter reagierte nicht nur während der Blüte und Fruchtentwicklung, sondern auch während der Milchreife und späten Milchreife auf die erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen. Dies wird bei genauer Betrachtung der Proteinmuster 99 und 106 Tage nach der Aussaat deutlich.

Tab. 3.3: Proteinmuster in Fahnenblättern (FB) während der Fruchtentwicklung (92 TNA, 1.7.04). Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Konzentrationen (Intensitäten) von Fahnenblättern fünf paralleler Plots. (WCX = weak cation exchanger - Nachweis von basischen Proteinen, SAX = strong anion exchanger - Nachweis von sauren Proteinen, ● = Intensität ist in der *FACE*-Behandlung erhöht, ○ = Intensität ist in der *FACE*-Behandlung erniedrigt, signifikant falls $p \leq 0,05$).

Masse [Da]	Intensität FB <i>Ambient</i> [μ A]	Intensität FB <i>FACE</i> [μ A]	Chipober- fläche	p	CO ₂ - Effekt
5323	70,3 \pm 4,8	60,4 \pm 6,8	SAX	0,028	○
10534	106,6 \pm 5,8	92,8 \pm 3,5	SAX	0,016	○
10651	490,3 \pm 32,8	424,6 \pm 32,0	SAX	0,028	○
10758	38,1 \pm 6,0	30,9 \pm 2,6	SAX	0,009	○
10857	69,8 \pm 4,6	59,4 \pm 6,9	SAX	0,028	○
14898	41,9 \pm 8,7	29,8 \pm 9,5	WCX	0,047	○
24099	3,1 \pm 0,8	4,8 \pm 1,0	WCX	0,028	●
27398	1,7 \pm 0,5	2,8 \pm 0,5	WCX	0,016	●
56857	3,3 \pm 0,9	2,2 \pm 0,4	WCX	0,028	○

Am 8.7.2004, 99 Tage nach der Aussaat, hatten die Weizenkörner das Stadium der Milchreife erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Intensitäten von sieben Peaks in den Fahnenblättern durch erhöhtes CO₂ signifikant beeinflusst. Allerdings bewirkte die CO₂-Begasung nur bei einem Peak eine Intensitätserhöhung. Es handelte sich um den Peak mit dem Molekulargewicht von 39329 Da, dessen Intensität in der *Ambient*-Behandlung bei 53,2 μ A und in der *FACE*-Behandlung bei 77,7 μ A lag (siehe Tabelle 3.4).

Die restlichen sechs Peaks reagierten auf die *FACE*-Behandlung mit einer Erniedrigung der relativen Konzentrationen. Fünf dieser Peaks wurden mittels der SAX-Oberfläche nachgewiesen und wiesen somit einen pI-Wert im sauren Bereich auf.

Am letzten Untersuchungstermin (106 TNA) hatten die Sommerweizenpflanzen das Stadium der späten Milchreife erreicht. Auch zu diesem Zeitpunkt kam es durch die Kohlendioxid-Begasung zu Unterschieden im Proteinmuster der Fahnenblätter.

Die Intensitäten von sechs Peaks wurden beeinflusst (siehe Tab. 3.5). Hierbei wurden die relativen Konzentrationen von drei Proteinen bzw. Peptiden aufgrund erhöhter CO₂-Konzentrationen erhöht. Die Intensitäten der restlichen drei Peaks wurden in der *FACE*-Behandlung erniedrigt. Auffällig ist, dass zu diesem Untersuchungszeitpunkt nur basische Proteine auf die erhöhten CO₂-Konzentrationen reagierten (siehe Tabelle 3.5).

Tab. 3.4: Proteinmuster in Fahnenblättern (FB) zum Zeitpunkt der Milchreife (99 TNA, 8.7.04). Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Konzentrationen (Intensitäten) von Fahnenblättern fünf paralleler Plots. (WCX = weak cation exchanger - Nachweis von basischen Proteinen, SAX = strong anion exchanger - Nachweis von sauren Proteinen, ● = Intensität ist in der FACE-Behandlung erhöht, ○ = Intensität ist in der FACE-Behandlung erniedrigt, signifikant falls $p \leq 0,05$).

Masse [Da]	Intensität FB Ambient [μ A]	Intensität FB FACE [μ A]	Chipoberfläche	p	CO ₂ - Effekt
6452	823,1 ± 59,4	700,2 ± 112,9	WCX	0,047	○
8392	310,8 ± 38,6	204,8 ± 49,0	SAX	0,016	○
8601	39,6 ± 5,0	30,4 ± 4,8	SAX	0,047	○
10533	93,5 ± 8,1	74 ± 13,6	SAX	0,047	○
10651	471,4 ± 44,2	357,1 ± 67,9	SAX	0,028	○
10857	63,5 ± 4,8	52,6 ± 6,9	SAX	0,047	○
39329	53,2 ± 23,1	77,7 ± 27,4	SAX	0,047	●

Tab. 3.5: Proteinmuster in Fahnenblättern (FB) während der späten Milchreife (106 TNA, 15.7.04). Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Konzentrationen (Intensitäten) von Fahnenblättern fünf paralleler Plots. (WCX = weak cation exchanger - Nachweis von basischen Proteinen, SAX = strong anion exchanger - Nachweis von sauren Proteinen, ● = Intensität ist in der FACE-Behandlung erhöht, ○ = Intensität ist in der FACE-Behandlung erniedrigt, signifikant falls $p \leq 0,05$).

Masse [Da]	Intensität FB Ambient [μ A]	Intensität FB FACE [μ A]	Chipoberfläche	p	CO ₂ - Effekt
6452	584,5 ± 43,7	438,9 ± 68,0	WCX	0,014	○
6558	147,6 ± 9,7	108,1 ± 16,8	WCX	0,014	○
11322	32,4 ± 5,7	44,8 ± 5,0	WCX	0,014	●
13116	257,7 ± 29,0	197,5 ± 29,0	WCX	0,027	○
19329	6,4 ± 1,3	10,4 ± 2,7	WCX	0,050	●
33288	19,9 ± 4,5	26,6 ± 4,4	WCX	0,047	●

Vergleicht man die Veränderungen bzw. Regulationen aufgrund der Kohlendioxid-Begasung an den fünf physiologischen Stadien der Weizenpflanzen, ergibt sich folgendes Bild. Die Regulationen der Proteinmuster im Fahnenblatt traten nicht an allen Untersuchungszeitpunkten der Pflanzen auf. Einige Peaks wurden nur an einem Datum signifikant beeinflusst, während andere an mehreren Zeitpunkten erhöhte oder erniedrigte Intensitäten aufwiesen. So wurde zum Beispiel die Stickstoffverbindung mit dem Molekulargewicht von 10531 Da (Peak 1) an allen fünf Untersuchungsterminen detektiert. Allerdings wurde an nur zwei Terminen trotz relativ hoher Standardabweichungen ein signifikanter Effekt zwischen den Behandlungen festgestellt (siehe Abb. 3.4).

Die Intensität an den beiden ersten Untersuchungsterminen lag in beiden Behandlungen zwischen 60 und 80 μA . In diesem Zeitraum, von der Entwicklung des Fahnenblattes bis zur Blüte, konnten keine Auswirkungen von erhöhten CO_2 -Konzentrationen auf das Proteilmuster in Fahnenblättern nachgewiesen werden. Während der Fruchtentwicklung, 92 TNA, kam es zu einer Erniedrigung der relativen Konzentration in der *FACE*-Behandlung (siehe Abb. 3.4).

Dieses Ergebnis wird durch die Werte 99 Tage nach der Aussaat gestützt, auch zum Zeitpunkt der Milchreife wurde die relative Konzentration dieses Peaks in der CO_2 -Behandlung signifikant erniedrigt. Am letzten Untersuchungstermin, 106 Tage nach der Aussaat, nahm die Intensität sowohl in der *FACE*- als auch in der *Ambient*-Behandlung ab und wies keine Beeinflussung aufgrund erhöhter CO_2 -Konzentrationen auf (siehe Abb. 3.4).

Ein zweites Beispiel stellte der Peak mit einer Masse von 10531 Da (Peak 2) dar. Dieser Peak wurde zu allen Untersuchungszeitpunkten nachgewiesen (siehe Abb. 3.5). Insgesamt gesehen nahmen die Intensitäten von 78 Tagen bis 86 Tage nach der Aussaat leicht ab. Während der Fruchtentwicklung des Sommerweizens (92 TNA) kam es zu einem Anstieg der Intensität von bis zu 400 μA . Die relative Konzentration stieg an diesem Termin jedoch aufgrund erhöhter Kohlendioxid-Konzentrationen signifikant geringer an als in den Kontrollpflanzen. Dieser Effekt wurde auch während der Milchreife beobachtet, auch 99 Tage nach der Aussaat war die Intensität des Peaks in der *FACE*-Behandlung gegenüber den Kontrollbedingungen signifikant geringer.

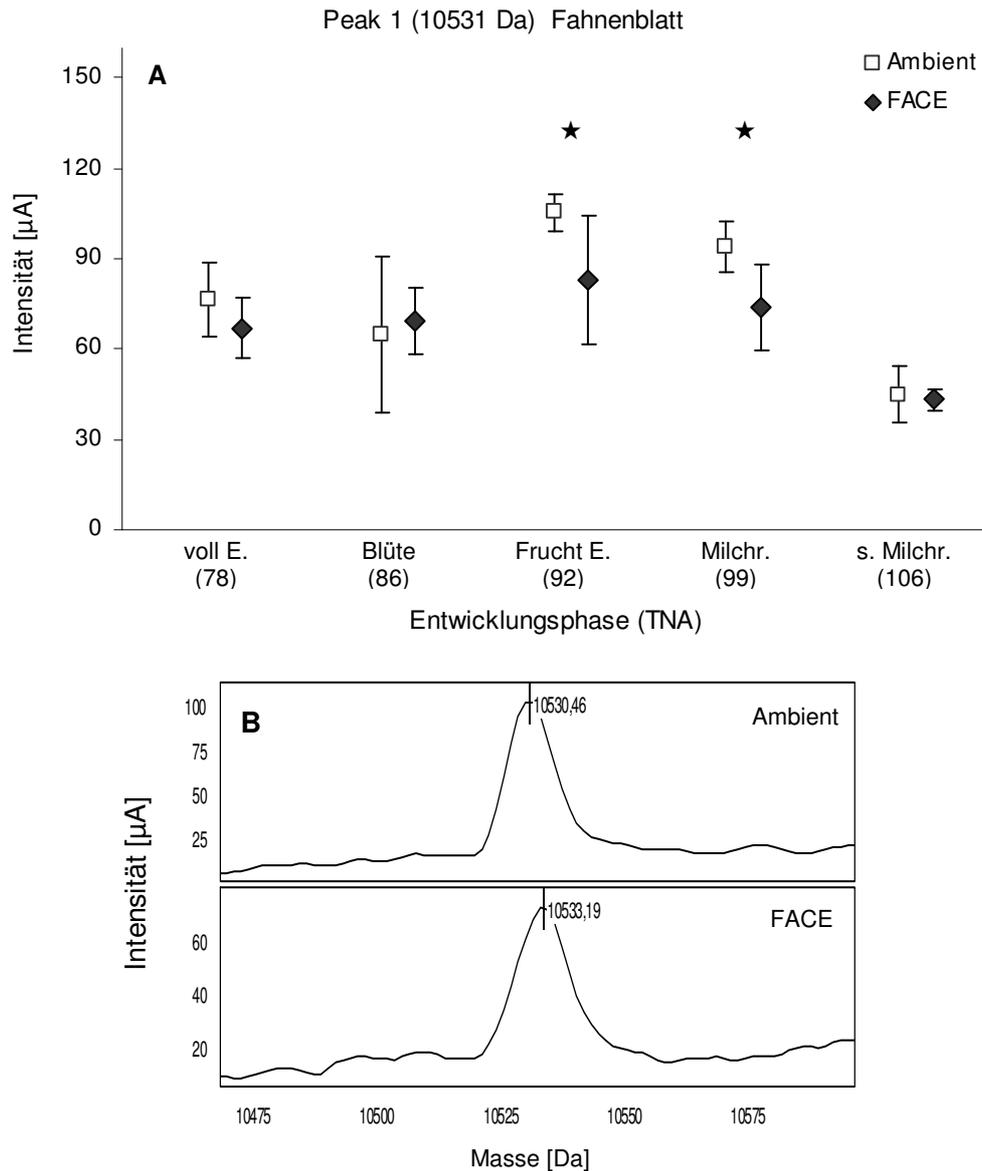


Abb. 3.4: Zeitlicher Verlauf von Peak 1 (10531 Da) im Fahrenblatt des Sommerweizens.

A Mittelwerte und Standardabweichungen der Intensitäten von Signal 1 an den fünf Untersuchungs-terminen. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen sind mit ★ markiert, wobei: ★: $p \leq 0,05$; ★★: $p \leq 0,01$; ★★★: $p \leq 0,001$. (voll E. = voll entwickelt, Frucht E. = Fruchtentwicklung, Milchr. = Milchreife, s. Milchr. = späte Milchreife, TNA = Tage nach der Aussaat)

B Beispiel für einen Peak nach der Auswertung am SELDI-TOF-MS, 92 TNA im Vergleich der Behandlungen.

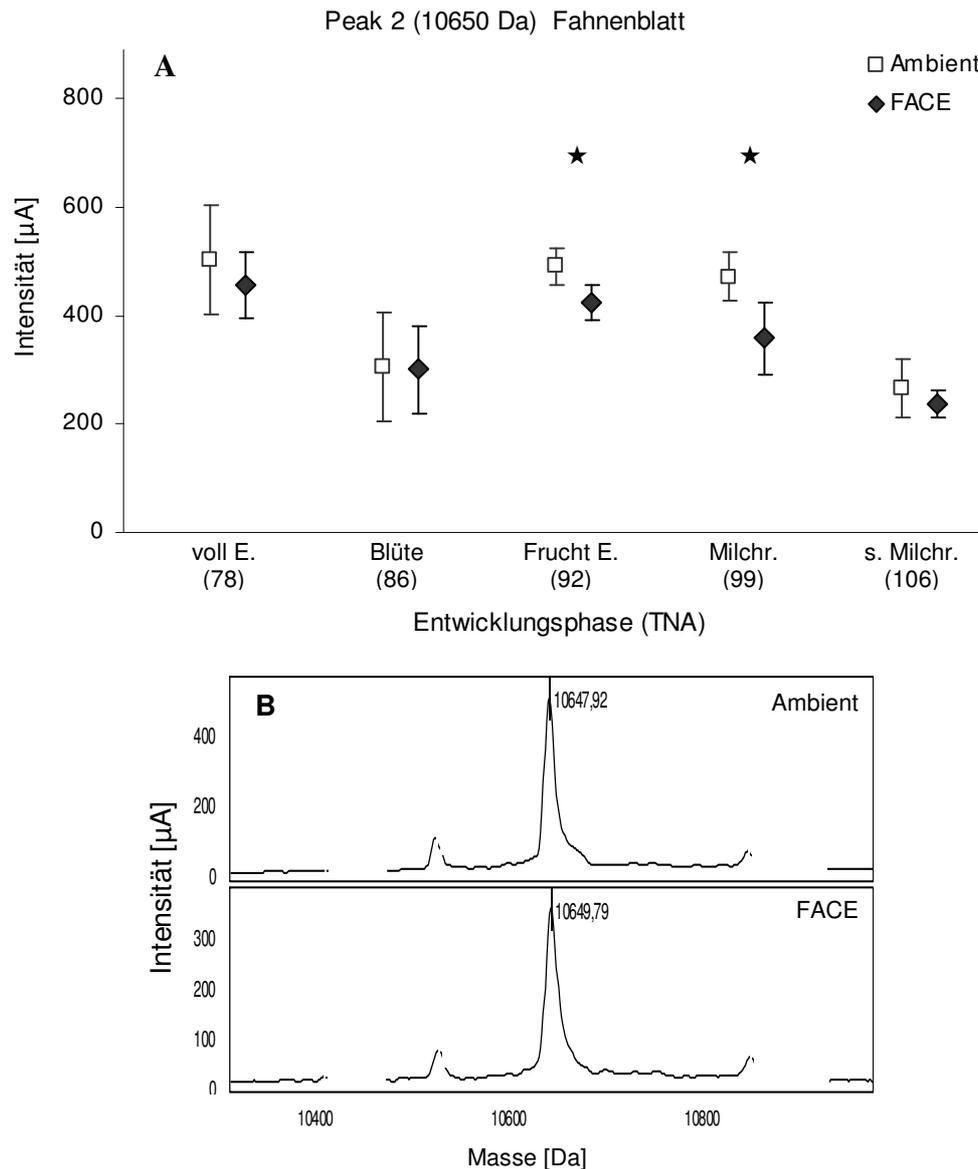


Abb. 3.5: Zeitlicher Verlauf von Peak 2 (10650 Da) im Fahnenblatt des Sommerweizens.

A Mittelwerte und Standardabweichungen der Intensitäten von Peak 1 an den fünf Untersuchungsterminen. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen sind mit ★ markiert, wobei: ★: $p \leq 0,05$; ★★: $p \leq 0,01$; ★★★: $p \leq 0,001$. (voll E. = voll entwickelt, Frucht E. = Fruchtentwicklung, Milchr. = Milchreife, s. Milchr. = späte Milchreife, TNA = Tage nach der Aussaat).

B Beispiel für einen Peak nach der Auswertung am SELDI-TOF-MS, 92 TNA im Vergleich der Behandlungen.

Während der gesamten Untersuchungsperiode wurden 29 unterschiedliche Peaks in den Fahnenblättern detektiert, deren relative Konzentrationen sich in Abhängigkeit von der CO_2 -Behandlung veränderten. Die Intensitäten von sieben dieser Peaks wurden an wenigstens zwei Untersuchungsterminen durch erhöhte CO_2 -Konzentrationen erhöht bzw. erniedrigt. Die Reaktionen dieser Peaks zu den verschiedenen Zeitpunkten werden in Tabelle 3.6 dargestellt. Auffallend ist, dass die Intensitäten von fünf Peaks an mindestens zwei Zeitpunkten erniedrigt

wurden. Nur zwei Peaks (MG=6454 Da, MG=13117 Da) wiesen zur Blüte der Pflanzen (86 TNA) eine Erhöhung ihrer relativen Konzentrationen auf. Während der Fruchtentwicklung an dem darauf folgenden Untersuchungstermin, 92 TNA, konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in den Intensitäten der beiden Peaks festgestellt werden. Der Peak mit einem Molekulargewicht (MG) von 6454 Da wurde während der Kornentwicklung (99 und 106 TNA) erneut durch erhöhte CO₂-Konzentrationen beeinflusst. Überraschenderweise wurden die Intensitäten hierbei allerdings nicht wie an dem vorigen Termin erniedrigt, sondern erhöht. Das gleiche Bild zeigte sich bei dem Peak mit einem MG von 13117 Da, auch hier kam es 106 Tage nach der Aussaat zu einer Erniedrigung der relativen Konzentration (siehe Tab. 3.6).

Tab. 3.6: Übersicht der signifikanten Effekte von sieben Signalen in Fahnenblättern an den fünf Untersuchungsterminen. (● = Intensität ist in der FACE-Behandlung erhöht, ○ = Intensität ist in der FACE-Behandlung erniedrigt, signifikant falls $p \leq 0,05$).

Masse [Da]	78 TNA	86 TNA	92 TNA	99 TNA	106 TNA
6456		●		○	○
10534			○	○	
10650			○	○	
10875			○	○	
13117		●			○
14900		○	○		
56882		○	○		

Proteinmuster in Blatt 7 (B7)

Die Proteinmuster in Blatt 7 wurden 86, 92 und 99 Tage nach der Aussaat durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Blüte (86 TNA) war Blatt 7 bereits voll entwickelt, an den beiden darauf folgenden Zeitpunkten begannen die Blätter zu altern. Die Fruchtentwicklung setzte 92 TNA ein, während die Pflanzen 99 TNA im Stadium der Milchreife waren.

Zu diesen Zeitpunkten wurden insgesamt 70 unterschiedliche Proteine bzw. Peptide nachgewiesen. Im Gegensatz zu den Fahnenblättern, bei denen die Anzahl der detektierten Peaks im Laufe der Untersuchungsperiode drastisch abnahm, war ein solcher Abfall bei Blatt 7 nicht zu verzeichnen (siehe Abb. 3.1). Hier schwankte die Anzahl der nachgewiesenen Proteine an den Untersuchungsterminen zwischen 36 und 43 Peaks.

Betrachtet man die Reaktionen der Proteinmuster auf die erhöhten Konzentrationen, werden folgende Auswirkungen deutlich. Die erhöhten CO₂-Konzentrationen bewirkten, wie

auch schon bei den Fahnenblättern, keine Veränderungen im Spektrum der Proteine. Allerdings konnten signifikante Unterschiede in der Quantität mehrerer Peaks festgestellt werden. Hierbei unterschied sich die Anzahl der Reaktionen von Blatt 7 an den Untersuchungsterminen. Interessanterweise bewirkten erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen zum Zeitpunkt der Fruchtentwicklung (86 TNA) die meisten Veränderungen im Proteinmuster.

Zur Blüte der Pflanzen, 78 TNA wurden signifikante Änderungen in der Intensität von insgesamt drei Proteinen festgestellt (siehe Tab. 3.7). Diese drei Proteine wurden mittels WCX-Oberflächen nachgewiesen, d.h. ihr pI-Wert lag im basischen Bereich. Die erhöhten CO₂-Konzentrationen bewirkten in allen drei Fällen eine Abnahme der Intensitäten.

Tab. 3.7: Proteinmuster in Blatt 7 (B7) zum Zeitpunkt der Blüte (86 TNA, 25.6.04). Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Konzentrationen (Intensitäten) von Blättern fünf paralleler Plots. (WCX = weak cation exchanger - Nachweis von basischen Proteinen, SAX = strong anion exchanger - Nachweis von sauren Proteinen, ● = Intensität ist in der FACE-Behandlung erhöht, ○ = Intensität ist in der FACE-Behandlung erniedrigt, signifikant falls $p \leq 0,05$).

Masse [Da]	Intensität B7 Ambient [μA]	Intensität B7 FACE [μA]	Chipober- fläche	p	CO ₂ - Effekt
6300	222,5 ± 31,4	167,8 ± 32,0	WCX	0,050	○
12594	529,5 ± 60,0	391,2 ± 95,7	WCX	0,050	○
12802	134,2 ± 19,2	104,1 ± 23,7	WCX	0,050	○

Zum Zeitpunkt der Fruchtbildung, 93 Tage nach der Aussaat, wurden die relativen Konzentrationen von sechs Peaks durch die CO₂-Exposition beeinflusst (siehe Tab. 3.8). Auffällig ist, dass es sich bei den beteiligten Stickstoffverbindungen ausschließlich um saure Proteine handelte. Darüber hinaus wurden die relativen Konzentrationen der Peaks bis auf eine Ausnahme durch erhöhte CO₂-Konzentrationen vermindert. Dieses Ergebnis wurde schon für die Fahnenblätter beschrieben, auch hier wurde die Mehrzahl der Peaks zum Zeitpunkt der Blüte bezüglich der Intensität erniedrigt (siehe Abb. 3.8).

Am vierten Untersuchungstermin, zum Zeitpunkt der Milchreife, wurde nur ein Protein signifikant durch erhöhte CO₂-Konzentrationen beeinflusst. Es kam hierbei zu einer Erhöhung der relativen Konzentration des Proteins mit einer Größe von 11322 Da ($p = 0,02$).

Tab. 3.8: Proteinmuster in Blatt 7 (B7) während der Fruchtbildung (92 TNA, 1.7.04). Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Konzentrationen (Intensitäten) von Blättern fünf paralleler Plots. (WCX = weak cation exchanger - Nachweis von basischen Proteinen, SAX = strong anion exchanger - Nachweis von sauren Proteinen, ● = Intensität ist in der FACE-Behandlung erhöht, ○ = Intensität ist in der FACE-Behandlung erniedrigt, signifikant falls $p \leq 0,05$).

Masse [Da]	Intensität B7 Ambient [μ A]	Intensität B7 FACE [μ A]	Chipober- fläche	p	CO ₂ - Effekt
5326	66,7 \pm 5,5	48,3 \pm 21,3	SAX	0,047	●
10539	96,5 \pm 4,7	66,9 \pm 27,7	SAX	0,047	○
10657	432,6 \pm 18,9	297,2 \pm 140,2	SAX	0,047	○
10863	60,3 \pm 3,4	44,2 \pm 18,0	SAX	0,047	○
10909	42,1 \pm 14,6	28,2 \pm 16,6	SAX	0,047	○
14011	5,5 \pm 1,1	3,339 \pm 2,0	SAX	0,047	○
46406	6,1 \pm 1,2	2,774 \pm 2,0	SAX	0,028	○

Proteinmuster in Blatt 6 (B6)

Diese Blattaltersstufe wurde 86 Tage nach der Aussaat, dem Zeitpunkt der Blüte des Sommerweizens, untersucht. Die signifikanten Veränderungen im Proteinmuster beschränkten sich auf zwei Peaks, wobei die relativen Konzentrationen dieser Stickstoffverbindungen verringert wurden. Hierbei handelte es sich um die Peaks mit den Molekulargewichten von 10541 Da und 14971 Da.

Proteinmuster in Körnern (Kö)

Die Untersuchungen zum Proteinmuster der Weizenkörner wurden an zwei Untersuchungsterminen durchgeführt, 99 und 106 Tage nach der Aussaat. Während dieser Termine fand die Kornentwicklung statt, die sich in die Stadien „Milchreife“ und „späte Milchreife“ untergliederte. Die Ergebnisse dazu werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

An beiden Untersuchungsterminen wurden insgesamt 20 Proteine nachgewiesen, deren relative Konzentrationen aufgrund der Kohlendioxid-Exposition signifikante Unterschiede aufwiesen (siehe Tab. 3.9 & Tab. 3.10). Erhöhtes Kohlendioxid wirkte sich, wie auch schon bei den Blättern beschrieben, nicht auf das Spektrum der nachgewiesenen Peaks aus. Allerdings wurden auch hier einige interessante Veränderungen in der Quantität der Proteinmuster nachgewiesen. Diese werden in den folgenden Abschnitten nach Untersuchungstermin gegliedert dargestellt.

Zum Zeitpunkt der Milchreife (99 TNA) traten 16 signifikante Veränderungen im Proteinmuster der Körner von Sommerweizen auf (siehe Tab. 3.9). Auffallend ist, dass die Mehrzahl

dieser Proteine bzw. Peptide einen pI-Wert im sauren Bereich aufwiesen, sie wurden demnach mittels einer Anionenaustauscheroberfläche (SAX) nachgewiesen. Nur zwei basische Peaks reagierten in den untersuchten Körnern auf die erhöhten CO₂-Konzentrationen. Diese Reaktionen zeigten sich als eine Erhöhung und eine Verminderung der relativen Konzentrationen. Beispielsweise wies die Intensität des Signals mit dem MG von 5536 Da mit 683 µA in der *Ambient*-Behandlung die höchste Intensität auf. Die Intensität in der *FACE*-Behandlung war um 215,5 µA signifikant erniedrigt.

Tab. 3.9: Proteinmuster in Weizenkörnern (Kö) zum Zeitpunkt der Milchreife (99 TNA, 8.7.04). Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Konzentrationen (Intensitäten) von Körnern fünf paralleler Plots. (WCX = weak cation exchanger - Nachweis von basischen Proteinen, SAX = strong anion exchanger - Nachweis von sauren Proteinen, ● = Intensität ist in der *FACE*-Behandlung erhöht, ○ = Intensität ist in der *FACE*-Behandlung erniedrigt, signifikant falls $p \leq 0,05$).

Masse [Da]	Intensität Kö <i>Ambient</i> [µA]	Intensität Kö <i>FACE</i> [µA]	Chipober- fläche	p	CO ₂ - Effekt
5536	683,7 ± 156,2	432,2 ± 71,1	WCX	0,009	○
11751	69,4 ± 5,6	53,9 ± 7,4	SAX	0,027	○
11836	87,7 ± 14,3	71,8 ± 3,8	SAX	0,050	○
13090	9,5 ± 4,9	16,1 ± 3,6	SAX	0,050	●
13186	24,8 ± 8,9	35,0 ± 4,1	SAX	0,027	●
13269	19,2 ± 7,5	28,7 ± 5,4	SAX	0,050	●
13426	30,9 ± 13,8	54,3 ± 7,0	SAX	0,014	●
13967	15,3 ± 5,8	27,2 ± 6,6	SAX	0,027	●
14349	16,05 ± 5,5	22,7 ± 2,9	SAX	0,050	●
14648	5,1 ± 1,8	7,9 ± 0,7	SAX	0,014	●
14841	7,1 ± 2,2	10,3 ± 0,9	SAX	0,027	●
19739	2,8 ± 0,4	2,1 ± 0,4	SAX	0,050	○
24193	2,6 ± 0,7	4,1 ± 0,9	WCX	0,016	●
29343	1,1 ± 0,4	0,7 ± 0,2	SAX	0,027	○
35350	13,7 ± 3,2	9,9 ± 2,4	SAX	0,047	○
41420	11,1 ± 5,7	9,9 ± 1,5	SAX	0,028	○

Die Reaktionen der basischen Peaks zeigten keine einheitliche Richtung. Das bedeutet, dass die relativen Konzentrationen durch erhöhte CO₂-Konzentrationen zum einen erhöht und zum anderen erniedrigt wurden. Die Mehrzahl der Peaks zeigte jedoch eine Verminderung der Intensitäten, wie zum Beispiel bei den Peaks mit einer Masse von 11751 Da oder 13186 Da

(siehe Tab. 3.9). Im Gegensatz dazu reagierten sechs basische Proteine auf die Kohlendioxid-Begasung mit einer Erhöhung ihrer relativen Konzentrationen.

Während des Stadiums der späten Milchreife (106 TNA) wurden nur vier Peaks durch die CO₂-Exposition beeinflusst. Demzufolge reagierten die Sommerweizenkörner zum Zeitpunkt der Milchreife mit einer größeren Anzahl an Veränderungen im Proteinmuster als zur späten Milchreife. An diesem Zeitpunkt wurden die relativen Konzentrationen der zwei basischen Peaks mit den Molekulargewichten von 5383 Da und 8222 Da erhöht. Die Kohlendioxid-Begasung bewirkte allerdings auch eine Erhöhung der relativen Konzentrationen zweier saurer Proteine (siehe Tab. 3.10).

Tab. 3.10: Proteinmuster in Weizenkörnern (Kö) zum Zeitpunkt der späten Milchreife (106 TNA, 15.7.04). Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Konzentrationen (Intensitäten) von Körnern fünf paralleler Plots. (WCX = weak cation exchanger - Nachweis von basischen Proteinen, SAX = strong anion exchanger - Nachweis von sauren Proteinen, ● = Intensität ist in der FACE-Behandlung erhöht, ○ = Intensität ist in der FACE-Behandlung erniedrigt, signifikant falls $p \leq 0,05$).

Masse [Da]	Intensität Kö Ambient [μA]	Intensität Kö FACE [μA]	Chipoberfläche	p	CO ₂ - Effekt
5383	192,3 ± 76,1	283,9 ± 65,4	WCX	0,028	●
5980	194,7 ± 19,1	160,0 ± 22,5	SAX	0,047	○
6149	290,0 ± 13,1	249,0 ± 22,5	SAX	0,047	○
8222	71,0 ± 9,6	96,0 ± 19,3	WCX	0,047	●

Kurzzusammenfassung I – Proteinmuster in Sommerweizen

- ❖ Erhöhte CO₂-Konzentrationen beeinflussten nicht die Zusammensetzung der mittels SELDI-TOF-MS nachgewiesenen Proteine in den untersuchten Pflanzenorganen.
- ❖ Allerdings wurden die relativen Konzentrationen mehrerer Peaks in den Blättern und den Körnern signifikant beeinflusst, wobei die Mehrzahl der Reaktionen in einer Verminderung der relativen Konzentrationen bestand.
- ❖ Das Proteinmuster der untersuchten Blätter reagierte hauptsächlich zum Zeitpunkt der Blüte und der Fruchtbildung auf die CO₂-Exposition.
- ❖ Die Körner reagierten im Stadium der Milchreife mit den größten Veränderungen im Proteinmuster.

3.1.1.2 Identifizierung von Proteinen in Fahnenblättern und Körnern

In den folgenden Abschnitten wird die Identifizierung einiger Proteine, deren Intensitäten auf die CO₂-Begasung reagierten, aus den Blättern und Körnern von Sommerweizen beschrieben. Die Identifizierung der Blattproteine wurde am Beispiel der Fahnenblätter durchgeführt, da diese im Vergleich zu den anderen Blattaltersstufen die größten Veränderungen auf erhöhte CO₂-Konzentrationen aufwiesen.

In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Schritte, die zur Identifizierung der Proteine in Fahnenblättern und Körnern führten, beschrieben. Die Darlegung der Ergebnisse wird hierbei in die Unterkapitel *Separation der Proteine* und *Verdau und Identifizierung der Proteine* unterteilt.

Separation der Proteine

Die Proteine in den Fahnenblättern und Körnern wurden zunächst separiert. Dies erfolgte in beiden Pflanzenorganen über zwei Wege, die 2 dimensionalen Gelelektrophorese (2DE) und die Fraktionierung mittels anschließender eindimensionaler Gelelektrophorese. Im Folgenden werden die Ergebnisse gegliedert nach den Separationsmethoden beschrieben.

Die zweidimensionale Gelelektrophorese wurde sowohl zur Separation der Proteine aus Blättern als auch aus Körnern verwendet. In Abbildung 3.6 wird beispielhaft das Ergebnis der 2DE aus Fahnenblättern dargestellt. Die Proteine wurden erfolgreich über zwei Dimensionen aufgetrennt und anschließend aus dem Gel herausgeschnitten. Da die Mehrzahl der signifikanten Peaks ein Molekulargewicht unter 30 kDa aufwies, wurden 26 isolierte Proteine in diesem Größenbereich ausgeschnitten (siehe Abb. 3.6).

Als zweite Methode zur Separation der Proteine wurde eine Fraktionierung mit anschließender eindimensionaler Gelelektrophorese eingesetzt. Die Fraktionierung wurde mittels der löslichen Proben durchgeführt und diente dazu, eine bessere Separation und Aufkonzentrierung der Proteine zu erreichen. Insgesamt kann gesagt werden, dass dies sowohl in den Fahnenblättern als auch den Körnern gelang (Abb. 3.7 und Abb. 3.8).

Bei den Fahnenblattproben waren die einzelnen Banden in allen Fraktionen (F 30, F50-70, F100) gut sichtbar, die Proteine waren somit gut separiert (siehe Abb. 3.7). In Fraktion 30 traten Banden auf, die in den anderen Fraktionen nicht festzustellen waren. Die restlichen Fraktionen wiesen die gleichen Banden und somit Proteine auf. Allerdings wurden diese in den Fraktionen 50 und 60 am besten separiert. Um das maximale Spektrum an Proteinen zu

erreichen, wurden die Banden aus den Fraktionen F30, F40 und F50 ausgeschnitten. Zusätzlich zu den Proteinbanden wurde ein Gelstück vom Randbereich als Nullprobe ausgeschnitten (siehe Abb. 3.7).

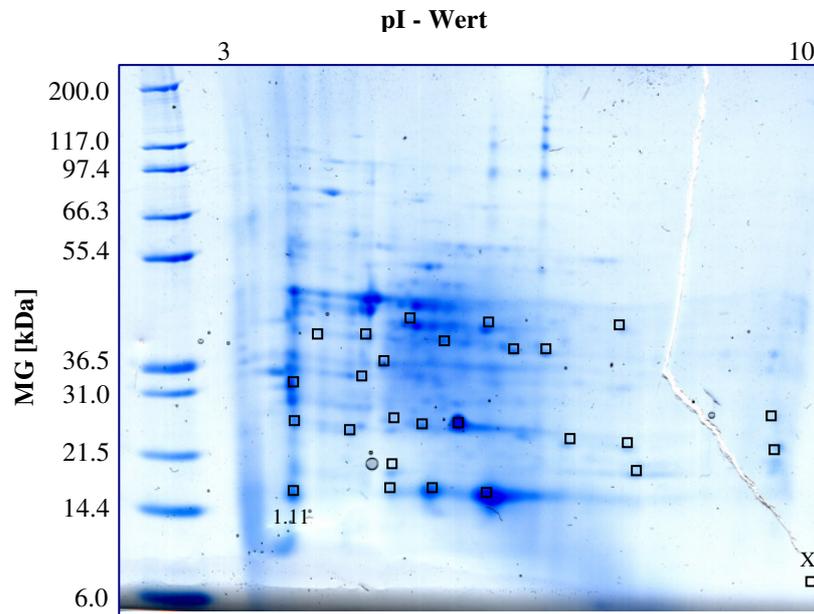


Abb. 3.6 : 2D-Gelelektrophorese der Fahnenblätter (FB). Die ausgeschnittenen Banden wurden markiert und beispielhaft beschriftet (Probe 1.11) (Probe 1.1-1.26, X = Nullwert)

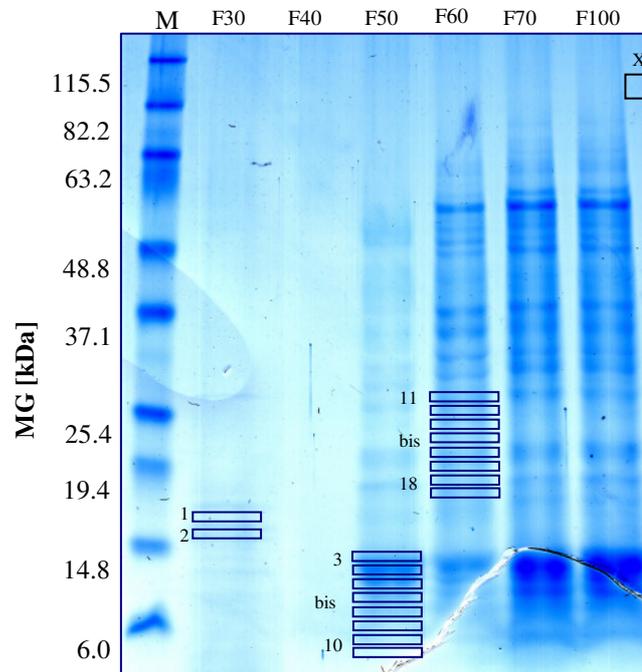


Abb. 3.7: Eindimensionale Gradienten-Gelelektrophorese des Fahnenblatts (FB). Aufgetragen wurden die verschiedenen Fraktionen nach der Fraktionierung mittels *Beads*. Die ausgeschnittenen Banden sind markiert (Probe 1-18, X = Nullwert)

Auch bei der Fraktionierung der Körnerproben (siehe Abb. 3.8) sah man deutliche Konzentrationsunterschiede zwischen den Banden der einzelnen Fraktionen. Die beste Auftrennung und auch gleichzeitig die höchsten Konzentrationen wies die Fraktion F40 auf. Aus diesem Grund wurden die Banden aus dieser Fraktion ausgeschnitten und weiterverarbeitet.

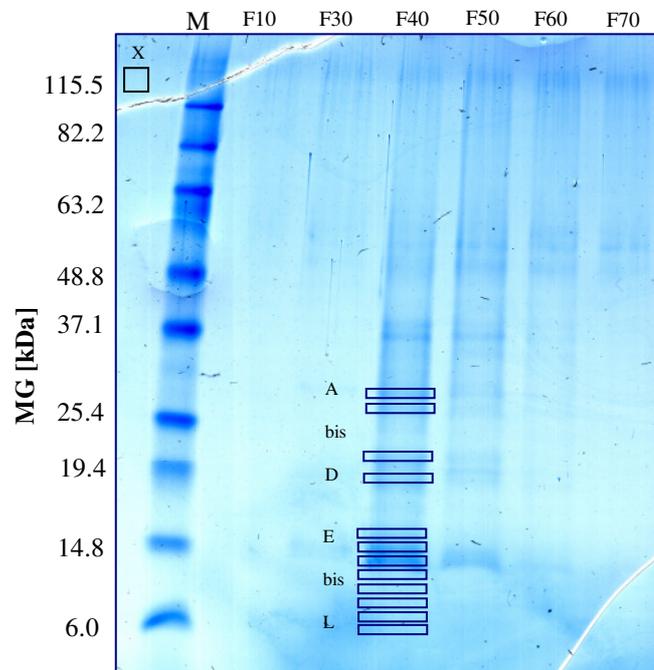


Abb. 3.8: Eindimensionale Gradienten-Gelelektrophorese der Körner. Aufgetragen wurden die verschiedenen Fraktionen nach der Fraktionierung mittels *Beads*.

Verdau und Identifizierung der Proteine

Nach der Separation und dem Ausstechen der Banden wurden die isolierten Proteine tryptisch verdaut. Die Massen der entstandenen Fragmente wurden mittels SELDI-TOF-MS bestimmt und waren die Grundlage zur Identifizierung der Proteine in Internetdatenbanken (siehe Kap. 2.3.2). Die folgenden Abschnitte beschreiben die Ergebnisse zur Aufbereitung und Identifizierung der isolierten Proteine.

Die nachfolgende Abbildung zeigt exemplarisch das Verdauspektrum von Probe A und die Vorgehensweise der Identifizierung. Dieses Protein wurde aus den Fahnenblättern mittels eindimensionaler Gradienten-Gelelektrophorese (s. o.) separiert. Das Verdauspektrum A wurde mit der Nullprobe, einem Gelstück ohne Protein, sowie mit den Verdauspektren anderer Banden verglichen, um probenspezifische Signale zu detektieren (siehe Abb. 3.9). Im Beispielspektrum der Probe A wurden sechs probenspezifische Signale bestimmt, die zur Identifizierung des Proteins A in Internetdatenbanken genutzt wurden. Hierbei wurden die detektierten Massen mit den in den Datenbanken vorhandenen Proteinmassen verglichen.

Als Vergleichsarten wurden *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* sowie die Gruppe „restliche Viridiplantae“ (Grüne Pflanzen, inklusive *Triticum aestivum*) genutzt.

Um die bei einer Datenbankrecherche identifizierten Proteine zukünftig zu verifizieren, sollten die Resultate mit einer weiteren unabhängigen Methode, wie etwa mit einem Antikörpernachweis, überprüft werden. Da sich die vorliegende Arbeit schwerpunktmäßig mit der Neu-etablierung der SELDI-TOF-MS-Methodik für Pflanzenmaterial beschäftigt hat, muss die Entwicklung und Anwendung geeigneter Kontrolluntersuchungen ein wichtiger Bestandteil in der Fortführung der Arbeiten sein.

Aufgrund der noch ausstehenden Etablierung qualitätsgesicherter Gegenprüfungen liefern die nachfolgenden Ergebnisse erste stichhaltige Indizien zur Identität der Proteine.

Die Recherche ergab folgende Ergebnisse: Insgesamt konnten drei Proteine identifiziert werden, von denen eins in den Fahnenblättern und zwei in den Körnern von Sommerweizen vorkamen. Alle diese Proteine wurden aufgrund erhöhter CO₂-Konzentrationen hinsichtlich ihrer relativen Konzentrationen beeinflusst (siehe Tab. 3.11).

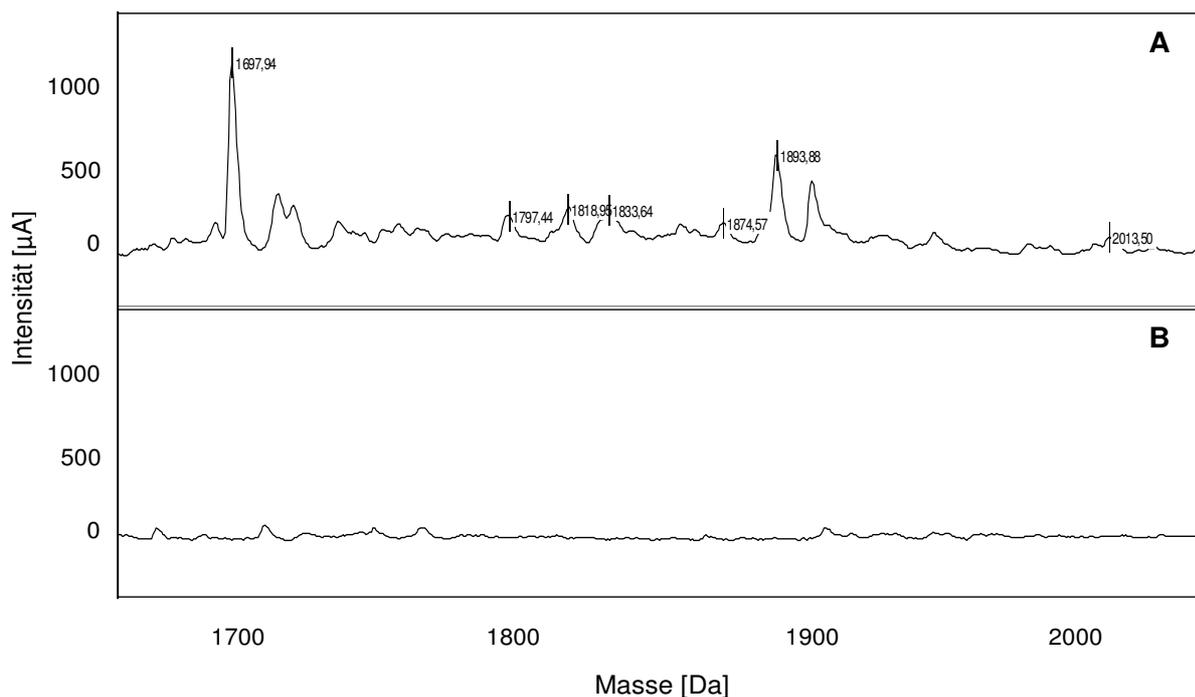


Abb. 3.9: Verdaupektrum der Probe A (A) und des Nullwertes (B). In A wurden einige probenspezifische Peaks detektiert.

In den Fahnenblättern wurde die LRR-Kinase (Nr. 1.11) identifiziert. Dieses Protein ist mit einer Leucin-reichen Region (LRR = leucin rich repeats) ausgestattet, die für ihre Beteiligung an Protein-Protein-Interaktionen oder Interaktionen mit Pathogenen bekannt ist. Darüber hinaus besitzt das Protein noch eine Kinasefunktion und reguliert damit die enzymatische Aktivität anderer Proteine. Das Enzym besitzt damit eine wichtige Rolle im Stoffwechsel der

Pflanzen. Die LRR-Kinase wurde in den untersuchten Fahnenblättern durch erhöhte CO₂-Konzentrationen zum Zeitpunkt der Blüte und der Fruchtentwicklung vermindert gebildet. Darüber hinaus wurde auch die relative Konzentration eines Proteins in Blatt 7 mit dem gleichen Molekulargewicht (10,53 kDa) während der Blüte reduziert.

In den Körnern wurde das Protein PR 4 (*pathogenesis related protein 4*) nachgewiesen. Interessanterweise ist auch dieses Protein bei der Abwehrreaktion der Pflanze gegen Pathogenbefall beteiligt. In den exponierten Sommerweizenkörnern wurde eine erhöhte Konzentration dieses Proteins zum Zeitpunkt der Milchreife festgestellt.

Zusätzlich wurde ein weiteres Protein in den Körnern identifiziert. Es handelt sich um den *putative sucrose-H⁺ symporter*. Dieses Protein ist für den Saccharose-Transport in die Zellen verantwortlich. Die erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen bewirkten eine Verminderung dieses Proteins in Weizenkörnern, und zwar zum Zeitpunkt der Milchreife (99 TNA).

Tab. 3.11: Identifizierung einiger Proteine in Fahnenblättern (FB) und Körnern (Kö) von Sommerweizen. Diese Ergebnisse stammen aus der Internetrecherche mittels ProFound, wobei die Proteine mit den größten Übereinstimmungen dargestellt werden. (Nr. = Bezeichnung für die Bande im Gel, MG ex. = die mittels SELDI TOF-MS bestimmte Masse, MG th. = theoretische Masse (Quelle: www.expasy.org), pI ex. = pI-Wert aufgrund der Chipoberfläche, pI th = theoretischer pI-Wert (Quelle: www.expasy.org), % coverage = proz. Übereinstimmung der gemessenen und der theoretischen Fragmentgrößen, ● = Intensität ist in der FACE-Behandlung signifikant erhöht, ○ = Intensität ist in der FACE-Behandlung signifikant erniedrigt)

Nr.	Pfl. - Teil	MG ex. [kDa]	MG th. [kDa]	pI ex.	pI th.	Proteinname	Art	% coverage	CO ₂ Effekt
1.11	FB	10,53	10,48	≤ 7	6,4	LRR-Kinase Protein (Fragment)	<i>Glycine max.</i>	37	○
H	Kö	13,43	13,50	≤ 7	7,1	PR 4	<i>Triticum aestivum</i>	35	●
G	Kö	29,34	29,47	≤ 7	5,8	putative sucrose - H ⁺ symporter (Fragment)	<i>Medicago trunculata</i>	16	○

Kurzzusammenfassung II – Identifizierung von Proteinen in Sommerweizen

- ❖ Die Identifizierung einiger Proteine wurde mittels zweier Separationsmethoden erfolgreich durchgeführt.
- ❖ Insgesamt wurden in den Sommerweizenpflanzen drei Proteine identifiziert, deren relative Konzentrationen aufgrund der CO₂-Exposition beeinflusst wurden.
- ❖ In den Fahnenblättern wurde die relative Konzentration der LRR-Kinase zum Zeitpunkt der Blüte und der Fruchtentwicklung signifikant erniedrigt. Auch in Blatt 7 kam es während der Blüte zu einer Konzentrationserniedrigung dieses Proteins.
- ❖ Während der Kornentwicklung wurde das Protein PR4, welches bei Pathogenbefall gebildet wird, aufgrund der Kohlendioxid-Behandlung erhöht.
- ❖ Darüber hinaus wurde die relative Konzentration eines Transportproteins (*putative sucrose-H⁺-symporter*) in den Körnern durch die erhöhten CO₂-Konzentrationen vermindert.

3.1.2 PHYSIOLOGISCHE REAKTIONEN AUF ERHÖHTE CO₂-KONZENTRATIONEN

In diesem Kapitel werden die physiologischen Reaktionen des Sommerweizens auf erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen beschrieben.

Diese beinhalten die Untersuchungen zur Konzentration an löslichem Protein sowie zur Stickstoff- und Kohlenstoff-Konzentration in den Blättern verschiedenen Alters und den Körnern von *Triticum aestivum*. Darüber hinaus wurde die relative Chlorophyll a-Konzentration der Blätter an mehreren Zeitpunkten bestimmt. Zusätzlich dazu werden die Ergebnisse zur Biomasse der einzelnen Pflanzenfraktionen von Sommerweizen während der Vegetationsperiode präsentiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels eines Regressionsmodells (General Regression Model). Hierbei wurden Einflüsse der Hauptfaktoren „Tage nach der Aussaat (TNA)“, „CO₂-Behandlung“ und der Interaktion „TNA* CO₂-Behandlung“ auf die jeweiligen physiologischen Wirkungsparameter bestimmt. Darüber hinaus lieferten multiple Vergleichstests ergänzende Informationen zu den Resultaten der GRMs. Die wichtigsten signifikanten Effekte werden in den folgenden Kapiteln 3.1.2.1 bis 3.1.2.4 präsentiert, die restlichen Resultate sind dem Anhang (siehe Kap. 10) zu entnehmen.

3.1.2.1 Konzentration an löslichen Proteinen in Sommerweizen

Die Konzentration an löslichen Proteinen wurde an den Blättern und Körnern von Sommerweizen bestimmt. In den folgenden Abschnitten werden zunächst die Ergebnisse der Blätter, beginnend mit dem jüngsten Blatt, vorgestellt. Anschließend werden die Reaktionen der Konzentration an löslichen Proteinen der Körner beschrieben.

Proteinkonzentrationen in Blättern

Die Proteinkonzentrationen der Fahnenblätter wurden an fünf Zeitpunkten bestimmt. Sie betragen während der Untersuchungsperiode Konzentrationen zwischen 3,5 und 14 mg Protein pro g Frischgewicht (FG). Der Faktor „TNA“ wirkte sich mit einer sehr hohen Varianzaufklärung von 80,02 % signifikant auf die Proteinkonzentrationen in den Fahnenblättern aus (siehe Tab. 3.12) Hierbei nahm die Konzentration zum Zeitpunkt der Milchreife (99 TNA) signifikant ab und erreichte zur späten Milchreife (106 TNA) das Minimum (siehe Abb. 3.10 A). Während der Blüte (86 TNA) und der Fruchtbildung (92 TNA) erreichte die Proteinkonzentration in den Fahnenblättern die höchsten Werte. An den einzelnen Untersuchungsterminen wurden keine signifikanten Änderungen in der Proteinkonzentration aufgrund der Kohlendioxid-Behandlung festgestellt (siehe Abb. 3.10 A). Allerdings bewirkte der Faktor „CO₂-Behandlung“ summierend über alle Termine eine signifikante Veränderung

der Konzentration an löslichen Proteinen in den Fahnenblättern (siehe Tab. 3.12). Es kam aufgrund der erhöhten CO₂-Konzentrationen zu einer Erniedrigung der Konzentrationen. Dieser Effekt war allerdings mit einer Varianzaufklärung von nur 2,01% sehr gering. Die Interaktion „CO₂-Begasung*TNA“ zeigte keinen Effekt auf die Konzentration an löslichen Proteinen in den untersuchten Fahnenblättern (siehe Tab. 3.12).

Die Proteinkonzentrationen von Blatt 7 wurden an den ersten vier Untersuchungszeitpunkten (78 bis 99 TNA) bestimmt. Sie schwankten zwischen 4,8 und 6,3 mg/g FG, die Variationsbreite war demnach kleiner als die der Fahnenblätter (siehe Abb. 3.10 A, B). Die Tage nach der Aussaat wirkten sich auch in Blatt 7 auf die Konzentration an löslichen Proteinen aus. Im Gegensatz zu den Fahnenblättern nahm die Konzentration allerdings während der Vegetationsperiode signifikant zu. Zum Zeitpunkt der Blüte (86 TNA) wurde in Blatt 7 das Minimum der Proteinkonzentration festgestellt (siehe Abb. 3.10 B). Während der Milchreife und späten Milchreife, 92 und 99 TNA, wurden die höchsten Werte erreicht. Allerdings war der Effekt des Faktors „TNA“ bei Blatt 7 mit 28,29 % deutlich geringer als bei den Fahnenblättern mit 80,06% (siehe Tab. 3.12 & 3.13). Die CO₂-Behandlung bewirkte auch in diesem Blattalter keine signifikanten Änderungen der Proteinkonzentrationen an den einzelnen Untersuchungsterminen (siehe Abb. 3.10 B).

Tab. 3.12: Resultate des General Regression Models (GRM). Dargestellt sind die signifikanten Effekte ($p \leq 0,05$) der Faktoren „TNA (Tage nach der Aussaat)“, „CO₂-Begasung“ und der Interaktion TNA*CO₂-Begasung auf die Konzentration von löslichen Proteinen in Blättern von Sommerweizen (FB = Fahnenblatt, B7 = Blatt7). (○ = die Werte wurden erniedrigt, ● = die Werte wurden erhöht, VA = Varianzaufklärung oder Effektstärke).

	lösl. Protein FB (log x)			lösl. Protein B7		
	p	Einfluss	VA in %	p	Einfluss	VA in %
TNA	0,0000	○	80,06	0,0084	●	28,29
CO ₂ -Begasung	0,0314	○	2,01	0,0085	○	19,75
TNA*CO ₂ -Begasung						
Fehler			17,93			31,76
Modell R ²	0,8207			0,4876		
Modell p	0,0000			0,0018		

Während der Untersuchungsperiode kam es jedoch zu einem kumulativen Effekt der CO₂-Begasung, der sich in einer signifikanten Abnahme der Proteinkonzentration äußerte. Dieser Effekt war mit einer Varianzaufklärung von 19,75% deutlich höher als der beobachtete CO₂-Effekt in den Fahnenblättern (siehe Tab. 3.13). Die Interaktion der beiden Faktoren hingegen wirkte sich nicht signifikant auf die Proteinkonzentrationen in Blatt 7 aus.

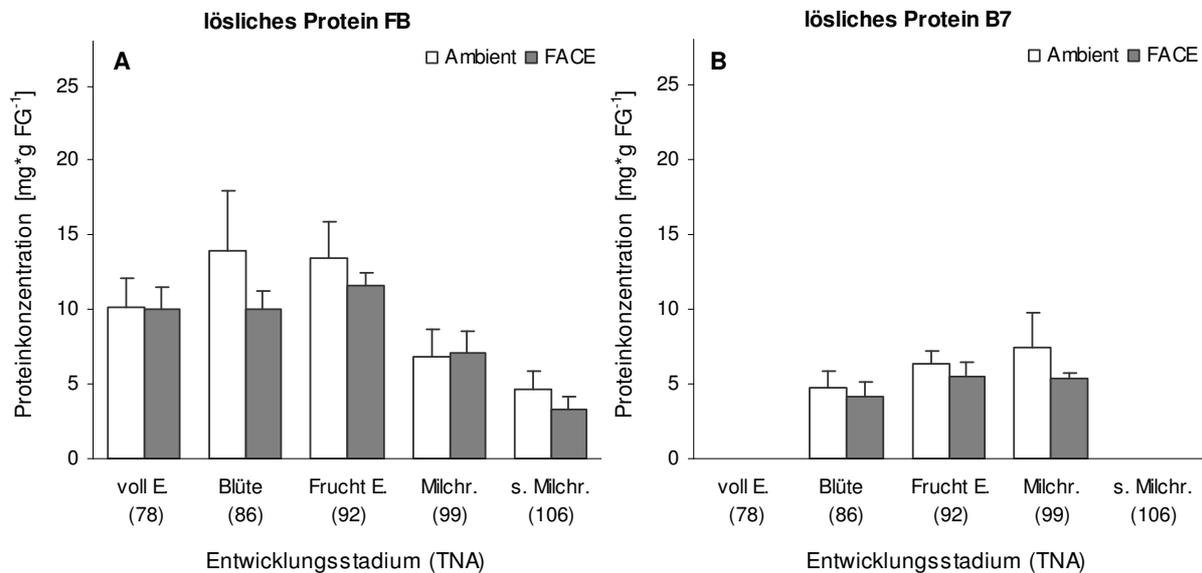


Abb. 3.10: Lösliches Protein in den Fahnenblättern (A) und Blatt 7 (B) von Sommerweizen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen an den beprobten TNA (Tage nach der Aussaat). Die signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen sind mit \star markiert, wobei: \star : $p \leq 0,05$; $\star\star$: $p \leq 0,01$; $\star\star\star$: $p \leq 0,001$. (voll E. = voll entwickelt, Frucht E. = Fruchtentwicklung, Milchr. = Milchreife, s. Milchr. = späte Milchreife).

Die Gesamtkonzentration an löslichen Proteinen in Blatt 6 wurde zum Zeitpunkt der Blüte (86 TNA) bestimmt. Es ließen sich im Vergleich der Behandlungen keine signifikanten Effekte nachweisen. Erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen bewirkten folglich in den physiologisch ältesten Blättern keine Veränderung der Konzentration der löslichen Proteine.

Vergleicht man die Proteinkonzentrationen der verschiedenen Blattaltersstufen, so fällt auf, dass die Werte mit steigendem Blattalter abnahmen. So wies das älteste Blatt 6 die geringsten Proteinkonzentrationen auf, gefolgt von Blatt 7 und den Fahnenblättern (siehe Abb. 3.12 A, C). Insgesamt stellte der Faktor „TNA“ in allen untersuchten Blattaltern den wichtigsten Einflussfaktor dar. Die CO₂-Begasung wirkte sich auch auf die Konzentration an löslichen Proteinen aus, allerdings mit einer geringeren Varianzaufklärung.

Körner

Die Körner von Sommerweizen wurden während der Kornentwicklung, zu den Zeitpunkten der Milchreife (99 TNA) und späten Milchreife (106 TNA), bezüglich ihrer Reaktionen in der Konzentration an löslichen Proteinen untersucht.

Hinsichtlich der beiden Faktoren „Tage nach der Aussaat (TNA)“ und „Kohlendioxid-Behandlung“ konnten keine signifikanten Einflüsse auf die Proteinkonzentration der untersuchten Pflanzen nachgewiesen werden. Auch die Interaktion beider Faktoren bewirkte keine signifikante Beeinflussung der Proteinkonzentration in den Körnern.

3.1.2.2 Kohlenstoff-Konzentration, Stickstoff-Konzentration und C/N-Verhältnis

Die Kohlenstoff-, Stickstoff-Konzentrationen sowie das C/N-Verhältnis wurden an den Blättern und Körnern von Sommerweizen bestimmt. Die Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten nach den Pflanzenfraktionen gegliedert dargestellt.

Blätter

Die Fahnenblätter wurden an den vier Zeitpunkten 78, 86, 92 und 99 TNA beprobt. Die Kohlenstoff-Konzentrationen in den Fahnenblättern schwankten während der Untersuchungsperiode zwischen 44,0 und 44,7 % TG. Die beiden Faktoren „Tage nach der Aussaat“ und „CO₂-Begasung“ hatten keinen Einfluss auf die Kohlenstoff-Konzentration in den Fahnenblättern. Die Interaktion der beiden Faktoren bewirkte keine Veränderung der C-Konzentration. Darüber hinaus konnte an den einzelnen Untersuchungsterminen kein Effekt der CO₂-Behandlung festgestellt werden (siehe Abb. 3.11 A).

Die Stickstoff-Konzentrationen lagen während dieser Zeit zwischen 3,16 und 4,44 % des Trockengewichtes. Die Tage nach der Aussaat wirkten sich mit einer Effektstärke von nahezu 60% signifikant auf die N-Konzentration aus und stellten damit den wichtigsten Effekt dar. Es kam im Zeitverlauf zu einer Abnahme des Stickstoffs in den Fahnenblättern (siehe Tab. 3.13). Darüber hinaus bewirkte der Faktor „CO₂-Behandlung“ in den Fahnenblättern eine signifikante Beeinflussung der Stickstoff-Konzentration mit einer Effektstärke von 6,9% (siehe Tab. 3.13), obwohl an den einzelnen Terminen keine Beeinflussung festzustellen war (siehe Abb. 3.11 C). Die Interaktion der beiden Faktoren bewirkte keine Veränderung der Stickstoff-Konzentrationen in den jüngsten Blättern.

Das C/N-Verhältnis im Fahnenblatt lag zwischen 10,1 und 14,2 und wurde in Abhängigkeit der TNA beeinflusst (siehe Tab. 3.13). Diese Beeinflussung zeigte sich in einer Zunahme des Verhältnisses von Kohlenstoff zu Stickstoff im Zeitverlauf. Dieser Anstieg war durch die

abnehmende Stickstoff-Konzentration und die gleich bleibende Kohlenstoff-Konzentration im Fahnenblatt während der Untersuchungsperiode bedingt. Darüber hinaus hatte auch die CO₂-Begasung Auswirkungen auf das C/N-Verhältnis mit einer Varianzaufklärung von 7 %, während der Fehler bei 35,7 % lag. Die begasten Pflanzen wiesen signifikant erhöhte C/N-Verhältnisse auf (siehe Tab. 3.13 und Abb. 3.11 F). Da an den einzelnen Untersuchungsterminen keine signifikante Änderung im C/N-Verhältnis festgestellt wurde, handelte es sich um einen kumulativen CO₂-Effekt.

Tab. 3.13: Resultate des General Regression Models (GRM). Dargestellt sind die signifikanten Effekte ($p \leq 0,05$) der Faktoren „TNA (Tage nach der Aussaat)“, „CO₂-Begasung“ und der Interaktion TNA*CO₂-Begasung auf die N-Konzentration und das C/N-Verhältnis in Fahnenblättern (FB) von Sommerweizen. (○ = die Werte wurden erniedrigt, ● = die Werte wurden erhöht, VA = Varianzaufklärung oder Effektstärke).

	N-Konzentration FB			C/N FB (log x)		
	p	Einfluss	VA in %	p	Einfluss	VA in %
TNA	0,0000	○	59,05	0,0000	●	57,30
CO ₂ -Begasung	0,0116	○	6,90	0,0129	●	7,00
TNA*CO ₂ -Begasung						
Fehler			13,29			35,70
Modell R ²	0,6595			0,6430		
Modell p	0,0000			0,0000		

Die Kohlenstoff-Konzentration in Blatt 7 wurden weder von den Tagen nach der Aussaat noch von der CO₂-Behandlung signifikant beeinflusst. Dieses Resultat spiegelte sich beim multiplen Vergleich der Werte an den einzelnen Untersuchungsterminen wider (siehe Abb. 3.11 B). Die Interaktion der beiden Faktoren wirkte sich auch nicht signifikant auf die C-Konzentration aus. Die Stickstoff-Konzentration in Blatt 7 zeigte einen ähnlichen zeitlichen Verlauf wie die N-Konzentration in den Fahnenblättern. Allerdings wiesen die Stickstoff-Konzentrationen in dem zeitlich früher entwickelten Blatt 7 mit Werten von 2,19 bis 3,67 % TG geringere N-Konzentrationen auf als die Fahnenblätter (siehe Abb. 3.11 D). In Blatt 7 kam es, wie auch schon im Fahnenblatt, zu einer signifikanten Abnahme der Stickstoff-Konzentrationen in Abhängigkeit von den TNA. Dieser Effekt war mit 50% Varianzaufklärung der bedeutendste Faktor. Allerdings bewirkte auch die CO₂-Begasung mit einer Varianzaufklärung von 17,7 % eine signifikante Beeinflussung der N-Konzentration in Blatt 7 (siehe Tab. 3.14). Hierbei wurde die N-Konzentration insbesondere bei der Blüte des Sommerweizens aufgrund der CO₂-Begasung signifikant erniedrigt (siehe Abb. 3.11 D).

Das C/N-Verhältnis in Blatt 7 erreichte Werte von 12,3 bis 20,6 und wies damit deutlich höhere Werte auf als die Fahnenblätter (siehe Abb. 3.11 E, F). Die Tage nach der Aussaat hatten mit einer Varianzaufklärung von 50,25% den wichtigsten Einfluss auf das Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff in Blatt 7. Hierbei stieg das Verhältnis im zeitlichen Verlauf der Untersuchungsperiode signifikant an (siehe Tab. 3.14). Darüber hinaus bewirkten die erhöhten CO₂-Konzentrationen eine Erhöhung des C/N-Verhältnisses in Blatt 7 (siehe Tab. 3.14). Diese signifikante Änderung des C/N-Verhältnisses wurde, wie auch in den Fahnenblättern, durch die signifikante Abnahme der Stickstoff-Konzentration bedingt. Mittels eines multiplen Vergleichstests konnten insbesondere während der Blüte und Fruchtentwicklung signifikante Unterschiede aufgrund der CO₂-Behandlung festgestellt werden (siehe Abb. 3.11 F).

Tab. 3.14: Resultate des General Regression Models (GRM). Dargestellt sind die signifikanten Effekte ($p \leq 0,05$) der Faktoren „TNA (Tage nach der Aussaat)“, „CO₂-Begasung“ und der Interaktion TNA*CO₂-Begasung auf die N-Konzentration und das C/N-Verhältnis in Blatt 7 (B7) von Sommerweizen. (○ = die Werte wurden erniedrigt, ● = die Werte wurden erhöht, VA = Varianzaufklärung oder Effektstärke).

	N-Konzentration B7			C/N B7 (log x)		
	p	Einfluss	VA in %	p	Einfluss	VA in %
TNA	0,0000	○	55,20	0,0000	●	50,25
CO ₂ -Begasung	0,0001	○	17,72	0,0002	●	18,78
TNA*CO ₂ -Begasung						
Fehler			10,48			30,97
Modell R ²	0,7355			0,6983		
Modell p	0,0000			0,0000		

Das älteste Blatt 6 wurde an zwei Untersuchungsterminen, 78 und 86 TNA, beprobt. Die Kohlenstoff-Konzentrationen in Blatt 6 nahmen von 78 TNA zu 86 TNA zwar leicht ab, es wurde allerdings kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Faktor „TNA“ und der C-Konzentration in diesem Blattalter nachgewiesen. Weiterhin bewirkte auch die CO₂-Behandlung keine Veränderungen der Kohlenstoff-Konzentration. Hinsichtlich der Stickstoff-Konzentration in Blatt 6 ergab sich folgendes Bild. Der Faktor „TNA“ hatte keinen signifikanten Einfluss auf die N-Konzentration. Bezüglich des Faktors „CO₂-Behandlung“ zeigte der Stickstoff in Blatt 6 keine Veränderungen in der Konzentration. Diese Ergebnisse spiegelten sich im C/N-Verhältnis von Blatt 6 wider. Dieser Wirkungsparameter zeigte weder eine signifikante Beeinflussung aufgrund der TNA noch aufgrund der CO₂-Behandlung.

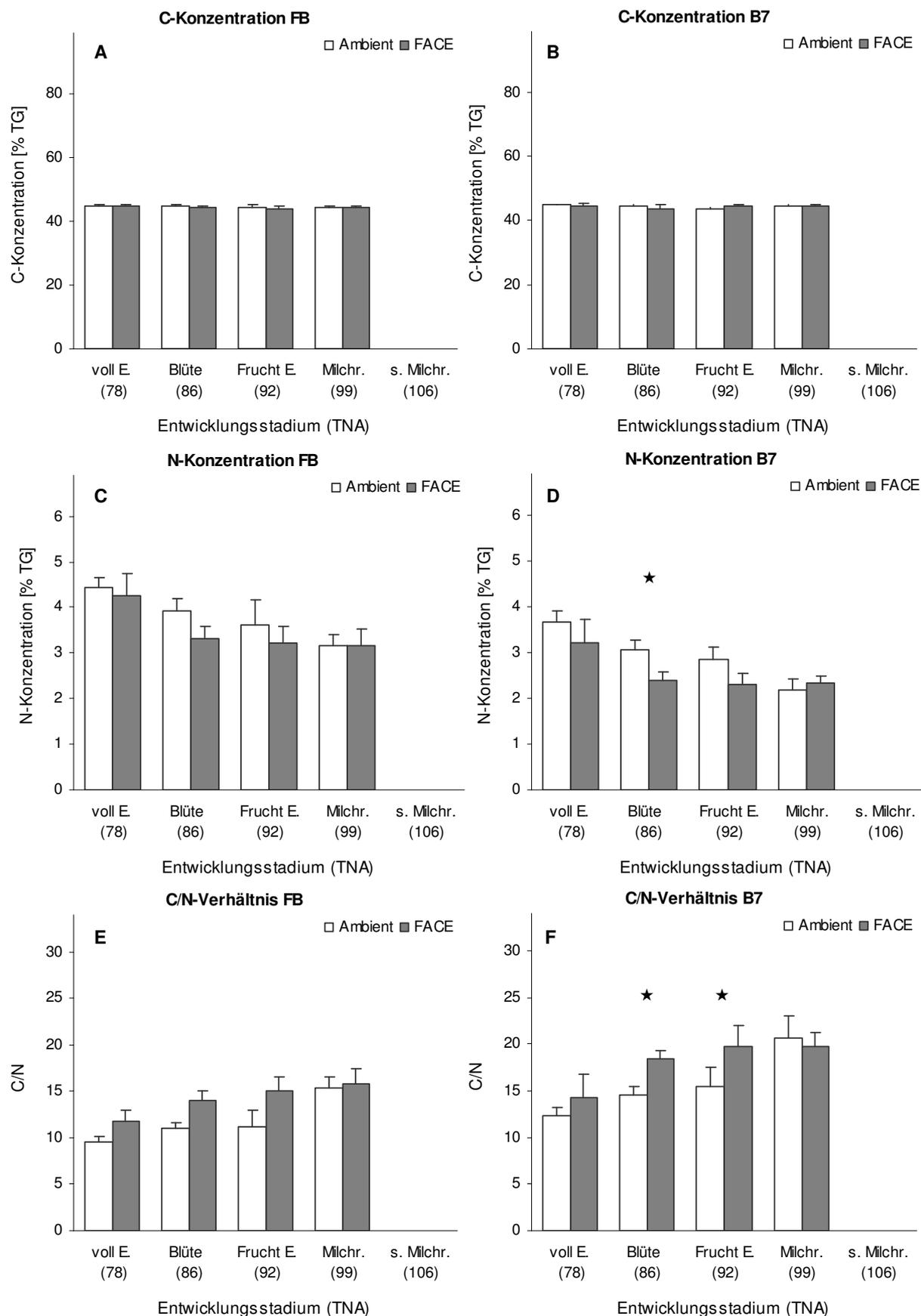


Abb. 3.11: C-Konzentration, N-Konzentration und C/N-Verhältnis in den Fahnenblättern (A,C,E) und Blatt 7 (B,D,F) von Sommerweizen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf parallelen Plots. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen sind mit \star markiert, wobei: \star : $p \leq 0,05$; $\star\star$: $p \leq 0,01$; $\star\star\star$: $p \leq 0,001$. (voll E. = voll entwickelt, Frucht E. = Fruchtentwicklung, Milchr. = Milchreife, s.Milchr. = späte Milchreife, TNA = Tage nach der Aussaat).

Vergleicht man die Reaktionen der verschiedenen Blattalter auf erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen, fällt auf, dass die beiden jüngeren Blätter (FB und B7) in gleicher Weise reagieren. In beiden Blattaltersstufen kommt es aufgrund der CO₂-Begasung zu einer Erniedrigung der Stickstoff-Konzentration und damit verbunden zu einer Erhöhung des C/N-Verhältnisses. Das älteste Blatt (Blatt 6) hingegen reagierte weder in der Stickstoff- und Kohlenstoff-Konzentration noch im C/N-Verhältnis auf die CO₂-Exposition.

Körner

Die Kohlenstoff-Konzentrationen der Körner lagen zwischen 41,76 % und 42,34 % der Trockenmasse und waren damit geringer als die der Blätter. Es wurde eine signifikante Beeinflussung der Kohlenstoff-Konzentration aufgrund der Tage nach der Aussaat (TNA) nachgewiesen. Die Werte nahmen vom Zeitpunkt der Fruchtbildung (92 TNA) bis zur Milchreife (99 TNA) zu, anschließend nahmen sie wieder ab (siehe Tab. 3.15). Im Gegensatz dazu hatte die CO₂-Behandlung weder an den einzelnen Untersuchungsterminen noch kumulativ einen Einfluss auf die Kohlenstoff-Konzentration der Körner (siehe Tab. 3.15 & Abb. 3.12 A). Die Interaktion „TNA* CO₂-Behandlung“ bewirkte zudem keine Veränderung der C-Konzentrationen der Körner (siehe Tab. 3.15).

Die Stickstoff-Konzentration betrug in den Weizenkörnern zwischen 2,6 % TG am ersten und 1,9 % TG am letzten Untersuchungstermin, es kam also im Verlauf der Kornentwicklung zu einer signifikanten Abnahme der Stickstoff-Konzentration. So beeinflussten die TNA mit einer Effektstärke von 71,82% die N-Konzentration der Weizenkörner (siehe Tab. 3.15). Die erhöhten CO₂-Konzentrationen bewirkten keine Veränderung der Stickstoff-Konzentration der Körner (siehe Tab. 3.15 & Abb. 3.12 B). Darüber hinaus zeigten die beiden Faktoren „TNA“ und „CO₂-Behandlung“ in Interaktion keinen Einfluss auf die N-Konzentration. In den Körnern stieg das C/N- Verhältnis im Laufe des Versuchs signifikant an, es wurden Werte zwischen 15,9 % und 21,3 % erreicht. Der Effekt der TNA wies eine relativ hohe Varianzaufklärung von 71,86 % auf. Bezüglich der CO₂-Behandlung und der Interaktion TNA*CO₂-Begasung konnte kein signifikanter Unterschied im C/N-Verhältnis der Weizenkörner ermittelt werden (siehe Tab. 3.15 & Abb. 3.12 C).

Tab. 3.15: Resultate des General Regression Models (GRM). Dargestellt sind die signifikanten Effekte ($p \leq 0,05$) der Faktoren „TNA (Tage nach der Aussaat)“, „CO₂-Begasung“ und der Interaktion TNA*CO₂-Begasung auf die C-, N-Konzentration und das C/N-Verhältnis in Körnern (Kö) von Sommerweizen. (○ = die Werte wurden erniedrigt, ● = die Werte wurden erhöht, VA = Varianz- aufklärung oder Effektstärke).

	C-Konzentration Kö			N-Konzentration Kö			C/N Kö		
	p	Einfluss	VA in %	p	Einfluss	VA in %	p	Einfluss	VA in %
TNA	0,0001	○●	50,66	0,0000	○	71,82	0,0000	●	71,86
CO ₂ -Begasung									
TNA*CO ₂ -Begasung									
Fehler			1,96			2,89			28,14
Modell R ²	0,5066			0,7182			0,7186		
Modell p	0,0001			0,0000			0,0000		

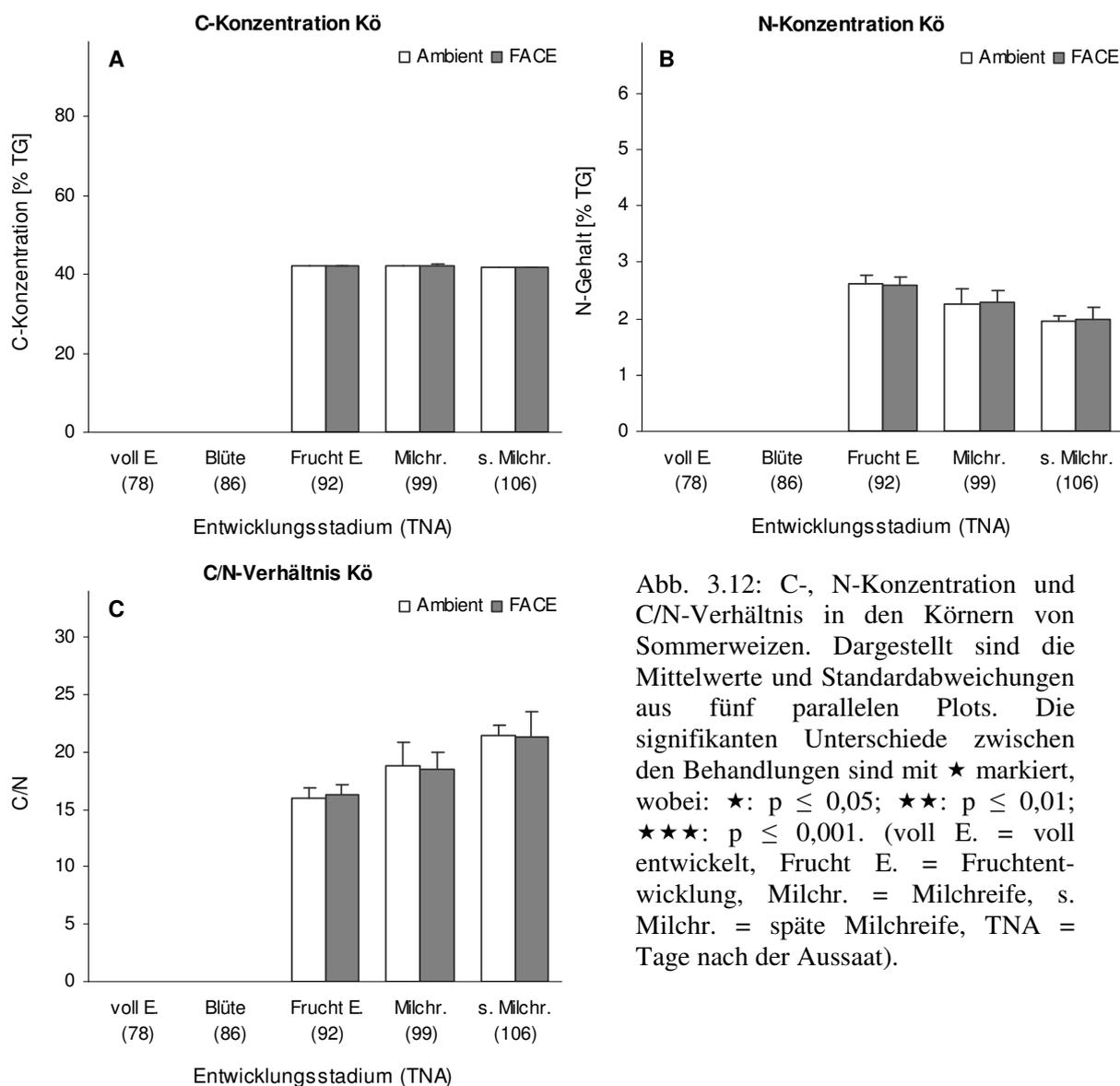


Abb. 3.12: C-, N-Konzentration und C/N-Verhältnis in den Körnern von Sommerweizen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf parallelen Plots. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen sind mit ★ markiert, wobei: ★: $p \leq 0,05$; ★★: $p \leq 0,01$; ★★★: $p \leq 0,001$. (voll E. = voll entwickelt, Frucht E. = Fruchtentwicklung, Milchr. = Milchreife, s. Milchr. = späte Milchreife, TNA = Tage nach der Aussaat).

3.1.2.3 Relative Chlorophyll a-Konzentration

Der SPAD-Wert wurde an den Fahnenblättern sowie an Blatt Nummer 3, 5, und 7 von Sommerweizen an mehreren Terminen während der Untersuchungsperiode bestimmt.

Die Tage nach der Aussaat wirkten sich mit einer sehr geringen Varianzaufklärung von 5,9 % signifikant auf die SPAD-Werte des Fahnenblattes aus. Es kam während der Untersuchungsperiode zu einer signifikanten Abnahme der relativen Chlorophyll a-Konzentration (siehe Tab. 3.16). Im Gegensatz dazu wirkte sich die CO₂-Behandlung weder an den einzelnen Terminen noch summierend über die Untersuchungstermine signifikant auf die SPAD-Werte der Fahnenblätter aus (siehe Tab. 3.16 & Abb. 3.13 A). Auch die Interaktion „TNA*CO₂-Behandlung“ blieb ohne Einfluss auf diesen Parameter (siehe Tab 3.16).

In dem physiologisch älteren Blatt 7 wiesen die SPAD-Werte ebenfalls eine Beeinflussung aufgrund der TNA auf. In diesem Blattalter kam es zu einer Abnahme der Werte im Zeitverlauf. Darüber hinaus bewirkte der Faktor „CO₂-Behandlung“ summierend über die Untersuchungstermine eine signifikante Abnahme der relativen Chlorophyll a-Konzentration in Blatt 7. Die Varianzaufklärung dieses Effektes lag bei 5,65 % und damit unter der Varianzaufklärung des TNA-Effektes mit 13,53 % (siehe Tab.3.16 & Abb. 3.14 C, D). Mittels des multiplen Vergleichstests wurde zusätzlich 79 TNA eine signifikante Erniedrigung des SPAD-Wertes in den behandelten Pflanzen nachgewiesen (siehe Abb. 3.13 B). Die Interaktion TNA*CO₂-Behandlung hatte auch in diesem Blattalter keine Auswirkungen auf die SPAD-Werte (siehe Tab. 3.16).

Tab. 3.16: Resultate des General Regression Models (GRM). Dargestellt sind die signifikanten Effekte ($p \leq 0,05$) der Faktoren „TNA (Tage nach der Aussaat)“, „CO₂-Begasung“ und der Interaktion TNA*CO₂-Begasung auf den SPAD-Wert in Fahnenblättern (FB) und Blatt 7 (B7) von Sommerweizen. (○ = die Werte wurden erniedrigt, ● = die Werte wurden erhöht, VA = Varianzaufklärung oder Effektstärke).

	SPAD FB			SPAD B7		
	p	Einfluss	VA in %	p	Einfluss	VA in %
TNA	0,0165	●	5,69	0,0000	○	13,53
CO ₂ -Begasung				0,0008	○	5,65
TNA*CO ₂ -Begasung						
Fehler			94,31			80,83
Modell R ²	0,0569			0,1842		
Modell p	0,0165			0,0000		

In Blatt 5 wurden ähnlich hohe SPAD-Werte wie in Blatt 7 und Blatt 3 festgestellt, diese lagen zwischen 38,14 und 47,36. Auch in dieser Blattaltersstufe zeigte sich eine signifikante Abnahme der relativen Chlorophyll a-Konzentration während des Untersuchungszeitraums mit einer Effektstärke von 51,64%. Allerdings wirkten sich weder die CO₂-Behandlung noch die Interaktion „TNA*CO₂-Behandlung“ in diesem Blattalter signifikant auf die SPAD-Werte aus (siehe Tab. 3.17 & Abb. 3.13 C).

Die SPAD-Werte für Blatt 3 wurden an drei Untersuchungsterminen aufgenommen. Hierbei zeigte sich zunächst ein signifikanter Abfall der Chlorophyll a-Konzentration im Zeitverlauf, anschließend kam es zu einer Erhöhung der Werte. Es ist allerdings zu beachten, dass die Varianzaufklärung dieses Effektes bei 31,22% lag, während der Fehler eine Varianzaufklärung von 68,78% aufwies. Die CO₂-Begasung hatte, wie auch die Interaktion der beiden Faktoren, keinen signifikanten Einfluss auf den SPAD-Wert in Blatt 3 (siehe Tab. 3.17 & Abb. 3.13 D).

Tab. 3.17: Resultate des General Regression Models (GRM). Dargestellt sind die signifikanten Effekte ($p \leq 0,05$) der Faktoren „TNA (Tage nach der Aussaat)“, „CO₂-Begasung“ und der Interaktion TNA*CO₂-Begasung auf den SPAD-Wert in Blatt 5 (B5) und Blatt 3 (B3) von Sommerweizen. (○=die Werte wurden erniedrigt, ●=die Werte wurden erhöht, VA=Varianzaufklärung oder Effektstärke).

	SPAD B5			SPAD B3		
	p	Einfluss	VA in %	p	Einfluss	VA in %
TNA	0,0000	○	51,64	0,0000	○●	31,22
CO ₂ -Begasung						
TNA*CO ₂ -Begasung						
Fehler			48,36			68,78
Modell R ²	0,5164			0,3004		
Modell p	0,0000			0,0000		

Im Vergleich der SPAD-Werte der unterschiedlichen Blattalter fällt auf, dass die relativen Chlorophyll a-Konzentrationen mit zunehmendem Blattalter abnahmen. Die beiden jüngsten untersuchten Blattalter, das Fahnenblatt und Blatt 7, wiesen unterschiedlich hohe Werte auf. So lagen die SPAD-Werte bzw. relativen Chlorophyll a-Konzentrationen von Blatt 7 zwischen 38 und 47, während das Fahnenblatt Höchstwerte von bis zu 51,8 aufwies. Die Chlorophyll a-Konzentration aller untersuchten Blattalter war abhängig von den Tagen nach der Aussaat und damit von dem physiologischen Zustand der Blätter.

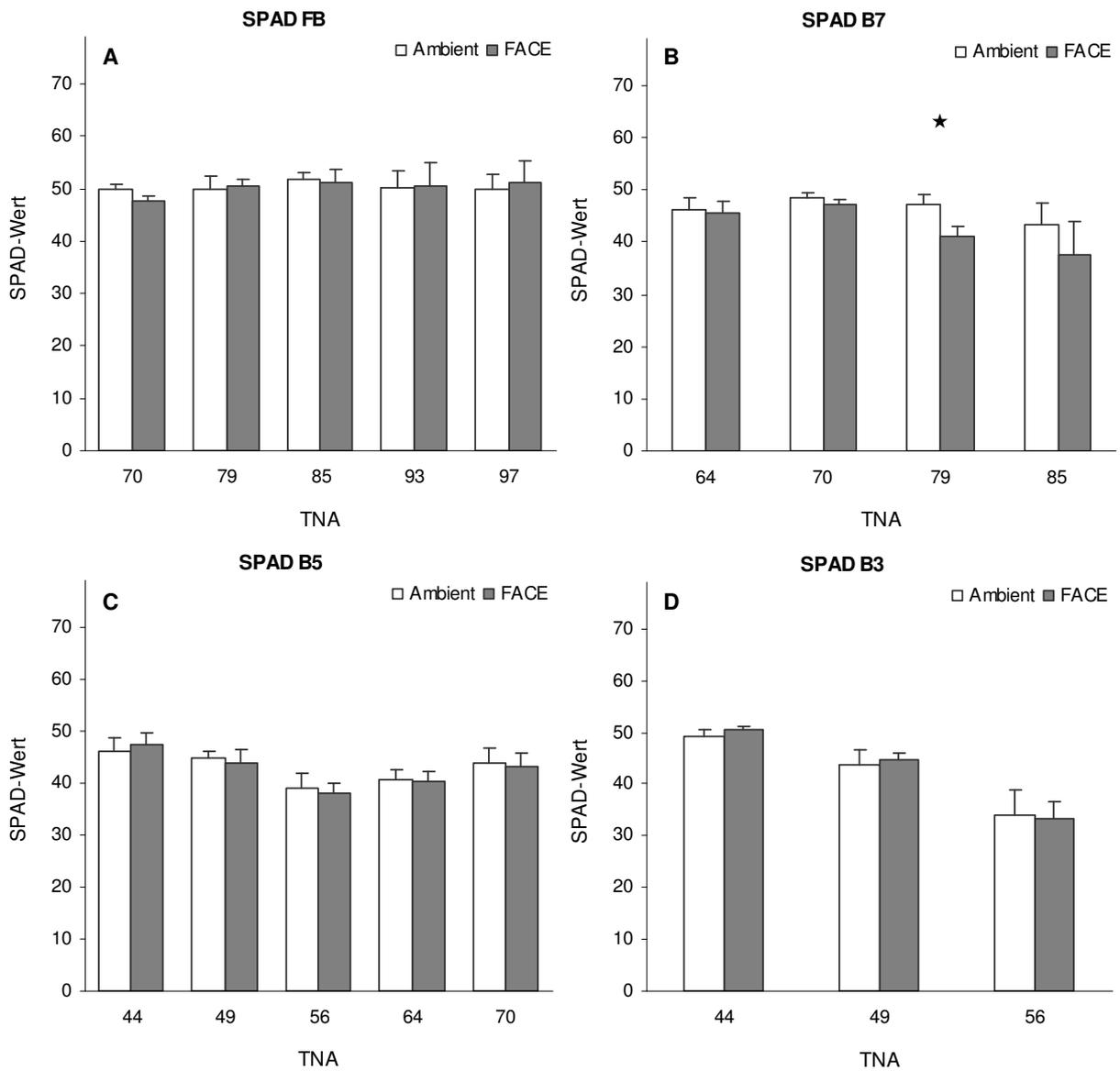


Abb. 3.13: SPAD-Werte in Fahnenblättern und Blatt 7 von Sommerweizen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf parallelen Plots. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen sind mit \star markiert, wobei: \star : $p \leq 0,05$; $\star\star$: $p \leq 0,01$; $\star\star\star$: $p \leq 0,001$. (voll E. = voll entwickelt, Frucht E. = Fruchtentwicklung, Milchr. = Milchreife, s.Milchr. = späte Milchreife, TNA = Tage nach der Aussaat).

3.1.2.4 Oberirdische Biomasse des Sommerweizens

Die Biomasse des Sommerweizens wurde im Jahr 2004 an fünf Untersuchungsterminen (78 bis 106 TNA) bestimmt. In den folgenden Abschnitten wird die Biomasse des Haupttriebes von Sommerweizen präsentiert, wobei die Biomasse der Pflanzenfraktionen Körner, Fahnenblatt, Blatt 7 und Blatt 6 im Einzelnen beschrieben werden. Darüber hinaus werden die Resultate der Biomasse der Ähren und Blätter pro Pflanze sowie der Gesamtpflanze dargestellt.

Biomasse des Haupttriebs

Die Biomasse des Fahnenblattes wurde von dem Faktor „TNA“ mit einer Varianzaufklärung von 50,94 % beeinflusst. Ab dem Zeitpunkt der Kornentwicklung (Milchreife und späte Milchreife) kam es zu einer signifikanten Abnahme der Fahnenblatt-Biomasse (siehe Tab. 3.18 & Abb. 3.14 A). Hinsichtlich der CO₂-Begasung war weder summierend über die Vegetationsperiode noch an den einzelnen Untersuchungsterminen ein Einfluss auf die Biomasse des jüngsten Blattes nachzuweisen (siehe Tab. 3.18 & Abb. 3.14 A). Die Interaktion TNA*CO₂-Begasung wirkte sich jedoch signifikant auf die Biomasse des Fahnenblatts aus, die Effektstärke lag bei 11,44%. Betrachtet man die Effekte an den einzelnen Untersuchungsterminen genauer, stellt man Folgendes fest. 106 TNA unterschied sich die Biomasse der behandelten Fahnenblätter von der Biomasse an allen anderen Terminen (siehe Anhang). Festzuhalten ist, dass an diesem Untersuchungstermin kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen feststellbar ist. Darüber hinaus unterschied sich die Biomasse auch an keinem der anderen untersuchten TNAs zwischen den CO₂-Behandlungen (siehe Abb. 3.14 A).

Tab. 3.18: Resultate des General Regression Models (GRM). Dargestellt sind die signifikanten Effekte ($p \leq 0,05$) der Faktoren „TNA (Tage nach der Aussaat)“, „CO₂-Begasung“ und der Interaktion TNA*CO₂-Begasung auf die Biomasse einer Sommerweizenpflanze. (○ = die Werte wurden erniedrigt, ● = die Werte wurden erhöht, VA = Varianzaufklärung oder Effektstärke).

	Biomasse FB			Biomasse B7			Biomasse B6		
	Einfluss	VA in %		p	Einfluss	VA in %	p	Einfluss	VA in %
TNA	0,0000	○	50,94	0,0000	○	56,67	0,0000	○	72,79
CO ₂ -Begasung									
TNA*CO ₂ -Begasung	0,0350		11,44						
Fehler			37,62			43,33			27,21
Modell R ²	0,6036			0,5667			0,7279		
Modell p	0,0000			0,0000			0,0000		

Dieses Resultat weist folglich nicht auf einen systematischen Effekt hin, der aufgrund der erhöhten CO₂-Konzentrationen entstanden ist.

Das früher entwickelte Blatt 7 wies an den ersten beiden Terminen mehr Biomasse auf als das Fahnenblatt. Auch dieses Blattalter nahm jedoch zum Zeitpunkt der Milchreife (99 TNA) signifikant in der Biomasse ab. Insgesamt ergab sich, wie auch schon beim Fahnenblatt, ein signifikanter Einfluss der TNA auf die Biomasse von Blatt 7 mit einer ähnlich hohen Varianzaufklärung von 56,67 %. Ein signifikanter Einfluss des Faktors „CO₂-Begasung“ konnte nicht nachgewiesen werden (siehe Tab. 3.18).

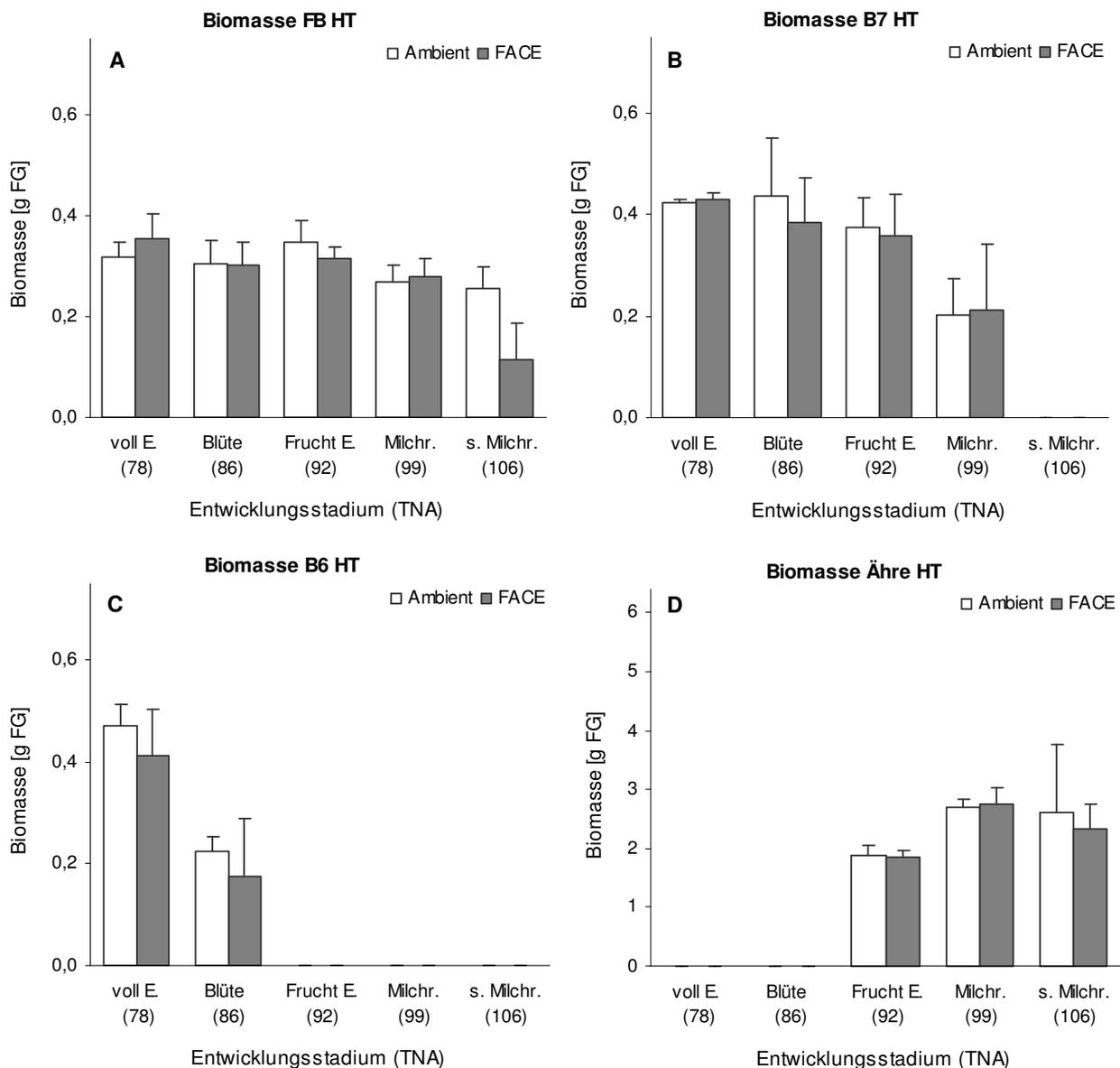


Abb. 3.14: Biomasse des Haupttriebs (HT): Fahnenblatt (A), Blatt 7 (B), Blatt 6 (C), Ähre (D) von Sommerweizen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Werte fünf paralleler Plots. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen sind mit \star markiert, wobei: \star : $p \leq 0,05$; $\star\star$: $p \leq 0,01$; $\star\star\star$: $p \leq 0,001$. (voll E. = voll entwickelt, Frucht E. = Fruchtentwicklung, Milchr. = Milchreife, s.Milchr. = späte Milchreife, TNA = Tage nach der Aussaat).

Auch mit Hilfe des multiplen Vergleichstests an den einzelnen Untersuchungsterminen wurde keine Beeinflussung der Biomasse von Blatt 7 aufgrund der CO₂-Begasung festgestellt. Darüber hinaus bewirkte die Interaktion „TNA* CO₂-Begasung“ keine Veränderungen der Biomasse von Blatt 7 (siehe Tab. 3.18).

Das physiologisch älteste Blatt 6 wurde an zwei Untersuchungsterminen untersucht und wies ebenso wie die jüngeren Blätter eine zeitlich bedingte Abnahme der Biomasse mit einer Effektstärke von 72,79 % auf (siehe Abb. 3.14 C). Zum Zeitpunkt der Blüte (86 TNA) war das Blatt bereits abgestorben. Weder die CO₂-Begasung noch die Interaktion der beiden Faktoren wirkte sich signifikant auf die Biomasse des ältesten Blattes aus.

Die Biomasse der Ähre des Haupttriebes nahm zum Zeitpunkt der Milchreife (99 TNA) leicht zu, es wurde allerdings keine Abhängigkeit der Biomasse von den Tagen nach der Aussaat nachgewiesen. Die CO₂-Begasung wirkte sich weder als kumulativer Faktor noch an den einzelnen Untersuchungsterminen auf die Biomasse der Ähren des Haupttriebes aus (siehe Abb. 3.14 D). Auch die Interaktion beider Faktoren „TNA“ und „CO₂-Begasung“ hatte keinen Einfluss auf die Biomasse der Ähre.

Biomasse einzelner Sommerweizenpflanzen

Die Biomasse der gesamten Blätter pro Pflanze nahm in Abhängigkeit der Tage nach der Aussaat (TNA) signifikant ab. Dieser signifikante Effekt wies eine Varianzaufklärung von 56,15 % auf (siehe Tab. 3.19). Die gesamte Blatt-Biomasse einer Pflanze lag bis zum Zeitpunkt der Milchreife zwischen 1,75 und 2,3 g FG und nahm zum Zeitpunkt der späten Milchreife (106 TNA) signifikant ab (siehe Abb. 3.15 A). Die Kohlendioxid-Behandlung hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Biomasse der Blätter pro Pflanze, ebenso wenig wie die Interaktion der Hauptfaktoren „TNA“ und „CO₂-Begasung“ (siehe Tab. 3.19 & Abb. 3.15 A).

Ab dem Zeitpunkt der Fruchtbildung (92 TNA) nahm die Gesamtbiomasse der Ähren einer Pflanze in beiden Behandlungen signifikant zu. Die Tage nach der Aussaat wirkten sich mit einer sehr hohen Effektstärke von 90,26 % auf die Biomasse der Ähren pro Pflanze aus (siehe Tab. 3.19). Weder mittels des GRMs noch mittels des multiplen Vergleichstests konnte ein signifikanter Einfluss der CO₂-Begasung auf die Biomasse der Ähren pro Pflanze nachgewiesen werden (siehe Tab. 3.19 & Abb. 3.15 B). Die Interaktion „TNA*CO₂-Begasung“ wirkte sich nicht signifikant auf die Biomasse der Ähren pro Pflanze aus (siehe Tab. 3.19).

Die Biomasse der Gesamtpflanzen nahm vom ersten bis zum letzten Untersuchungstermin mit einer Varianzaufklärung von 64,06 % signifikant zu. Die Kohlendioxid-Behandlung wirkte sich jedoch weder als Einzelfaktor noch in Interaktion mit den TNA signifikant auf die

Gesamtbiomasse pro Pflanze aus (siehe Tab. 3.19). Zusätzlich dazu wurde an keinem der Untersuchungstermine ein signifikanter Effekt der Kohlendioxid-Begasung nachgewiesen (siehe Abb. 3.15).

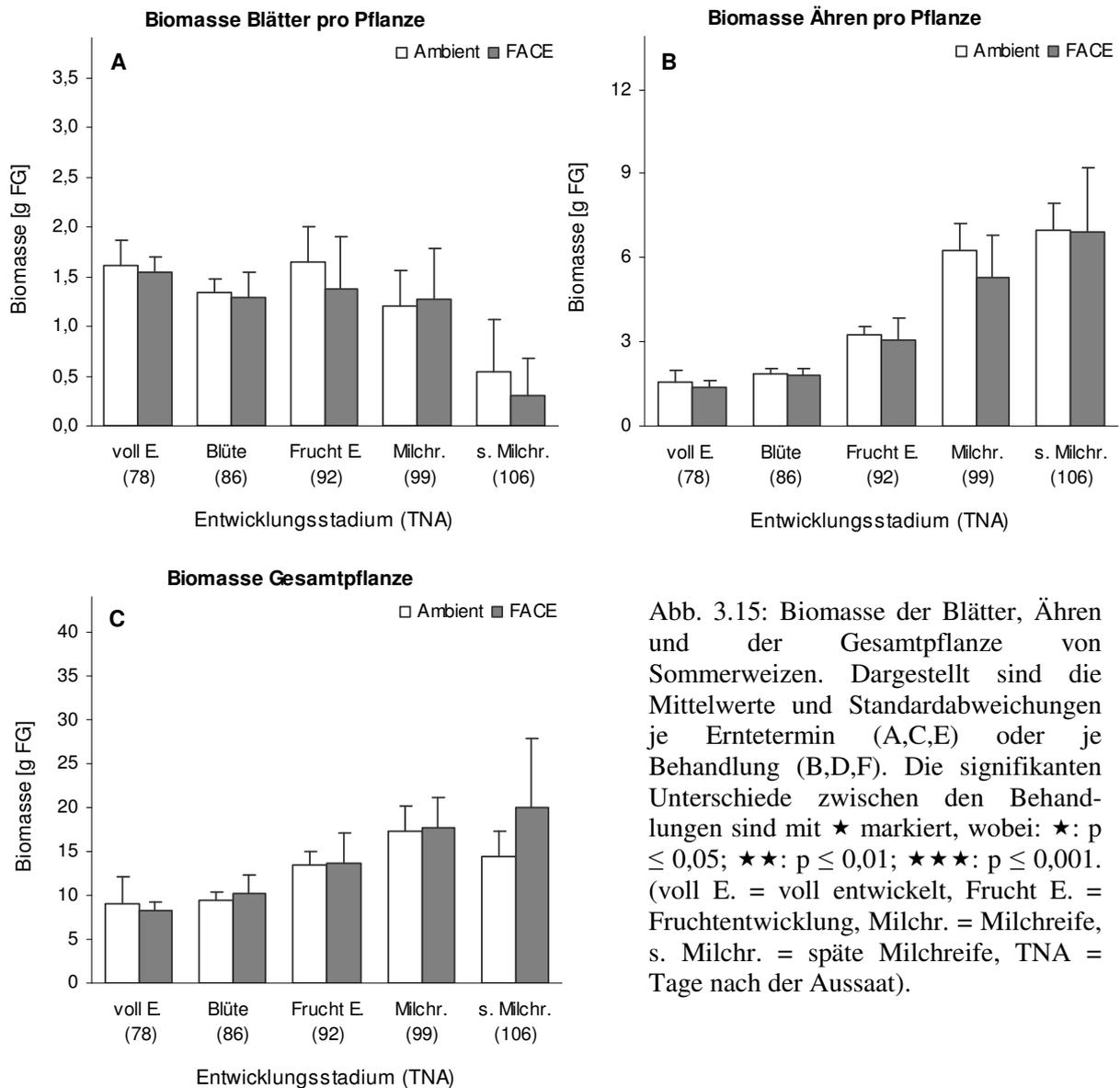


Abb. 3.15: Biomasse der Blätter, Ähren und der Gesamtpflanze von Sommerweizen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen je Erntetermin (A,C,E) oder je Behandlung (B,D,F). Die signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen sind mit \star markiert, wobei: \star : $p \leq 0,05$; $\star\star$: $p \leq 0,01$; $\star\star\star$: $p \leq 0,001$. (voll E. = voll entwickelt, Frucht E. = Fruchtentwicklung, Milchr. = Milchreife, s. Milchr. = späte Milchreife, TNA = Tage nach der Aussaat).

Tab. 3.19: Resultate des General Regression Models (GRM). Dargestellt sind die signifikanten Effekte ($p \leq 0,05$) der Faktoren „TNA (Tage nach der Aussaat)“, „CO₂-Begasung“ und der Interaktion TNA*CO₂-Begasung auf die Biomasse der Fraktionen FB (Fahnenblatt), B7 (Blatt 7) und Blatt 6 (B6) des Haupttriebes von Sommerweizen. (○ = die Werte wurden erniedrigt, ● = die Werte wurden erhöht, VA = Varianzaufklärung oder Effektstärke).

	Biomasse Blätter			Biomasse Ähren			Biomasse Gesamt		
	Einfluss	VA in %		p	Einfluss	VA in %	p	Einfluss	VA in %
TNA	0,0111	○	56,15	0,0000	●	90,26	0,0000	●	64,06
CO ₂ -Begasung									
TNA*CO ₂ -Begasung									
Fehler			43,85			9,74			35,94
Modell R ²	0,3583			0,5066			0,6406		
Modell p	0,0111			0,0001			0,0000		

Kurzzusammenfassung III – Physiologische Parameter in Sommerweizen

- ❖ Erhöhtes CO₂ bewirkte eine Reduktion der Gesamtkonzentration an löslichen Proteinen im Fahnenblatt und in Blatt 7.
- ❖ Die Kohlenstoff-Konzentration wurde in den Blättern und Körnern nicht aufgrund der CO₂-Exposition beeinflusst.
- ❖ Die Stickstoff-Konzentration wurde in zwei Blattalterstufen (FB und B7) signifikant aufgrund der erhöhten CO₂-Konzentrationen erniedrigt. In Blatt 7 wurde die N-Konzentration während der Blüte erniedrigt.
- ❖ Das C/N-Verhältnis wurde in den behandelten Blättern FB und B 7 erniedrigt, Blatt 7 reagierte während der Blüte und Fruchtentwicklung auf die Kohlendioxid-Begasung.
- ❖ Die exponierten Pflanzen zeigten nur in Blatt 7 eine Verminderung des SPAD-Wertes aufgrund der CO₂-Begasung.
- ❖ Darüber hinaus kam es an keinem der Untersuchungstermine zu einer signifikanten Ab- oder Zunahme der Biomasse aufgrund erhöhter Kohlendioxid-Konzentrationen während der Vegetationsperiode.

3.2 WIRKUNGSKRITERIEN IN ACKERSENF (*SINAPIS ARVENSIS*)

Die Reaktionen der Wildkrautart *Sinapis arvensis* auf erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen wurden anhand folgender Wirkungsparameter untersucht. Das erste Kriterium war die Reaktion der Proteinmuster auf erhöhte CO₂-Konzentrationen. Die Ergebnisse dazu werden in Kapitel 3.2.1 dargestellt. Darüber hinaus wurden einige physiologische Reaktionen des Ackersenfs auf die Kohlendioxid-Begasung untersucht (siehe Kap. 3.2.2).

Die Untersuchungen wurden an zwei Zeitpunkten während der Vegetationsperiode 2004 durchgeführt. Die folgenden Ergebnisse werden in Bezug auf die Entwicklungsstadien des Ackersenfs betrachtet. Am ersten Untersuchungszeitpunkt (49 Tage nach der Aussaat) waren die Pflanzen bis zu 50% entwickelt, sie befanden sich folglich noch in der Wachstumsphase. Am zweiten Zeitpunkt, 57 Tage nach der Aussaat, hatten die Pflanzen ihre maximale Blattfläche erreicht und begannen zu blühen.

3.2.1 Proteinmuster in Blättern

Die Reaktionen des Proteinmusters von Ackersenf auf die Kohlendioxid-Begasung wurden an den jüngsten, voll entwickelten Blättern untersucht.

In den Blättern des Ackersenfs wurden an den beiden Untersuchungsterminen insgesamt 94 Signale detektiert. Die Mehrzahl der Peaks, nämlich 66, wies einen pI-Wert im basischen Bereich auf. Zusätzlich dazu wiesen 69 der Peaks ein Molekulargewicht (MG) auf, welches kleiner als 30 kDa war, während die restlichen 25 Proteine bzw. Peptide ein MG zwischen 30 und 70 kDa aufzeigten. Das Spektrum der nachgewiesenen Proteine wurde wie auch bei Sommerweizen nicht durch die erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen beeinflusst.

Allerdings traten einige Reaktionen hinsichtlich der relativen Konzentrationen bzw. Intensitäten der Peaks auf. Während der Entwicklung des Ackersenfs reagierten am ersten Untersuchungstermin, 49 Tage nach der Aussaat (19.5.04), fünf Peaks auf die erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen mit einer Änderung ihrer Intensität (siehe Tab. 3.20). Hierbei wurden die Intensitäten zweier Peaks (8908 und 16866 Da) unter erhöhten CO₂-Konzentrationen erhöht. Interessanterweise handelte es sich bei beiden Peaks um basische Proteine bzw. Peptide. Drei weitere Proteine reagierten auf die CO₂-Exposition mit einer Verminderung ihrer Intensitäten.

Zum Zeitpunkt der vollen Entwicklung des Ackersenfs, am zweiten Untersuchungstermin (57 TNA), konnte kein signifikanter Unterschied in den Intensitäten hinsichtlich der CO₂-Behandlung festgestellt werden.

Tab. 3.20: Signifikant unterschiedlich exprimierte Signale in Blättern von Ackersenf (*Sinapis arvensis*) an Untersuchungstermin eins (49 TNA, 19.5.04). Mittelwerte und Standardabweichungen der Intensitäten sind dargestellt. WCX = weak cation exchanger, SAX = strong anion exchanger, ○ = Intensität ist in der FACE - Behandlung erhöht, ● = Intensität ist in der FACE-Behandlung erniedrigt.

Masse [Da]	Intensität SIN Ambient [μA]	Intensität SIN FACE [μA]	Chipoberfläche	p	CO ₂ - Effekt
7480	184,4 ± 24,5	150,7 ± 23,1	WCX	0,050	○
8908	58,0 ± 27,4	140,0 ± 66,8	SAX	0,028	●
16866	10,0 ± 0,7	13,9 ± 1,9	SAX	0,009	●
29599	7,1 ± 2,0	4,1 ± 1,1	WCX	0,050	○
69328	6,0 ± 1,8	3,7 ± 1,2	SAX	0,028	○

3.2.2 Reaktionen auf physiologischer Ebene

Die Blätter des Ackersenfes wurden während der Entwicklung und zum Zeitpunkt der maximalen Blattfläche hinsichtlich der Veränderungen der Gesamtkonzentration an löslichen Proteinen auf die CO₂-Begasung untersucht. Darüber hinaus wurde die relative Chlorophyll a-Konzentration an mehreren Terminen während der Vegetationsperiode bestimmt. Die Daten dieser Parameter wurden mit Hilfe eines Regressionsmodells sowie multipler Vergleichstests ausgewertet und werden in den Kapiteln 3.2.2.1 und 3.2.2.2 detailliert dargestellt.

3.2.2.1 Konzentration an löslichen Proteinen in Blättern

Die Protein-Konzentrationen des Ackersenfs erreichten zum Zeitpunkt der Entwicklung (49 TNA) auffallend höhere Werte als die Pflanzen voll entwickelt waren (57 TNA) (siehe Abb. 3.19 A).

Die Tage nach der Aussaat (TNA) hatten mit einer Varianzaufklärung von 35,53 % den wichtigsten Einfluss auf die Proteinkonzentrationen der untersuchten Blätter von *Sinapis arvensis*. Hierbei nahmen die Konzentrationen vom ersten bis zum zweiten Untersuchungstermin signifikant ab. Darüber hinaus bewirkten die erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen auch eine Abnahme der Konzentration an löslichen Proteinen mit einer Varianzaufklärung von 14,97 % (siehe Tab. 3.21). Hierbei bewirkte die CO₂-Begasung 49 TNA, während der Wachstumsphase des Ackersenfs, eine Erniedrigung der Konzentration an löslichen Proteinen (siehe Abb. 3.16).

Die beiden Faktoren „TNA“ und „CO₂-Begasung“ hatten in Interaktion keinen Einfluss auf die Konzentration an löslichen Proteinen der untersuchten Ackersenfblätter (siehe Tab. 3.21).

Tab. 3.21: Resultate des General Regression Models (GRM). Dargestellt sind die signifikanten Effekte ($p \leq 0,05$) der Faktoren „TNA (Tage nach der Aussaat)“, „CO₂-Begasung“ und der Interaktion TNA*CO₂-Begasung auf die Konzentration an löslichen Proteinen in Blättern von Ackersenf. (○ = die Werte wurden erniedrigt, ● = die Werte wurden erhöht, VA = Varianzaufklärung oder Effektstärke).

lösliches Protein	p	Einfluss	VA in %
TNA	0,0367	○	35,53
CO ₂ -Begasung	0,0028	○	14,97
TNA*Behandlung			
Fehler			4,18
Modell R2	0,5050		
Modell p	0,0025		

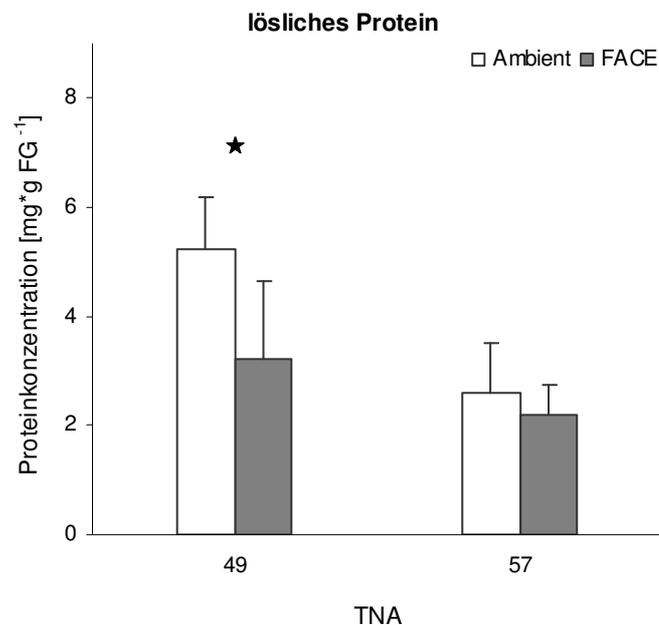


Abb. 3.16: Lösliches Protein in Blättern von Ackersenf. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen an den beiden Untersuchungsterminen (TNA = Tage nach der Aussaat). Die signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen sind mit ★ markiert, wobei: ★: $p \leq 0,05$; ★★: $p \leq 0,01$; ★★★: $p \leq 0,001$.

3.2.3 Relative Chlorophyll a-Konzentration

Die untersuchten Blätter des Ackersenfs wiesen im Mittel niedrigere Chlorophyll a-Konzentrationen auf als die Blätter der Sommerweizenpflanzen.

Das jüngste Blatt 7 (B7) wurde an drei Terminen untersucht und zeigte einen zeitlich bedingten signifikanten Abfall der SPAD-Werte von 41 auf 38. Allerdings lag die Varianzaufklärung dieses Effektes bei nur 11,14 %, während die des Fehlers bei 88,86 % lag (siehe Tab. 3.22). Hinsichtlich der Begasung mit erhöhten CO₂ Konzentrationen konnten weder

mittels des General Regression Models noch mittels des multiplen Vergleichstests in Blatt 7 Auswirkungen auf die SPAD-Werte nachgewiesen werden (siehe Tab. 3.22 & Abb. 3.17 A). Auch die Interaktion der beiden Faktoren hatte in Blatt 7 keinen Einfluss auf die relativen Chlorophyll-Konzentrationen (siehe Tab. 3.22).

Das früher entwickelte Blatt 5 wies im zeitlichen Verlauf eine signifikante Abnahme der Chlorophyll a-Konzentration mit einer Effektstärke von 44,26 % auf. Die CO₂-Behandlung und die Interaktion TNA*CO₂-Begasung hatten wie auch schon in Blatt 7 keinen Einfluss auf die SPAD-Werte (siehe Tab. 3.22 & Abb. 3.17 B).

Die relative Chlorophyll a-Konzentration von Blatt 3 nahm zunächst signifikant zu, dann sanken die Werte wieder ab. Das physiologisch älteste Blatt B 3 wies im Gegensatz zu den jüngeren Blättern eine signifikante Zunahme der SPAD-Werte aufgrund der erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen auf. Allerdings ist zu beachten, dass die Effektstärke dieser Abhängigkeit mit einem Wert von 3,81 % sehr gering war, während die Varianzaufklärung des Fehlers bei 62,01 % lag (siehe Tab. 3.22). Darüber hinaus wurde auch mittels des multiplen Vergleichstests eine signifikante Zunahme der SPAD-Werte aufgrund der Kohlendioxid-Behandlung an den einzelnen Terminen 56 TNA und 70 TNA beobachtet (siehe Abb. 3.17 C).

Die Interaktion der Faktoren „TNA“ und „CO₂-Begasung“ zeigte keine Auswirkungen auf die relative Chlorophyll a-Konzentration in Blatt 3 (siehe Tab. 3.22).

Tab. 3.22: Resultate des General Regression Models (GRM). Dargestellt sind die signifikanten Effekte ($p \leq 0,05$) der Faktoren „TNA (Tage nach der Aussaat)“, „CO₂-Begasung“ und der Interaktion TNA*CO₂-Begasung auf den SPAD-Wert in Blatt 7, Blatt 5 und Blatt 3 von Ackersenf. (○ = die Werte wurden erniedrigt, ● = die Werte wurden erhöht, VA = Varianzaufklärung oder Effektstärke).

	SPAD Blatt 7			SPAD Blatt 5			SPAD Blatt 3		
	p	Einfluss	VA in %	p	Einfluss	VA in %	p	Einfluss	VA in %
TNA	0,0002	○	11,14	0,0000	○	44,26	0,0000	●○	34,18
CO ₂ -Begasung							0,0002	●	3,81
TNA*CO ₂ -Begasung									
Fehler			88,86			52,48			62,01
Modell R ²	0,1114			0,4426			0,3821		
Modell p	0,0002			0,0000			0,0000		

Vergleicht man die SPAD-Werte der verschiedenen Blattalter miteinander, fällt auf, dass die Werte mit zunehmendem Blattalter abnehmen. Das am frühesten entwickelte Blatt (Blatt 3) wies im Schnitt geringere SPAD-Werte auf als die beiden anderen Blattaltersstufen.

Darüber hinaus wiesen alle untersuchten Blattalter eine signifikante Beeinflussung der SPAD-Werte aufgrund des Faktors „TNA“ auf. Die Kohlendioxid-Behandlung hingegen wirkte sich nur auf das älteste Blatt 3 mit einer Erhöhung der SPAD-Werte aus.

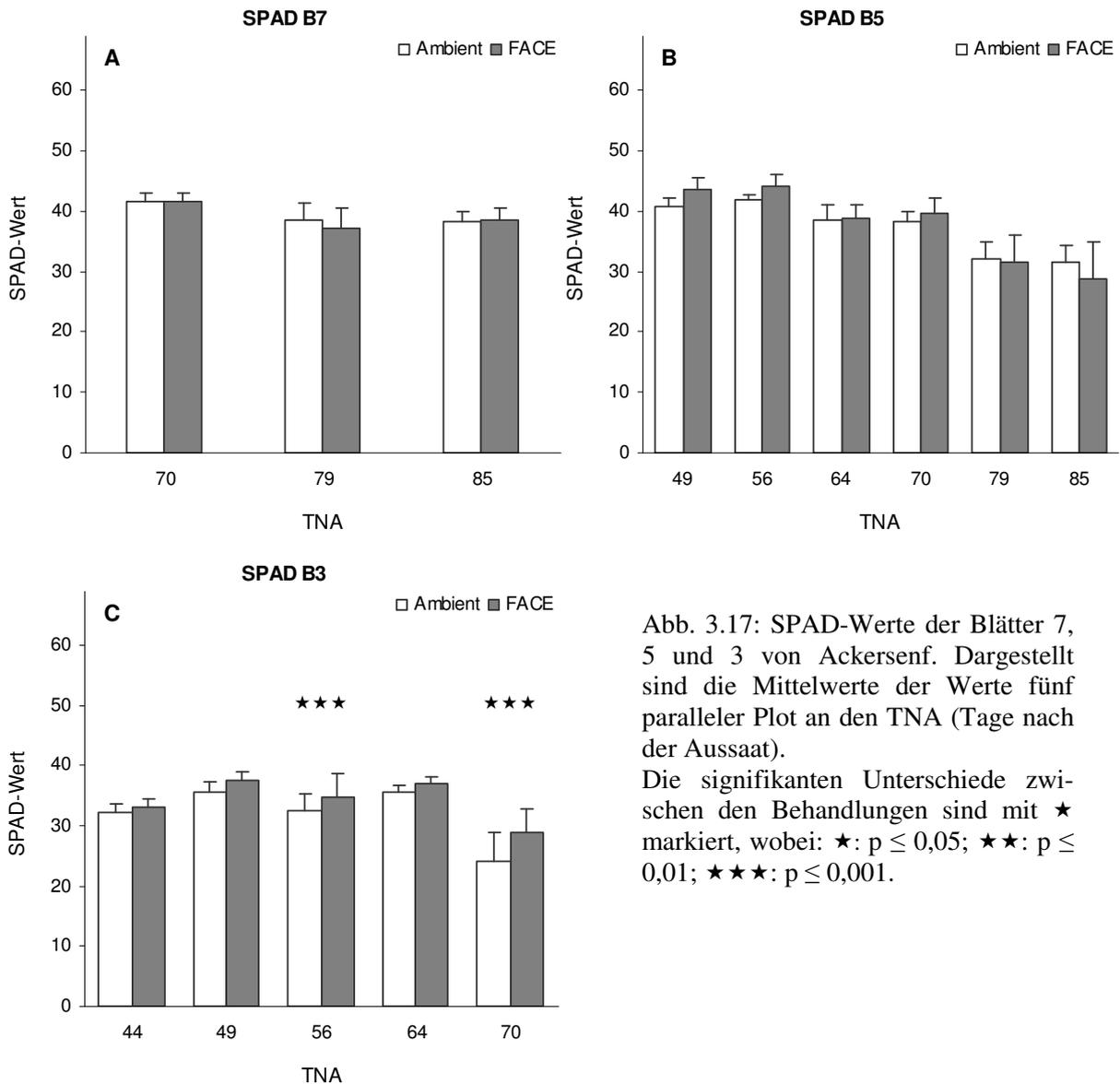


Abb. 3.17: SPAD-Werte der Blätter 7, 5 und 3 von Ackersenf. Dargestellt sind die Mittelwerte der Werte fünf paralleler Plot an den TNA (Tage nach der Aussaat).

Die signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen sind mit \star markiert, wobei: \star : $p \leq 0,05$; $\star\star$: $p \leq 0,01$; $\star\star\star$: $p \leq 0,001$.

Kurzzusammenfassung IV – Wirkungsparameter in Ackersenf

- ❖ Die Zusammensetzung der nachgewiesenen Proteine in Ackersenf wurde nicht aufgrund der CO₂-Begasung verändert.
- ❖ Das Proteinmuster der Blätter reagierte während der Entwicklung des Ackersenfs auf erhöhte CO₂-Konzentrationen mit Veränderungen in den relativen Konzentrationen der untersuchten Proteine.
- ❖ Die CO₂-Begasung bewirkte eine Verminderung der Gesamtkonzentration an löslichen Proteinen in den Blättern von *Sinapis arvensis* während der Wachstumsphase.
- ❖ Darüber hinaus wies Blatt 7 eine Erniedrigung und Blatt 3 eine Erhöhung des SPAD-Wertes aufgrund der erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen auf.

3.3 BESTANDESENTWICKLUNG DER WEIZEN-WILDKRAUT-GEMEINSCHAFT

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse zur Entwicklung des Weizens (siehe Kap. 3.3.1) und der Wildkräuter inklusive des Ackersenfs (siehe 3.3.2) vorgestellt. Die Ergebnisse zu den Deckungsgraden der Einzelarten (siehe Kap. 3.3.3) sowie die Gesamtdeckung des Bestandes (3.3.4) runden die Untersuchungen ab und schließen damit den Ergebnisteil ab.

3.3.1 Entwicklung des Weizens

Aufgrund einer Verwechslung des ausgebrachten Saatgutes im ersten Untersuchungsjahr 2003 (Winter- anstatt Sommerweizen) bildete der Weizen keine generativen Organe. Folglich liegen für dieses Untersuchungsjahr nur Ergebnisse zur vegetativen Entwicklung, insbesondere der Blattentwicklung und der Entwicklung der Nebentriebe vor. Die Anzahl der Weizenblätter am Haupttrieb lag während der Vegetationsperiode zwischen drei und vier Blättern. Aufgrund der erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen wurden keine Veränderungen in der Blattentwicklung festgestellt. Das Wachstum der Nebentriebe wurde im Laufe der Untersuchungen auf bis zu fünf Nebentriebe pro Pflanze zu und blieb dann konstant. Die CO₂-Begasung bewirkte auch hier keine Auswirkungen in der Anzahl der Blätter.

Im zweiten Untersuchungsjahr wurden die vegetativen und die generativen Entwicklungsstadien der ausgebrachten Sommerweizensorte „Triso“ erfasst. Die Anzahl der Blätter pro Haupttrieb nahm im Verlauf der Vegetationsperiode bis auf 8 Blätter pro Haupttrieb zu. Allerdings bewirkte die CO₂-Exposition auch in diesem Untersuchungsjahr keine Veränderung in der Entwicklung der Blätter. Zu Beginn der Vegetationsperiode wiesen die Sommerweizenpflanzen im Mittel 2 Nebentriebe pro Pflanze auf. Am 18.5.04 bzw. 49 Tage nach der Aussaat wurde das Maximum an Nebentrieben pro Pflanze erreicht. Zu diesem Termin wiesen sowohl die Kontroll- als auch die exponierten Pflanzen 4 Nebentriebe auf. Anschließend kam es zu einer Abnahme der Nebentriebe bis auf 2 Nebentriebe pro Pflanze. Obwohl sich zwischen den Untersuchungsterminen Unterschiede in der Anzahl der Nebentriebe zeigten, beeinflussten erhöhte CO₂-Konzentrationen nicht die zeitliche Entwicklung der Nebentriebe.

Als Nächstes wurden die Stadien der Halmentwicklung und der Ährenentwicklung (Ährenschwellen und Ährenschieben) untersucht. Hierbei zeigten sich zwar leichte, jedoch keine signifikanten Unterschiede aufgrund erhöhter CO₂-Konzentrationen (siehe Tab. 3.23).

Die Blüte begann in der *FACE*- als auch der *Ambient*-Behandlung 83 Tage nach der Aussaat, am 21.6.04. Sie dauerte eine Woche an, endete folglich 90 Tage nach der Aussaat am 28.6.04. Hinsichtlich der CO₂-Behandlung wurde kein signifikanter Unterschied im Blühbeginn und der Blühdauer festgestellt. Zusätzlich dazu wurden die Stadien der Fruchtbildung

und Samenreife als Wirkungskriterien zur Bewertung der Pflanzenentwicklung benutzt. Die Pflanzen in der *FACE*- und in der *Ambient*-Behandlung erreichten die mittlere Milchreife 99 Tage nach der Aussaat. Die Gelbreife wurde in beiden Behandlungen 119 Tage nach der Aussaat erreicht.

Aufgrund der bestimmten Parameter konnte keine Beeinflussung von erhöhtem CO₂ auf die vegetative und generative Entwicklung des Weizens festgestellt werden.

Tab. 3.23: wichtige Entwicklungsstadien des Sommerweizens während der Untersuchungsperiode 2004. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf parallelen Plots, an denen die Pflanzen das jeweilige Stadium in der *Ambient*- und *FACE*-Behandlung erreichten. Es wurden keine signifikanten Effekte aufgrund der CO₂-Begasung festgestellt.

Stadium	Tage nach der Aussaat <i>Ambient</i>	Tage nach der Aussaat <i>FACE</i>
Fahnenblatt voll entwickelt	71	71
Beginn des Ährenschiebens	79,6	77
Beginn der Blüte	83	83
Ende der Blüte	90	90
Mittlere Milchreife	99	99
Späte Milchreife	106	106
Gelbreife	119	119

3.3.2 Phänologische Entwicklung des Ackersenfs und weiterer Wildkräuter

In beiden Untersuchungsjahren wurden die vegetative und die generative Entwicklung der vorhandenen Wildkräuter erfasst.

Im ersten Untersuchungsjahr ließ sich bei keiner Art eine Beeinträchtigung der vegetativen Entwicklung hinsichtlich erhöhter CO₂-Konzentrationen feststellen. Dieses Ergebnis wurde durch die Ergebnisse zur generativen Entwicklung bestätigt, auch hier ließ sich kein Zusammenhang zu der CO₂-Behandlung herstellen. Diese Ergebnisse wurden im zweiten Untersuchungsjahr bestätigt. Die vegetative und generative Entwicklung der Wildkräuter wurde nicht durch erhöhte CO₂-Konzentrationen verlangsamt oder beschleunigt.

Das Erreichen der Blüte war artabhängig, die Mehrzahl der Arten erreichte diese jedoch zwischen dem 50. und 70. Tag nach der Aussaat. Der Ackersenf hatte nach 57 Tagen seine vollständige Größe erreicht und die Blüte begann 65 Tagen nach der Aussaat in beiden Behandlungen. Erhöhte CO₂-Konzentrationen wirkten sich in keinem der Untersuchungsjahre auf die vegetative und generative Entwicklung der untersuchten Wildkräuter aus.

3.3.3 Deckungsgrade des Bestandes

Die Deckung des Pflanzenbestandes wurde in den Jahren 2003 und 2004 bestimmt. Die Ergebnisse dazu werden nach den beiden Untersuchungsjahren gegliedert vorgestellt. Dabei werden zunächst die Deckungsgrade der Kulturart Weizen und der Wildkrautart Ackersenf detailliert beschrieben. Anschließend werden die Deckungsgrade der restlichen Wildkräuter präsentiert. Die Resultate zur Gesamtdeckung des Bestandes werden abschließend dargestellt.

Im ersten Untersuchungsjahr war der Winterweizen die dominierende Art. Die Deckung dieser Kulturart nahm im Verlauf der Vegetationsperiode stetig zu. Zu Beginn der Untersuchungen lag die Deckung des Weizens bei 10-20 % und erreichte ihr Maximum am 23.7.03 mit 40-50 %. Die erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen nahmen allerdings an keinem der Untersuchungstermine Einfluss auf die Deckung des Weizens. In diesem Untersuchungsjahr wurde der Ackersenf nicht ausgesät und hatte folglich keinen Anteil an der Gesamtdeckung. Die Deckungsgrade der in 2003 ausgebrachten Wildkräuter lagen während der gesamten Vegetationsperiode pro Art zwischen 0 und 10 %. Auch diese Arten wiesen an keinem Termin signifikante Unterschiede zwischen der *FACE*- und *Ambient*-Behandlung auf.

Die Gesamtdeckung lag zum ersten Untersuchungstermin zwischen 30 und 40 %, stieg am zweiten Termin bis auf 70 bis 80 % an, bis sie zum vierten Termin wieder abnahm (60-70%). Die erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen wirkten sich in diesem Untersuchungsjahr nicht auf die Gesamtdeckung des Bestandes aus.

Im zweiten Untersuchungsjahr wies der Sommerweizen während der Vegetationsperiode zwischen 10 und 20% Deckung auf. Zwischen der *FACE*- und *Ambient*-Behandlung konnten zwar geringe Unterschiede, jedoch keine signifikanten Effekte festgestellt werden.

Der Ackersenf erreichte als Maximalwerte 30-40 % Deckung und war somit die dominierende Art im Jahr 2004. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Deckungsgraden des Ackersenfs in der *FACE*- und *Ambient*-Behandlung festgestellt.

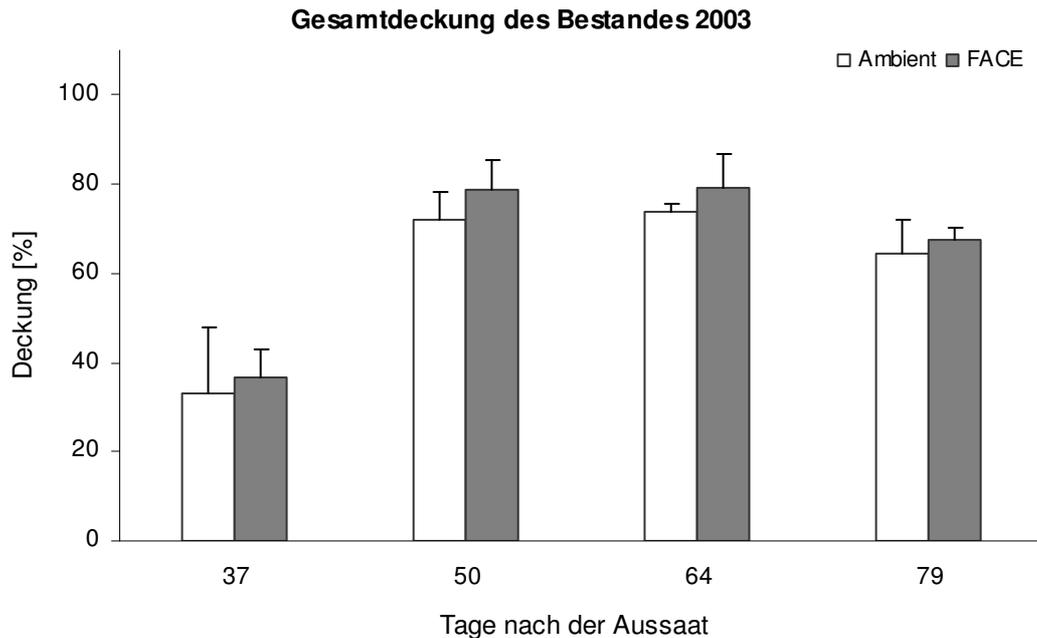


Abb. 3.18: Gesamtdeckung des Weizen-Wildkraut-Bestandes im Jahr 2003 an den vier Untersuchungsterminen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf parallelen Plots. An keinem der Untersuchungstermine wurde die Gesamtdeckung des Bestandes aufgrund der CO₂-Exposition beeinflusst.

Die Mehrzahl der Wildkräuter erreichte eine Deckung von 0-10 % während der Untersuchungsperiode. Die beiden Arten *Centaurea jacea* und *Chenopodium album* wiesen als einzige Arten in den Stadien der maximalen Blattfläche Werte von 10-20 % Deckung auf. Bezüglich der Kohlendioxid-Begasung ergab sich folgendes Bild. Die Mehrzahl der exponierten Wildkräuter wiesen zwar leicht erhöhte Deckungsgrade auf, diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. In Tabelle 3.24 werden die Deckungsgrade der einzelnen Arten beispielhaft an dem ersten Untersuchungstermin (54 TNA) präsentiert. Hinsichtlich der CO₂-Behandlung konnte kein signifikanter Unterschied in den Deckungsgraden der untersuchten Pflanzenarten festgestellt werden. Auch an den anderen vier Untersuchungsterminen konnten leichte Schwankungen in den Werten, jedoch keine signifikanten Auswirkungen aufgrund der CO₂-Begasung festgestellt werden. Betrachtet man jedoch die Gesamtdeckung 54 Tage nach der Aussaat, trat aufgrund der Kohlendioxid-Exposition eine signifikante Erhöhung der Deckung auf (siehe Abb. 3.19). An den weiteren Untersuchungsterminen konnten allerdings keine Auswirkungen der erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen auf die Deckung des Weizen-Wildkraut-Bestandes festgestellt werden. Der Pflanzenbestand zeigte zusätzliche zeitliche Variationen in der Gesamtdeckung, er wies 68 Tage nach der Aussaat die maximale Deckung auf. Am letzten Untersuchungstermin war das Minimum erreicht.

Tab. 3.24: Deckung der einzelnen Pflanzenarten am ersten Untersuchungstermin (54 TNA) 2004. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Deckungsgrade jeder Art pro Plot. Die CO₂-Exposition wirkte sich nicht signifikant auf die Deckung der Einzelarten aus.

Pflanzenart	Deckung pro Plot, 54 TNA Ambient [%]	Deckung pro Plot, 54 TNA FACE [%]
<i>Triticum aestivum</i>	13,25 ± 2,4	15,08 ± 7,0
<i>Sinapis arvensis</i>	20,67 ± 8,0	23,04 ± 5,8
<i>Agrostemma githago</i>	0,17 ± 0,2	0,21 ± 0,4
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	4,75 ± 1,6	4,17 ± 2,4
<i>Centaurea cyanus</i>	4,92 ± 2,0	6,88 ± 1,7
<i>Chenopodium album</i>	5,79 ± 1,1	6,63 ± 1,6
<i>Echinochloa crus-galli</i>	1,33 ± 1,0	1,88 ± 1,3
<i>Euphorbia helioscopia</i>	3,04 ± 0,4	3,38 ± 0,4
<i>Matricaria inodora</i>	5,04 ± 1,2	4,38 ± 1,0
<i>Papaver rhoeas</i>	2,54 ± 1,3	3,42 ± 1,9
<i>Polygonum persicaria</i>	1,17 ± 1,1	2,58 ± 1,3
<i>Thlaspi arvense</i>	5,63 ± 2,0	6,42 ± 1,9

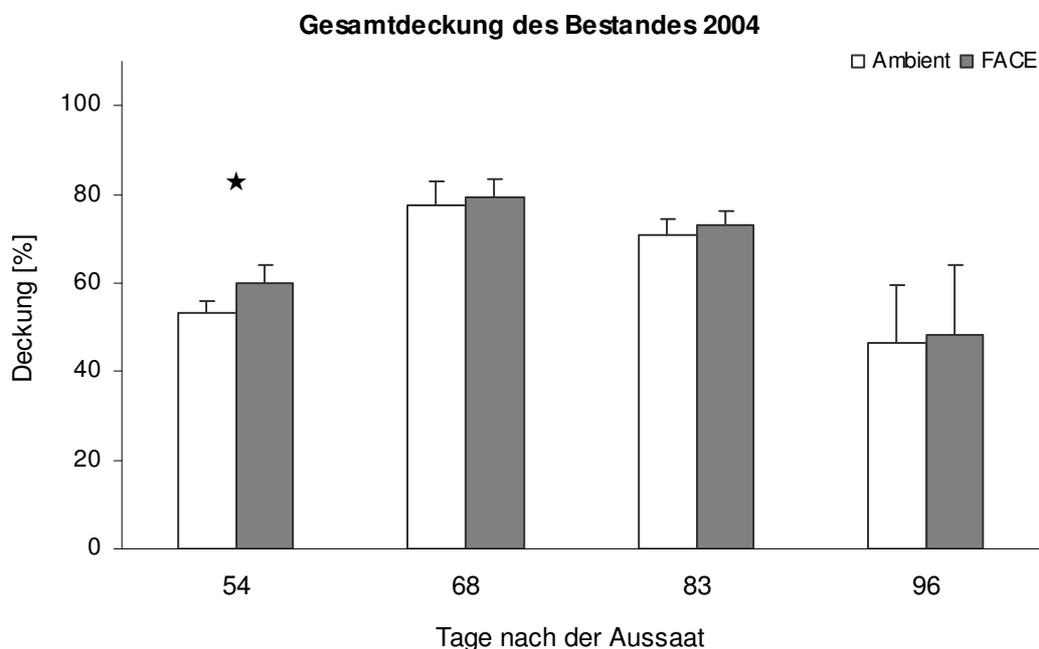


Abb. 3.19: Gesamtdeckung des Weizen-Wildkraut-Bestandes im Jahr 2004 an den vier Untersuchungsterminen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf parallelen Plots. Die mit Stern markierten Daten weisen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen der FACE- und Ambient-Behandlung auf.

Kurzzusammenfassung V – Bestandesentwicklung

- ❖ Erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen wirkten sich nicht auf die vegetative und generative Entwicklung des untersuchten Weizens aus.
- ❖ Die Entwicklung der Wildkräuter inklusive des Ackersenfs reagierte nicht auf die CO₂-Exposition.
- ❖ Die Deckung der einzelnen Arten wurde in keinem der Untersuchungsjahre aufgrund der erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen beeinflusst.
- ❖ Die Gesamtdeckung des exponierten Pflanzenbestandes reagierte im ersten Untersuchungsjahr nicht auf die Begasung. Im zweiten Jahr wurde die Gesamtdeckung am ersten Untersuchungstermin aufgrund der CO₂-Exposition erhöht.

3.4 ZUSAMMENFASSENDE BETRACHTUNG DER ERGEBNISSE

Die Proteinmuster der Kulturart Weizen und der Wildkrautart Ackersenf wurden aufgrund der CO₂-Exposition beeinflusst. Diese Auswirkungen zeigten sich in Form von Änderungen der relativen Konzentrationen mehrere Proteine bzw. Peptide. Das Ausmaß der Reaktionen war in beiden Arten abhängig vom Untersuchungstermin bzw. vom Entwicklungszustand, in dem sich die Arten zum Zeitpunkt der Untersuchung befanden. Das Proteinmuster der Weizenblätter wurde hauptsächlich zum Zeitpunkt der Blüte und der beginnenden Fruchtentwicklung beeinflusst. Die Körner des Sommerweizens wiesen zum Zeitpunkt der Milchreife die meisten Veränderungen im Proteinmuster auf. Zusätzlich dazu nahm im Sommerweizen die Anzahl der Reaktionen auf die CO₂-Begasung mit zunehmendem Blattalter ab.

Es wurde ein Protein aus den Fahnenblättern und zwei Proteine aus den Körnern des Sommerweizens identifiziert. Es gibt Hinweise darauf, dass es sich bei zwei dieser Proteine um Stoffe aus dem Sekundärstoffwechsel, insbesondere der Pflanzenabwehr handelt.

Die Gesamtkonzentration an löslichem Protein wurde in den Blättern des Sommerweizens aufgrund der erhöhten CO₂-Konzentrationen erniedrigt. Alle anderen untersuchten Fraktionen des Sommerweizens wiesen keine Veränderungen in der Konzentration an löslichen Proteinen auf. Der Konzentration an löslichen Proteinen in den Blättern von Ackersenf wurde auch aufgrund der CO₂-Begasung vermindert.

Die Sommerweizenblätter wiesen hinsichtlich der Kohlenstoff- und Stickstoff-Konzentrationen und damit verbunden dem C/N-Verhältnis einige Veränderungen aufgrund der CO₂-Begasung auf. Diese traten hauptsächlich während der Blüte und der Fruchtentwicklung auf. Die Körner wiesen bezüglich dieser Wirkungskriterien keine Veränderungen auf.

Die relative Chlorophyll a-Konzentration des Sommerweizens wurde in Blatt 7 durch erhöhte CO₂-Konzentrationen erniedrigt. Das Blatt 3 des Ackersenfs wies eine Erhöhung des SPAD-Wertes aufgrund der CO₂-Exposition auf. Alle anderen untersuchten Blattalter des Sommerweizens und Ackersenfs zeigten hingegen keine Veränderungen der SPAD-Werte aufgrund der CO₂-Begasung.

Hinsichtlich der Biomasse zeigten die Sommerweizenpflanzen keine Veränderungen aufgrund der erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen. Dies wurde bei der Betrachtung sowohl der Biomasse pro Pflanze als auch der Biomasse der einzelnen Pflanzenfraktionen deutlich.

Die vegetative und generative Entwicklung des Weizens und der Wildkräuter inklusive des Ackersenfs wurden in keinem Untersuchungsjahr aufgrund der CO₂-Exposition beeinflusst.

Die Deckungsgrade des Weizens und der Wildkräuter wurden in keinem der beiden Untersuchungsjahre aufgrund erhöhter CO₂-Konzentrationen verändert. Dieses Ergebnis spiegelt sich in der Gesamtdeckung des Bestandes 2003 wider, auch hier wurden keine signifikanten Effekte in der *FACE*-Behandlung nachgewiesen. Allerdings wies die Gesamtdeckung im zweiten Untersuchungsjahr eine signifikante Zunahme der Deckung auf. Dies war an einem der vier Untersuchungstermine feststellbar.

4 DISKUSSION

Die Ergebnisse dieser Studie liefern eine Vielzahl von Informationen über die Reaktionen der untersuchten Pflanzengemeinschaft auf erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen. Die beiden untersuchten Einzelarten, Sommerweizen und Ackersenf, wiesen mehrere durch die Kohlendioxid-Exposition ausgelöste Effekte auf den Ebenen des Proteoms und der Physiologie auf. Im Folgenden werden die Effekte auf die vegetativen und generativen Organe beider Arten mit der wissenschaftlichen Literatur verglichen. Darüber hinaus werden die Parameter zur Erfassung der Bestandesentwicklung diskutiert und in einer zusammenfassenden Betrachtung mit den physiologischen Parametern verknüpft.

Arbeitshypothese 1: Das Proteinmuster der Kulturart Sommerweizen und der Wildkrautart Ackersenf reagiert auf erhöhtes Kohlendioxid mit Änderungen in den Proteinkonzentrationen, es werden aber keine spezifischen Proteine aufgrund der CO₂-Begasung gebildet.

Die Proteinmuster der vegetativen Pflanzenteile des Sommerweizens wiesen Unterschiede in dem untersuchten Proteinspektrum auf. Hierbei wurden die relativen Konzentrationen einzelner Proteine in den Blättern verändert, es kam jedoch nicht zu einer Neubildung von spezifischen Proteinen aufgrund der CO₂-Begasung. Insgesamt wurden die relativen Konzentrationen von 41 Proteinen aus dem Spektrum der mittels SELDI-TOF-MS nachgewiesenen Proteine aufgrund der Kohlendioxid-Begasung in den Blättern des Sommerweizens beeinflusst. Hierbei wurden die Konzentrationen der meisten Proteine erniedrigt, so dass es auch insgesamt zu einer Erniedrigung der Gesamtprotein-Konzentration kam.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam es auf der Proteomebene der untersuchten dikotylen Wildkrautart, dem Ackersenf. Die Reaktionen dieser Pflanzenart fielen mit nur 5 Veränderungen im Gegensatz zu den Effekten des Sommerweizens relativ gering aus. Hierbei ist zu beachten, dass die Frequenz der Untersuchungen der vegetativen Organe des Sommerweizens entwicklungsbedingt deutlich höher war als die des Ackersenfs. Die Gesamtkonzentration an löslichen Proteinen wurde auch in dieser Art erniedrigt.

Eine Literaturrecherche zeigte, dass die Reaktionen des Proteoms von Pflanzen auf erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen bisher kaum untersucht wurden. Bisher liegt nur eine Studie zu den Auswirkungen erhöhter Kohlendioxid-Konzentrationen auf Pflanzen mittels proteomischer Techniken vor. BAE & SICHER (2004) untersuchten die Reaktionen des

Proteinmusters von *Arabidopsis thaliana*-Blättern auf langfristig erhöhte CO₂-Konzentrationen. Allerdings wurde diese Studie im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit unter kontrollierten Bedingungen in Klimakammern durchgeführt. BAE & SICHER (2004) konnten ebenfalls eine quantitative Beeinflussung des Proteinmusters in Blättern aufgrund erhöhter CO₂-Konzentrationen nachweisen, während das Spektrum der nachgewiesenen Proteine auch hier nicht beeinflusst wurde. Die Autoren konnten 13 Veränderungen im Proteinmuster in den Blättern von *Arabidopsis thaliana* nachweisen. Die Pflanzen wurden, ähnlich wie der Sommerweizen, wöchentlich während der Vegetationsperiode untersucht. Im Vergleich der Resultate der vorliegenden Arbeit mit der Studie von BAE & SICHER (2004) fällt auf, dass der Sommerweizen deutlich mehr Reaktionen auf erhöhte CO₂-Konzentrationen zeigte als *Arabidopsis thaliana*. Ein direkter Vergleich der beiden Studien ist aus mehreren Gründen allerdings nur bedingt möglich.

Zum einen wurden die Proteomanalysen der beiden Studien mittels verschiedener Technologien durchgeführt. BAE & SICHER (2004) verwendeten die zweidimensionale Gelelektrophorese, mit der hauptsächlich Proteine mit hoher Abundanz nachgewiesen werden können. In der vorliegenden Untersuchung wurden die Analysen mittels SELDI-TOF-MS durchgeführt, die es ermöglicht, auch Proteine mit wesentlich geringerer Abundanz nachzuweisen. Darüber hinaus wurden in der vorliegenden Studie mit Sommerweizen hauptsächlich Proteine mit niedrigerem Molekulargewicht, niedriger als 30 kDa, detektiert, während der Fokus bei BAE & SICHER (2004) hauptsächlich auf Proteinen mit höherem Molekulargewicht lag. Folglich fokussiert die vorliegende Studie auf ein anderes Spektrum an Proteinen. Darüber hinaus erlaubt der Einsatz der SELDI-TOF-MS-Technologie die Detektion selbst kleinster Unterschiede in den Proteinkonzentrationen, die mittels 2DE-Technologie meist nicht detektiert werden können. Die vorliegende Studie zeigt somit erstmals, dass auch niedermolekulare Proteine aufgrund der erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen beeinflusst wurden. Die SELDI-TOF-MS-Technologie stellte ein geeignetes Instrument zur Untersuchung niedermolekularer Verbindungen und deren Reaktionen auf erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen dar.

Ein nicht zu vernachlässigender Unterschied zu den Studien von BAE & SICHER (2004) sind die Rahmenbedingungen, unter denen die Untersuchungen durchgeführt wurden. Während der Sommerweizen in der vorliegenden Studie unter Freilandbedingungen beprobt wurde, nutzten BAE & SICHER (2004) kontrollierte Bedingungen. Aufgrund dieser unterschiedlichen äußeren Bedingungen kann es zu verschiedenen Reaktionen der Pflanzen kommen. So verglichen MIYAZAKI ET AL. (2004) die Transkriptionsmuster von *Arabidopsis*

thaliana unter verschiedenen Umweltbedingungen. Hierbei wurden aufgrund des Aufwuchses unter Freilandbedingungen die Abundanz von 1205 Transkripten im Vergleich zu einem Aufwuchs unter kontrollierten Bedingungen verändert. Es wurde beispielsweise eine Erhöhung der Transkription von Stress-relevanten Genen unter Freilandbedingungen im Vergleich zu kontrollierten Bedingungen nachgewiesen. Die Autoren begründeten diese Reaktion der Pflanze damit, dass die Pflanzen im Gegensatz zu einer Exposition unter kontrollierten Bedingungen im Freilandexperiment einer Vielzahl von Stressoren ausgesetzt sind. Diese Studie belegt, dass die Reaktionen der Pflanzen unter anderem von den äußeren Bedingungen abhängen. Folglich ist ein Vergleich zweier Studien, die unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt wurden, nur im Ansatz möglich. Festzuhalten bleibt jedoch, dass auch in den bisherigen Studien keine Neubildung eines speziellen Proteins aufgrund einer erhöhten Kohlendioxid-Konzentration festgestellt werden konnte.

Völliges Neuland betritt die vorliegende Studie im Bereich der Auswirkungen erhöhter CO₂-Konzentrationen auf das Proteom der generativen Organe. Bisher liegen zu diesem Aspekt keine vergleichbaren Studien vor. Wie bei den vegetativen Organen wiesen auch die generativen Organe des Sommerweizens keine Änderungen im Spektrum der nachgewiesenen Proteine auf. Folglich kam es auch hier nicht zu einer Neubildung eines Proteins. Wie auch in den Blättern beobachtet, wurden allerdings die relativen Konzentrationen einiger Proteine aufgrund der erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen beeinflusst. Während der beiden Untersuchungstermine wurden die Intensitäten von insgesamt 20 Proteinen in den Körnern des Sommerweizens verändert. Die Richtung der Reaktionen zeigte hier kein einheitliches Bild. So reagierten etwa 50% der Proteine mit einer Konzentrationserhöhung, während die restlichen Proteine mit einer Erniedrigung auf die CO₂-Begasung reagierten. Hinsichtlich der Gesamtkonzentration an löslichen Proteinen kam es in den generativen Pflanzenorganen im Gegensatz zu den vegetativen Organen nicht zu einer Veränderung unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen. Die vorliegende Studie zeigt, dass es auch in den nicht-photosynthetisch aktiven Körnern zu Änderungen des untersuchten Ausschnitts des Proteinmusters kommen kann. Aufgrund dieser Änderungen sind eventuelle Veränderungen der Kornqualität zu vermuten. Es stellt sich jedoch die Frage, inwiefern diese Ergebnisse auf andere Arten übertragbar sind, so dass an dieser Stelle zukünftig weitere Studien nötig sind.

Zusammenfassend betrachtet fällt auf, dass die Veränderungen des Proteinmusters der vegetativen und generativen Pflanzenorgane des Sommerweizens vom Entwicklungsstadium der Pflanzen abhängig sind. Während der generativen Entwicklung, von der Blüte bis zur Milchreife der Körner, wiesen die beiden jüngsten Blätter des Sommerweizens die meisten

CO₂-bedingten Effekte in den Proteinmustern auf. Daneben zeigten auch die generativen Organe zum Zeitpunkt der Milchreife eine starke Reaktion des Proteinmusters auf, was darauf hinweist, dass die gesamte Pflanze insbesondere während dieser Entwicklungsphase auf erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen reagiert. Auch diese Resultate werden von BAE & SICHER (2004) bei der Untersuchung von *Arabidopsis thaliana* bestätigt. Hierbei reagierte das *Arabidopsis*-Proteom am Ende des Lebenszyklus, also mit Einsetzen der generativen Entwicklung, mit den ausgeprägten Veränderungen des Proteinmusters der Blätter. Zu ähnlichen Resultaten kamen auch ADAM ET AL. (2000). Sie untersuchten die Auswirkungen von langfristig erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen auf die Konzentration der RubisCO in Weizenpflanzen unter Freilandbedingungen. Die Autoren stellten fest, dass die untersuchten Blätter auch hier während der Entwicklung der generativen Organe am stärksten mit Veränderungen auf biochemischer Ebene reagierten.

Die beobachteten Konzentrationsveränderungen, beginnend mit dem Eintritt der Pflanze in die generative Phase sowie während der Kornentwicklung, sind auf eine Umstellung des Metabolismus zurückzuführen. Das vegetative Wachstum der Pflanzen wird mit zunehmendem Alter verringert und nachfolgend ändert sich die Ressourcenverteilung innerhalb der Pflanze. Während dieser Phase wandeln sich die Blätter von Senken- zu Quellen-Organen. Infolgedessen werden die Photosyntheseassimilate und der vor allem aus der RubisCO gewonnene Stickstoff aus den Blättern in die nun neu entstehenden Senken-Organen der Pflanzen transportiert (SIMPSON ET AL. 1983), wobei die generativen Organe die höchsten Senkenkapazitäten der Pflanze aufweisen (KARTSCHALL ET AL. 1995). Während der Entwicklung der reproduktiven Organe wird in den Blättern die Seneszenz induziert (NOODÉN 1988). Während der Seneszenzphase sinken die meisten mRNAs im Blatt deutlich ab, während sich die Häufigkeit bestimmter anderer Transkripte erhöht (ZIMMERMANN & ZENTGRAF 2004). Gene, deren Expression während der Seneszenz nachlässt, werden als *senescence-down-regulated genes* (SDGs) bezeichnet (TAIZ & ZEIGER 2000). Dazu gehören vor allem Gene, die Photosynthese-relevante Proteine, beispielsweise die große Untereinheit der RubisCO (HUMBECK ET AL. 1996) oder das Chlorophyll a/b-Bindeprotein (HUMBECK & KRUPINSKA 2006), kodieren. Die Gene, deren Expression während der Seneszenz verstärkt wird, werden *senescence-associated genes* (SAGs) genannt. Hierbei handelt es sich zum Beispiel um Gene, die hydrolytische Enzyme, wie etwa Lipasen, Proteasen oder Ribonucleasen, kodieren (FALK ET AL. 2002, PARROT ET AL. 2005).

Die erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen bewirkten in der vorliegenden Studie vor allem ab dem Beginn der generativen Entwicklung Veränderungen auf Proteomebene. Diese

zeichneten sich dadurch aus, dass die Konzentrationen einiger Proteine erhöht und die anderer erniedrigt wurden. Vor dem Hintergrund der Seneszenzinduktion weisen die vorliegenden Resultate darauf hin, dass erhöhtes CO₂ in den Metabolismus während des Seneszenzverlaufs der Blätter eingreift. Anders betrachtet bedeutet dies, dass hierdurch eine Phase besonderer Sensibilität detektiert werden konnte.

Die einleitende Arbeitshypothese, dass das Proteinmuster der beiden untersuchten Pflanzenarten durch erhöhtes CO₂ mit Änderungen der Proteinkonzentrationen reagiert, jedoch keine speziellen Proteine aufgrund der CO₂-Begasung gebildet werden, kann damit belegt werden. Darüber hinaus reagierten die vegetativen und generativen Organe des Sommerweizens besonders ab dem Zeitpunkt der Blüte auf die erhöhten CO₂-Konzentrationen.

Arbeitshypothese 2: Die Proteine des Primär- und Sekundärstoffwechsels werden aufgrund der erhöhten CO₂-Konzentrationen beeinflusst.

In der vorliegenden Studie konnten drei Proteine identifiziert werden, die signifikant von den erhöhten CO₂-Konzentrationen beeinflusst wurden. Hierbei handelt es sich um ein Protein aus dem Primärstoffwechsel der Pflanzen, dem Saccharose-H⁺-Symporter. Darüber hinaus reagierten auch Proteine aus dem Sekundärstoffwechsel auf die CO₂-Begasung, das PR4-Protein in den Körnern und die LRR-Kinase in den Blättern. Die Funktionen dieser Proteine im Stoffwechsel und mögliche Interaktionen mit Kohlendioxid werden in den folgenden Abschnitten detailliert beschrieben.

Im Vergleich der Verdaufragmente mit den Informationen der Proteindatenbanken stellte sich heraus, dass ein Protein aus den Weizenkörnern eine sehr hohe Homologie mit einem Fragment des **Saccharose-H⁺-Symporter** in *Medicago trunculata* aufwies und zur Familie der aktiven Saccharose-Transporter gehört. Diese Transporter haben für die Pflanzen eine übergeordnete Stellung. Die Saccharose-Transporter übernehmen wichtige regulatorische Funktionen in der Assimilatverteilung der Pflanze, insbesondere in der Regulation des Assimilatflusses in die Senken (WEBER ET AL. 1997). Einige Teile der Pflanzen, zum Beispiel Wurzeln oder generative Organe, sind nicht photosynthetisch aktiv und müssen daher die Photosynthese-Assimilate aus anderen Teilen der Pflanzen, wie etwa den Blättern, importieren. In diesem Zusammenhang werden die Energie liefernden Organe als Quellen und die Energie empfangenden Pflanzenteile als Senken bezeichnet. Die Saccharose stellt in den Pflanzen die wichtigste Zucker-Transportform von einer Quelle zu einer Senke dar (WEBER

ET AL. 1997, ROITSCH 1999). Der Transport der Saccharose zu den Senken geschieht über das Phloem.

Die Beladung und Entladung des Phloems erfolgt entweder passiv, über Plasmodesmen in den Zellwänden oder aktiv mittels Transporterproteinen (TAIZ & ZEIGER 2000). Die Verwendung der jeweiligen Transportart ist hierbei abhängig von der Pflanzenart, dem Pflanzenorgan oder dem Entwicklungsstadium der Pflanze (WILLIAMS ET AL. 2000). Der aktive Saccharose-transport spielt insbesondere beim Transport der Saccharose aus dem Phloem in generative Organe, wie beispielsweise in wachsende Samen, eine wichtige Rolle. In diesem Fall liegt keine direkte Verbindung zwischen dem Phloem und den Samenzellen vor, so dass ein passiver Transport über Plasmodesmen nur eine geringe Rolle spielt (PRITCHARD & AMTHOR 2005). Der aktive Transport mittels Saccharose-Transportern, unter anderem mittels des Saccharose-H⁺-Symporters, ist folglich von fundamentaler Wichtigkeit für die Entladung der Saccharose aus dem Phloem in die sich entwickelnden Samen (PATRICK & OFFLER 1995, GAHRTZ ET AL. 1996). So ist es möglich, dass die Saccharose-Transporter Kontrollpunkte für den Transport der Zuckermoleküle darstellen (AMTHOR & PRITCHARD 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Menge des Saccharose-H⁺Symporters in CO₂-behandelten Körnern während der Milchreife verringert wurde. Das bedeutet, dass die Saccharose-Aufnahme mittels dieses Transporters in den Körnern unter erhöhten CO₂-Konzentrationen reduziert wurde. Die erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen scheinen demnach über eine Regulation der Saccharose-H⁺-Symporter aktiv in die Assimilatverteilung der Pflanzen einzugreifen. Es ist auch in dem vorliegenden Versuch möglich, dass die erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen über eine Regulation des Zuckertransportes, insbesondere des Importes von Saccharose in die Körner, in die Senkenkapazität der Körner eingreift. Bisher konnte eine Beeinflussung dieses Gleichgewichtes aufgrund einer vermehrten Bildung von Kohlenhydraten, allerdings nicht aufgrund einer Regulation der Saccharose-Transporter nachgewiesen werden (ROGERS ET AL. 1996, AMTHOR & PRITCHARD 2005). Die vorliegende Arbeit zeigt erstmalig, dass erhöhtes Kohlendioxid auch in den Import der Saccharose in die Zellen eingreift.

Über die Regulationsmechanismen der Zucker-Transporter ist bisher nur wenig bekannt. Vereinzelt Studien zeigen jedoch, dass die Expression der zuständigen Gene durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden kann. So weisen einige Arbeiten darauf hin, dass die Regulation der Genexpression von dem Entwicklungsstadium der Pflanzen abhängt. Beispielsweise wurden während der Kornentwicklung (GAHRTZ ET AL. 1996, WEBER ET AL. 1997) oder der Keimung (TRUERNIT 2001) erhöhte Konzentrationen der Saccharose-Transporter

nachgewiesen, was auch die vorliegenden Ergebnisse zeigen. Weitere Studien belegen den Einfluss von biotischen und abiotischen Faktoren, wie etwa Licht-, Wasser- und Salzstress auf die Expression verschiedener Zucker-Transporter (TRUERNIT ET AL. 1996, NOIRAUD ET AL. 2000). Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass die Expression und die Aktivität der Transporter von den Zucker-, vor allem den Saccharose-Konzentrationen in den Zellen reguliert werden (CHIOU & BUSH 1998). Da die Kohlenhydrate in der vorliegenden Studie nicht untersucht wurden, kann eine Akkumulation von Saccharose in den Körnern und eine damit verbundene Regulation der Saccharose-Transporter nicht ausgeschlossen werden. Die vorliegenden Resultate zeigen, dass der Saccharose-Transport über den Saccharose-H⁺-Symporter in die Zellen der Weizenkörner in den mit Kohlendioxid begasten Pflanzen verringert wurde. Darüber hinaus kann vermutet werden, dass dieser Effekt auf weitere Veränderungen im Primärstoffwechsel zurückzuführen ist.

Welche Auswirkungen dies für die Kornqualität der Körner von Kulturarten hat, konnte in dieser Studie jedoch nicht geklärt werden, so dass an dieser Stelle weiterführende Studien notwendig sind.

In den Körnern wurde während der Milchreife eine erhöhte Intensität des **PR4-Proteins** (*pathogenesis related protein 4*) nachgewiesen. Schon früher wurden Pathogenese-verwandte (PR)-Proteine in Blättern und in Körnern von Weizen nachgewiesen (CAPORALE ET AL. 2004, HAJÓS ET AL. 2004). Als Auslöser für eine vermehrte Bildung dieses Proteins in Pflanzen werden der Befall durch Pathogene oder ähnliche Auslöser beschrieben (AGRAWAL ET AL. 2002, BESTEL-CORRE ET AL. 2002). Die Art dieser Auslöser kann sehr unterschiedlich sein. So wurde nachgewiesen, dass PR-Proteine in Blättern von Weizen beispielsweise bei einem Blattlausbefall vermehrt produziert wurden (PORTER & WEBSTER 2000). Daneben beschrieben PINHEIRO ET AL. (2005) ein erhöhtes Auftreten von PR-Proteinen in Blättern von Lupinen unter Wassermangel und KAV ET AL. (2004) in den Wurzeln von *Pisum sativum* unter Salzstress. Reispflanzen wiesen bei Ozonstress erhöhte Konzentrationen von PR-Proteinen in den Blättern auf (AGRAWAL ET AL. 2002). Eine Erhöhung von Pathogenese-verwandten Proteinen (PR-Proteinen) kann demzufolge nicht nur durch Pathogene, sondern auch durch andere Stressbedingungen ausgelöst werden.

Über welche Stoffwechselwege erhöhtes Kohlendioxid in den Abwehrmechanismus und insbesondere in die Produktion PR-relevanter Proteine eingreifen kann, ist bisher nicht bekannt und bedarf weiterer Untersuchungen. Da Kohlendioxid jedoch in erster Linie ein wichtiges Nährelement für die Pflanzen darstellt, ist es sehr unwahrscheinlich, dass die Pflanzen hinsichtlich der Abwehrrerkennung über einen „CO₂-Sensor“ verfügen und damit direkt

auf erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen reagieren. Die Reaktionen der Pflanzenabwehr sind demzufolge eher auf Änderungen im Primärstoffwechsel, wie etwa einer Akkumulation von Kohlenhydraten, zurückzuführen.

Festzuhalten ist zum einen, dass in dieser Studie erstmalig nachgewiesen wurde, dass erhöhtes Kohlendioxid in den Sekundärstoffwechsel der generativen Organe, insbesondere der Weizenkörner, eingreift. Zum anderen konnte die Milchreife der Körner als der Zeitpunkt detektiert werden, an dem diese Veränderungen auftreten.

Perspektivisch bedeutet dies, dass bei weiter steigenden CO₂-Konzentrationen in der Atmosphäre der Konzentration von PR-Proteinen nicht nur an bestimmten Untersuchungs-terminen, sondern sogar dauerhaft ansteigen könnte. HAJÓS ET AL. (2004) stellten fest, dass PR-Proteine auch im Endprodukt Mehl vorliegen und eine hohe Ähnlichkeit mit Allergenen aufweisen, so dass das Allergierisiko bei einem erhöhter PR4-Spiegel in den Körnern die Mehlqualität beeinflussen und langfristig das Allergierisiko für den Menschen steigern könnte.

Aus dem Sekundärstoffwechsel der Blätter konnte ein Protein identifiziert werden, dessen Konzentration aufgrund der Kohlendioxid-Begasung verringert wurde. Es handelte sich um ein Fragment des **LRR-Kinase Protein**, das bisher aus der Sojabohne (*Glycine max.*) bekannt war. Das Protein ist mit einer Leucin-reichen Region (LRR = leucin rich region) ausgestattet, mit der es Interaktionen mit Pathogenen oder anderen Proteinen eingeht (DIÉVART & CLARK 2004). Mittels seiner Kinasefunktion reguliert es die enzymatische Aktivität weiterer Proteine und ist dadurch an Signalwegen und Stoffwechselfunktionen beteiligt. Für die Sojabohne ist bekannt, dass die LRR-Kinase von dem Resistenzgen *rhg1* kodiert wird und damit an der Pathogenerkennung und Signalweiterleitung der Pflanze beteiligt ist (www.expasy.org). Somit lässt sich ableiten, dass das identifizierte Protein auch im Sommerweizen eine Schlüsselrolle in der Abwehrreaktion der Pflanze gegenüber Pilzen oder Bakterien einnehmen könnte. Da die Proteinkonzentration während der Blüte und Fruchtbildung in den Fahnenblättern der behandelten Pflanzen erniedrigt war, wiesen die vegetativen Organe unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen folglich weniger Moleküle zur Abwehrerkennung auf. Es ist anzunehmen, dass die vegetativen Organe der Pflanzen dadurch anfälliger gegenüber einem Pilzbefall oder anderen Stressoren waren als die Kontrollpflanzen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen erstmalig, dass erhöhtes Kohlendioxid schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Abwehrkette in das Reaktionspotenzial der Pflanze eingreift. Hierbei scheint eine niedrigere Sensibilität der vegetativen Pflanzenteile bei einem Pathogenbefall unter erhöhtem Kohlendioxid vorzuliegen.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit stehen im Gegensatz zu den Studien von MIYAZAKI ET AL. (2004) und BAE & SICHER (2004). Diese Studien liefern Hinweise darauf, dass die Pflanzenabwehr unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen erhöht wird, was in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte. MIYAZAKI ET AL. (2004) konnten eine Erhöhung von Stress-relevanten Transkripten unter erhöhtem Kohlendioxid in *Arabidopsis thaliana* nachweisen. Hierbei untersuchten sie die Pflanzen ebenfalls mittels eines FACE-Systems, allerdings konnte hier nicht eindeutig geklärt werden, inwiefern die Reaktionen der Pflanzen auf der Ebene der Transkription mit den tatsächlichen Reaktionen des Proteoms korrelieren. Auch BAE & SICHER (2004) stellten fest, dass erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen zur Erhöhung eines Proteins, des *Myrosinase precursors*, in den Blättern von *Arabidopsis thaliana* führten. Auch dieses Protein steht in direktem Zusammenhang mit der Reaktion von Pflanzen auf Stressbedingungen. Anzumerken ist hierbei, dass beide Studien eine Wildkrautart, *Arabidopsis thaliana* untersuchten. Hierbei stellt sich die Frage, ob die Reaktionen des Proteoms artspezifisch sind, so dass an dieser Stelle weitere Untersuchungen nötig sind.

Bisher konnte nicht geklärt werden, wie die Konzentrationen der LRR-Kinase reguliert werden, so dass zum jetzigen Zeitpunkt die Rolle der erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen im Signalweg der LRR-Kinase nicht erklärt werden kann.

Zusammengefasst zeigt sich, dass die erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen zu Änderungen von Proteinen des Sekundärstoffwechsels, insbesondere der Pflanzenabwehr, führen. Dabei ist zu beachten, dass erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen nicht nur die Mechanismen der Pflanzenabwehr verändern, sondern auch über Veränderungen in der Blattqualität in die Wechselbeziehung zwischen Pflanzen und Pathogenen eingreifen können. So berichten einige Studien von einem verminderten Wachstum (MITCHELL ET AL. 2003) oder Änderungen im Metabolismus von Blattpilzen (CHUNG ET AL. 2006), was indirekte Auswirkungen auf das Abwehrsystem der Pflanze haben kann. Bei zukünftigen Untersuchungen zu den Auswirkungen erhöhter Kohlendioxid-Konzentrationen ist es wichtig, diese Interaktion innerhalb der Pflanzenabwehr zu berücksichtigen.

Fasst man die Reaktionen der untersuchten Proteine der vegetativen und generativen Organe zusammen, kann die eingangs aufgestellte zweite Arbeitshypothese belegt werden.

Arbeitshypothese 3: Die Gesamtprotein-, Stickstoff- und Chlorophyll a-Konzentration der vegetativen Pflanzenorgane wird aufgrund erhöhter CO₂-Konzentrationen erniedrigt, während das C/N-Verhältnis erhöht wird. Diese Wirkungsparameter werden ebenfalls in den generativen Organen aufgrund der erhöhten CO₂-Konzentrationen beeinflusst.

Die erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen bewirkten bei der Mehrzahl der nachgewiesenen Proteine eine Reduzierung der relativen Konzentrationen. Dieses Ergebnis wird durch die ermittelten Konzentrationen an löslichen Proteinen bestätigt, denn auch insgesamt wurden die Proteinkonzentrationen in den Blättern des Sommerweizens aufgrund der Kohlendioxid-Begasung verringert. Daneben wiesen auch die Blätter des Ackersenfs eine signifikante Abnahme der Konzentration an löslichen Proteinen auf. Da diese Abnahme unter erhöhtem Kohlendioxid direkt mit der Abnahme des Gesamt-Stickstoffs korreliert (ROGERS ET AL. 1996), ist eine gleichzeitige Abnahme der Protein- und Stickstoff-Konzentrationen zu erwarten. Dies konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Die Blätter des Sommerweizens wiesen eine Abnahme der Stickstoff-Konzentrationen aufgrund der Kohlendioxid-Begasung auf. Auch HEGERFELD (2004) wies in einer Diplomarbeit im selben Projekt nach, dass die Blätter des Weizens im Jahr 2003 unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen eine Reduktion der Protein- und Stickstoff-Konzentration aufwiesen. Eine Abnahme der Proteinkonzentrationen in Blättern von Sommerweizenpflanzen aufgrund von erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen konnte auch ROGERS ET AL. (1998) nachweisen. Die Proteinkonzentration nahm in vielen früheren Untersuchungen zwischen 10 und 20 % aufgrund der langfristig erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen ab (POORTER ET AL. 1997, SICHER & BUNCE 1997, COTRUFO ET AL. 1998, GEIGER ET AL 1998, DRISCOLL ET AL. 2005).

Allerdings konnten auch einige Experimente keine Reduktion der Protein- oder Stickstoff-Konzentration nachweisen. Beispielsweise stellten ROGERS & ELLSWORTH (2002) in einem FACE-Experiment keine Reduktion der Stickstoff-Konzentration in den Nadeln von *Pinus taeda* fest. Auch die Konzentration an löslichen Proteinen wurde in dieser Studie nicht aufgrund des langfristig erhöhten Kohlendioxides reduziert. Eine Untersuchung von Eichenblättern (SCHWANZ & POLLE 1998) ergab ebenso keine Reaktionen der Konzentration an löslichen Proteinen aufgrund des langfristig erhöhten Kohlendioxids. Diese Studien an Bäumen zeigen, dass Bäume andere Reaktionsmuster aufweisen als krautige Pflanzenarten, was auch NOWAK ET AL. (2004) bei einem Vergleich der bisher durchgeführten FACE-Studien feststellten.

Die Reaktionen der physiologischen Parameter scheinen somit abhängig von der Lebensdauer der Pflanzen zu sein. Betrachtet man die vorherigen Studien zu krautigen einjährigen Pflanzenarten oder Kulturpflanzen, so ist eine Abnahme der Protein- und Stickstoff-Konzentration auch im Sommerweizen zu erwarten, dies wird auch in mehreren Studien bestätigt. Eine Abnahme der Stickstoff-Konzentration konnten beispielsweise BAXTER ET AL. (1997) bei *Poa alpina* unter kontrollierten Bedingungen und FANGMEIER ET AL. (1999) bei Weizen in open-top-Kammern und langfristig erhöhtem Kohlendioxid feststellen. Auch unter Freilandbedingungen wie zum Beispiel bei ADAM ET AL. 2004 kam es zu einer Reduktion der Stickstoff-Konzentration. Darüber hinaus zeigten einige Studien in FACE-Systemen, dass krautige Arten in den meisten Fällen eine Konzentrationsabnahme des Stickstoffs unter einer langfristigen CO₂-Begasung zeigten (siehe Übersicht in NOWAK ET AL. 2004). Demzufolge belegen die Resultate in der vorliegenden Arbeit die bisher nachgewiesenen Reaktionsmuster von Getreide auf erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen.

Da die Kohlenstoff-Konzentrationen in den untersuchten Blättern nicht beeinflusst wurden, bewirkte eine Erniedrigung der Stickstoff-Konzentrationen folglich eine Erhöhung des C/N-Verhältnisses in den vegetativen Pflanzenorganen. Dieses Resultat war zu erwarten, da auch frühere Studien ähnliche Resultate zeigen. So wiesen beispielsweise XIE ET AL. (2002) in den Blättern von Reis und KNEPP ET AL. (2005) in den Blättern von Laubbäumen erniedrigte Stickstoff-Konzentrationen und ein erhöhtes C/N-Verhältnis unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen unter Freilandbedingungen nach. KNEPP ET AL. (2005) stellten darüber hinaus verminderte herbivore Schäden unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen fest und führten dies auf das erhöhte C/N-Verhältnis zurück. Da Stickstoff für herbivore Insekten die limitierende Ressource darstellt, müssen Insekten aufgrund eines verringerten C/N-Verhältnisses der Blätter ihren Konsum auf bis zu 40% erhöhen (WHITTAKER 2001). Die Blätter unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen könnten demzufolge eine Nährstoff-ärmere und damit weniger attraktive Nahrung für herbivore Insekten darstellen. Demzufolge kann ein geringerer Befall von herbivoren Insekten eine mögliche Folge des erniedrigten Stickstoff-Gehaltes bzw. eines erhöhten C/N-Verhältnisses sein.

Wie bereits einleitend erwähnt liegen mehrere Modelle zur Erklärung der reduzierten Protein- und Stickstoff-Konzentration in den vegetativen Organen unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen vor.

Ein Modell geht von einer „*Feedback-Regulation*“ der photosynthese-relevanten Gene aufgrund von erhöhten Kohlehydratkonzentrationen aus. Diese Akkumulation von Kohlenhydraten, vor allem Stärke und Saccharose, wurde in vielen Studien bei einer

Langzeitbegasung mit erhöhtem Kohlendioxid nachgewiesen und bewirkte eine Repression der RubisCO und anderer Photosynthese-Proteine, die zu einer Abnahme der Gesamtprotein-Konzentration und der Stickstoff-Konzentration führte (STITT 1991, BARNES ET AL. 1995, BOWES ET AL. 1996, MOORE ET AL. 1999). Es ist möglich, dass aufgrund einer Zuckerakkumulation nicht nur Gene des Primär- sondern auch des Sekundärstoffwechsels reguliert werden (KOCH 2004). Folglich könnte auch die Regulation der LRR-Kinase und damit verbunden die Abwehrekennung in den vegetativen Organen über eine Zuckerakkumulation reguliert werden. Parallele Untersuchungen zum Kohlenhydratmetabolismus des Sommerweizens ergaben, dass in den Blättern zum Zeitpunkt der Blüte keine Kohlenhydrate akkumuliert waren (HÖGY, in Vorbereitung). Da die Protein- und Stickstoff-Konzentrationen jedoch vor allem an diesem Untersuchungszeitpunkt erniedrigt wurden, ist eine Feedback-Regulation durch erhöhte Kohlenhydratkonzentrationen in der vorliegenden Arbeit auszuschließen. Zu ähnlichen Schlussfolgerungen kam auch HEGERFELD (2004) in einer Diplomarbeit im selben Projekt. Er stellte reduzierte Protein- und Stickstoff-Konzentrationen in den begasten Weizenpflanzen fest, es kam jedoch nicht zu einer signifikanten Kohlenhydrat-Akkumulation in den Blättern des Weizens (EICKLER 2004).

Das einleitend erklärte *Seneszenz-Modell* (siehe Kap. 1) stellte eine weitere Möglichkeit zur Regulation der Protein- und Stickstoff-Konzentrationen in der Pflanze dar. Hierbei bewirkt eine früher einsetzende Seneszenz unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen einen zeitlich früheren Abbau der Proteine sowie des Stickstoffs (COLEMAN ET AL. 1993, NIE ET AL. 1995, MILLER ET AL. 1997, SICHER & BUNCE 1998). NIE ET AL. (1995) stellten in einem FACE-Experiment fest, dass die Abnahme der RubisCO-Konzentration in den Weizenblättern in zwei Phasen ablief. Die erste Phase bestand in einer geringen Abnahme der RubisCO-Konzentration, ohne Veränderungen in der Chlorophyll-Konzentration oder der Konzentration anderer Proteine. In der zweiten Phase kam es zu einer verstärkten Abnahme der RubisCO und auch generell zu einer Abnahme der anderen Proteine sowie des Chlorophylls. Diese Abnahme der Protein- und Chlorophyll-Konzentrationen in der zweiten Phase wurde unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen verstärkt und wies auf eine früher einsetzende Seneszenz der Pflanzen hin. Betrachtet man die Ergebnisse des Proteinmusters in dieser Studie, wird deutlich, dass in den untersuchten Weizenblättern mehrere Proteine herunterreguliert wurden, was darauf hinweist, dass auch die Sommerweizenblätter in der zweiten Phase der Proteinabnahme waren. Darüber hinaus nahm die Anzahl der nachgewiesenen Proteine mit zunehmendem Blattalter ab, was ebenfalls einen zunehmenden Seneszenzverlauf vermuten lässt. Hieraus kann gefolgert werden, dass die Protein-Konzentrationen in den

begasten Pflanzen aufgrund einer früher einsetzenden Seneszenz reduziert wurden. Auch COLEMAN et al. (1993) und MILLER (1997) kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Sie stellten fest, dass eine Reduzierung der RubisCO-Konzentration, der Protein- und Stickstoff-Konzentration unter erhöhtem Kohlendioxid auf eine zeitlich vorgelagerte Seneszenz zurückzuführen war. MILLER et al. (1997) nahmen an, dass diese zeitliche Verschiebung der Pflanzenentwicklung auf eine Veränderung des Quellen-Senken-Gleichgewichtes in der Pflanze zurückzuführen war. Zu diesem Ergebnis kamen auch FANGMEIER ET AL. (2000). Sie stellten fest, dass die Seneszenz der Fahnenblätter der Sommergerste unter erhöhtem Kohlendioxid aufgrund einer erhöhten Senken-Kapazität der Körner erhöht wurde. In der vorliegenden Studie wurde weder das C/N-Verhältnis noch die Biomasse der Weizenkörner aufgrund der erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen beeinflusst. Folglich wurde die Senkenkapazität der Körner des Haupttriebes nicht erhöht. Weitere Ergebnisse zur Biomasse des Weizens am Ende der Vegetationsperiode weisen auf eine Erhöhung der Halm- und Ährenbiomasse der Nebentriebe hin (HÖGY, pers. Mitteilung), was auf eine erhöhte Senkenkapazität dieser Organe hinweist. Es kann dabei nicht ausgeschlossen werden, dass auch die Halme oder Wurzeln des Getreides eine erhöhte Senkenkapazität aufwiesen, so dass für zukünftige Studien auch eine Untersuchung dieser Organe notwendig ist.

Es ist zu erwarten, dass bei einer früher einsetzenden Seneszenz zusätzlich zu einer Erniedrigung der Protein-Konzentration die Chlorophyll-Konzentration unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen abnimmt (LOHMANN ET AL. 1994). Die Proteinkonzentration der Blätter wurden in der vorliegenden Studie zwar reduziert, die relative Chlorophyll a-Konzentration der Sommerweizenblätter zeigte in dieser Arbeit jedoch keine einheitliche Reaktion auf erhöhte CO₂-Konzentrationen. So wurde die relative Chlorophyll a-Menge in den Fahnenblättern nicht aufgrund des erhöhten Kohlendioxids verändert, während Blatt 7 eine signifikante Reduktion der Werte aufwies. Die Resultate zeigen jedoch, dass erhöhtes Kohlendioxid nur an einem Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung, der vollen Entwicklung der Pflanzen, in Blatt 7 zu einer Verringerung der relativen Chlorophyll a-Konzentration führte. Darüber hinaus zeigte die statistische Auswertung, dass die Effektstärke mit 5,65 % der CO₂-Begasung auf die relative Chlorophyll a-Menge in Blatt 7 sehr gering war. Aus diesen Gründen ist keine systematische Beeinflussung der erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen auf die relative Chlorophyll a-Konzentration des Sommerweizens an den untersuchten Zeitpunkten belegbar. Auch der Ackersenf zeigte in keinem der untersuchten Blattalter eine signifikante Abnahme der relativen Chlorophyll a-Konzentrationen. Insgesamt gesehen wirkten sich die erhöhten

Kohlendioxid-Konzentrationen nicht auf die relative Chlorophyll a-Konzentration der untersuchten Pflanzenarten aus.

Im Gegensatz dazu stellten COOK ET AL (1998) in Borstgras sowie SICHER & BUNCE (1998) und AGRAWAL & DEEPAK (2003) in Weizenblättern eine Abnahme der Chlorophyll-Konzentration unter erhöhten CO₂-Konzentrationen fest. Es ist jedoch zu beachten, dass in der vorliegenden Studie die relative Chlorophyll a-Konzentration mittels einer nicht-destruktiven Methode, der SPAD-Meter-Methode, durchgeführt wurde, während die oben genannten Autoren eine destruktive Methode zur Bestimmung der Pigmentkonzentration verwendeten. Ein direkter Vergleich der Studien ist demnach nur bedingt möglich. So bestimmten beispielsweise AGRAWAL & DEEPAK (2003) die Chlorophyll a- und b-Konzentration mittels Acetonextraktion und anschließender photometrischer Bestimmung des geernteten Blattmaterials. Die nicht destruktive Methode mittels des SPAD-Meters erlaubt zwar die Erfassung am lebenden Blatt, allerdings können methodenbedingte Messabweichungen nicht vermieden werden, die sich in den relativ hohen Standardabweichungen der Werte abzeichnen. So werden beispielsweise mittels des SPAD-Meters nur bestimmte Blattbereiche des zu untersuchenden Blattes berücksichtigt. Hingegen können Inhomogenitäten des Blattmaterials und dadurch bedingte Messabweichungen bei der Bestimmung der Chlorophyll a-Konzentration im Extrakt minimiert werden. Es ist demzufolge möglich, dass die SPAD-Methode geringe Einflüsse von CO₂ auf die Chlorophyll a-Konzentration nur eingeschränkt erfassen kann, so dass für zukünftige Studien eine parallele Bestimmung der Chlorophyll a-Konzentration mittels der Extraktmethode zu empfehlen ist.

Darüber hinaus bestimmte SCHÜTZ (2002) bei Sommerweizenblättern die Chlorophyll a-Menge mit der auch in der vorliegenden Studie verwendeten nicht-destruktiven Methode, so dass ein direkter Vergleich der beiden Studien möglich ist. Er stellte erst ab dem Zeitpunkt der Teigreife der Körner eine signifikante Abnahme der SPAD-Werte der Blätter aufgrund der erhöhten CO₂-Konzentrationen fest. Da die Blätter des Sommerweizens in der vorliegenden Studie nicht bis zur Teigreife der Körner untersucht wurden, kann eine Abnahme der relativen Chlorophyll a-Konzentration aufgrund der CO₂-Begasung zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung nicht ausgeschlossen werden.

Die vorliegenden Resultate weisen in ihrer Gesamtheit darauf hin, dass die biochemischen Veränderungen frühe Seneszenzmarker der Pflanzen darstellen und die eigentliche Seneszenz mittels der verwendeten nicht-destruktiven Methode erst zu einem späteren Zeitpunkt erfasst werden kann. Demzufolge kann eine CO₂-bedingte Beeinflussung des Seneszenzverlaufes und eine dadurch bedingte Erniedrigung der Protein- und Stickstoff-Konzentration der Blätter

in der vorliegenden Studie nicht ausgeschlossen werden. Dies scheint aufgrund der biochemischen und physiologischen Reaktionen des Sommerweizens sehr wahrscheinlich.

Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der reduzierten Protein- und Stickstoff-Konzentrationen stellt einen Eingriff des erhöhten Kohlendioxids in den Stickstoffhaushalt der Pflanze und damit verbunden eine *Umverteilung des Stickstoffs* in der Pflanze dar. Eine Umverteilung des Stickstoffs kann unter anderem durch Stickstoffmangel oder eine verbesserte Stickstoff-Effizienz der Pflanze ausgelöst werden.

So wurde die Konzentration an löslichen Proteinen bei einer Stickstoffmangelsituation der Pflanze reduziert (ROGERS ET AL. 1996). Die Autoren wiesen unter N-Mangel eine stärkere Reduzierung der Protein-Konzentration nach als unter optimaler Stickstoffversorgung. Bei Stickstoffmangel wurde die RubisCO abgebaut und der benötigte Stickstoff in die Stickstofflimitierten Organe der Pflanze transportiert. Da die Versuchspflanzen in der durchgeführten Studie jedoch mit einer ausreichenden Menge an Stickstoff versorgt wurden und die letzte Düngung direkt vor Beginn der biochemischen Untersuchungen durchgeführt wurde, ist diese Möglichkeit der Proteinregulation sehr unwahrscheinlich. Demzufolge kam es in der vorliegenden Studie zu einer Reduzierung der Gesamtprotein- und Stickstoff-Konzentration unter einer ausreichenden Stickstoffversorgung der Pflanzen. ADAM ET AL. (2004) untersuchten die Reaktionen der Photosynthese von Orangenbäumen unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen. Auch sie konnten unter einer optimalen Stickstoffversorgung der Pflanzen eine Abnahme der RubisCO-, Gesamtprotein- und Stickstoff-Konzentration der untersuchten Orangenblätter nachweisen. Diese Resultate werden von einer Studie von PAL ET AL. (2005) bestätigt. Die Autoren untersuchten die Photosynthese-Reaktionen von *Triticum aestivum* auf erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen in Abhängigkeit der Stickstoffversorgung. Die Studie zeigte, dass die Pflanzen auch unter optimaler Stickstoffversorgung mit einer Akklimatisierung der Photosynthese und einer Reduktion der RubisCO sowie der Gesamtkonzentration an löslichen Proteinen auf die CO₂-Begasung reagierten, was auch in der vorliegenden Studie nachgewiesen werden konnte.

Auch eine verbesserte Stickstoff-Nutzungseffizienz der Pflanzen unter erhöhtem Kohlendioxid kann zu einem Abbau der Proteine und des Stickstoffs in den vegetativen Organen und einer Umverteilung in andere Pflanzenorgane führen (ROGERS ET AL. 1993, JACOB ET AL. 1995, VON CAEMMERER ET AL. 2001). Eine veränderte N-Nutzungseffizienz ist auf physiologischen Reaktionen begründet, die zu einer Abnahme der Gesamtprotein-Konzentration führen können. Die erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen bewirken in der Pflanze einen höheren CO₂/O₂-Partialdruck. Dadurch kommt es zu einer Abnahme der Photorespiration und

der an diesem Stoffwechselfvorgang beteiligten Enzyme (FANGMEIER 2002). Die N-Allokation zu diesen Enzymsystemen wird folglich herunterreguliert (FANGMEIER & JÄGER 1998). Zusätzlich dazu wird in den begasten Pflanzen eine geringere Enzymausstattung benötigt, um die gleiche Photosyntheseleistung zu erbringen wie in den Kontrollpflanzen (WOODROW 1994, KÖRNER ET AL. 2001). Als Konsequenz dieser physiologischen Prozesse sinken unter erhöhtem Kohlendioxid die Stickstoff- und Proteinkonzentrationen. Der hierbei aus der RubisCO und anderen Proteinen der Photosynthese und Phototranspiration frei werdende Stickstoff wird entweder innerhalb der Zelle in den Aufbau anderer Proteine investiert (SAGE ET AL. 1989) oder in andere Pflanzenorgane, wie etwa die Wurzeln oder generative Organe, transportiert (STITT & KRAPP 1999). Eine Verteilung des gesamten gewonnenen Stickstoffs auf andere Proteine in der Zelle scheint in dieser Studie nicht möglich, da die Gesamtkonzentration des Stickstoffs und der Proteine reduziert wurde. Für eine teilweise Umschichtung des Stickstoffs innerhalb der Zelle spricht das Proteinmuster der vegetativen Pflanzenteile. Aufgrund der vorliegenden Daten kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei diesem Prozess auch Proteine des Sekundärstoffwechsels abgebaut werden und der frei werdende Stickstoff in andere Proteine investiert wird. So kam es bei einigen Proteinen aufgrund der CO₂-Begasung zu einer Erhöhung der relativen Konzentrationen. Es ist demnach möglich, dass ein Teil des Stickstoffs unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen in den Zellen der vegetativen Pflanzenteile in andere Proteine umgeschichtet wurde. Der größte Teil des Stickstoffs muss allerdings aufgrund der Abnahme der Proteinkonzentration aus den Zellen exportiert worden sein. So berichtete FANGMEIER ET AL. (2000), dass ein schnelleres Wachstum der Pflanzen unter erhöhtem Kohlendioxid in den Körnern von Sommergerste eine höhere Stickstoffnachfrage auslöste. Da bis zu 70% des Stickstoffs der Körner aus den Blättern importiert wird, wurde der Stickstoff aus den Blättern abgebaut, was dort zu einer Abnahme der N-Konzentration führte. Allerdings wurden die Proteinkonzentration und die Stickstoff-Konzentration der Körner des Haupttriebes in der vorliegenden Arbeit nicht aufgrund der Kohlendioxid-Begasung erhöht. Eine Veränderung der Biomasse der Ähren konnte unter erhöhtem Kohlendioxid auch nicht festgestellt werden, so dass ein erhöhter Import von Stickstoff in die Körner des Haupttriebes auszuschließen ist. Hingegen zeigen weitere Ergebnisse zu der Biomasse des Weizens am Ende der Vegetationsperiode eine Erhöhung der Halm- und Ährenbiomasse der Nebenriebe (HÖGY, pers. Mitteilung), ein Import von Assimilaten in diese Organe ist demzufolge sehr wahrscheinlich. Eine erhöhte Stickstoff-Effizienz in den CO₂-begasten vegetativen Organen scheint daher eine mögliche Erklärung für die Reaktionen der Pflanze auf erhöhtes Kohlendioxid sein.

Die untersuchten Körner des Sommerweizens wiesen im Gegensatz zu den vegetativen Organen keine Veränderungen der Protein- und Stickstoff-Konzentrationen während der Untersuchungsperiode auf. Darüber hinaus wurde das C/N-Verhältnis auch nicht beeinflusst. Theoretisch ist parallel zu einer Abnahme der Protein- und Stickstoff-Konzentrationen in den vegetativen Organen auch mit einer derartigen Abnahme in den generativen Organen zu rechnen, da die Körner den Stickstoff aus den vegetativen Organen beziehen. Eine mögliche Folge ist eine reduzierte Protein-Konzentration in den Körnern von Weizen und eine dadurch bedingte Abnahme der Kornqualität am Ende der Vegetationsperiode (CONROY ET AL. 1994). Die meisten Studien beobachteten eine gleichzeitige Zunahme des Ertrages und eine Abnahme der Protein-Konzentrationen (THOMPSON & WOODWARD 1994, ROGERS ET AL. 1998, HÖGY 2002, WU ET AL. 2004). Allerdings wurden diese Studien mit reifen Körnern durchgeführt, während in der vorliegenden Studie die sich entwickelnden Körner untersucht wurden, so dass eine Aussage über die Kornqualität der Weizenkörner an dieser Stelle nicht möglich ist. Es ist allerdings aufgrund der Veränderungen im Proteinstoffmuster zu erwarten, dass auch die Kornqualität im Endprodukt Mehl in den begasten Pflanzen verändert wurde. Diese Vermutung wird durch parallele Arbeiten zu der Kornqualität des untersuchten Sommerweizens bestätigt. So wurde die Qualität des Mehls aufgrund der erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen tendenziell verschlechtert (HÖGY, pers. Mitteilung). Die vorliegenden Resultate zeigen, dass die Proteinkonzentration der Körner während der Entwicklung keinen Aufschluss über die endgültige Kornqualität gibt.

Die eingangs aufgestellte dritte Arbeitshypothese kann folglich nur bedingt bestätigt werden, da die relative Chlorophyll a-Konzentration der vegetativen Organe nicht, wie erwartet, aufgrund der erhöhten Kohlendioxid-Begasung erniedrigt wurde. Die Regulationen des Protein- und Stickstoff-Stoffwechsels der untersuchten vegetativen Organe scheinen in einer früher einsetzenden Seneszenz und einer Umverteilung des Stickstoffs aufgrund einer verbesserten Stickstoff-Nutzungseffizienz der Pflanzen begründet zu sein. Darüber hinaus wurden die untersuchten Parameter der generativen Organe nicht beeinflusst.

Arbeitshypothese 4: Die Biomasseförderung der vegetativen Pflanzenorgane wirkt sich auch auf die Biomasse der generativen Organe aus.

Obwohl die vegetativen Organe einige Änderungen auf Proteom- und Physiologie-Ebene aufwiesen, wurde die Biomasse der Blätter aufgrund des erhöhten Kohlendioxides nicht beeinflusst. Darüber hinaus kam es auch nicht zu einer Veränderung der Biomasse der generativen

Organe oder der Gesamtbiomasse des Haupttriebes des Sommerweizens. Auch die Gesamtbiomasse einer Weizenpflanze, d.h. die Biomasse des Haupttriebes und der Nebentriebe, wurde während der Vegetationsperiode nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu zeigen Resultate zur oberirdischen Gesamtbiomasse des Weizens am Ende der Vegetationsperiode eine Zunahme der Trockenmasse von 10,9 % unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen. Hierbei wurde vor allem die Biomasse im Bereich der Halme und Ähren positiv beeinflusst, was auf eine vermehrte Bildung von Nebentrieben zurückzuführen war (HÖGY, in Vorbereitung). Die Förderung der Biomasse, insbesondere der generativen Pflanzenorgane, kam demzufolge erst zum Ende der Vegetationsperiode zum Tragen, konnte jedoch während der vegetativen Entwicklung noch nicht festgestellt werden. Diese Resultate stehen im Einklang mit der bisherigen Literatur, denn viele Forscher berichteten von Erhöhungen der Biomasse am Ende der Vegetationsperiode unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen (MITCHELL ET AL. 1996, POORTER ET AL. 1993, 1996, CRAIGON ET AL. 2002). So berichteten beispielsweise MITCHELL ET AL. (1996) von einer erhöhten Produktion der Trockenmasse und des Ertrages von Winterweizen unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen unter kontrollierten Bedingungen. Darüber hinaus stellte GRÜTERS (1999) fest, dass die vegetative Biomasse von Weizen unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen gefördert wurde. Einige Studien konnten eine erhöhte Anzahl der Nebentriebe von Getreide und eine dadurch erhöhte oberirdische Biomasse nachweisen (KENDALL ET AL. 1985, BAKER ET AL. 1996), was die oben genannten Resultate zur Biomasse am Ende der Vegetationsperiode bestätigen.

Hingegen stellten DIJKSTRA ET AL. (1999) bei einer Untersuchung von Winterweizen in open-top-Kammern fest, dass es während der Wachstumsperiode des Weizens nicht zu einer Förderung der oberirdischen Biomasse unter einer Kohlendioxid-Begasung kam. Allerdings wiesen die Pflanzen viele Veränderungen auf physiologischer Ebene, etwa eine Reduktion der Stickstoff-Konzentration, auf. Die Autoren begründeten dies mit einer Wachstumsrestriktion der Pflanzen aufgrund externer Bedingungen, in diesem Fall aufgrund von Trockenheit oder einer geringen Strahlungsmenge.

Auch MITCHELL ET AL. (1996) stellten fest, dass die Förderung der Biomasse des untersuchten Winterweizens von der Umgebungstemperatur abhing. So wiesen Pflanzen unter höheren Temperaturen einen geringeren Zuwachs der Biomasse auf als Pflanzen unter niedrigeren Temperaturen. Die Förderung der Biomasse unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen hängt demzufolge stark von verschiedenen externen Parametern wie der Temperatur ab.

Die eingangs gestellte fünfte Arbeitshypothese kann folglich aufgrund der vorliegenden Resultate nur bedingt belegt werden, da während der vegetativen Entwicklungsphase keine Förderung der Biomasse des Sommerweizens nachgewiesen wurde. Allerdings belegen zusätzliche Resultate die Förderung der generativen Organe des Sommerweizens.

Arbeitshypothese 5: Die vegetative und generative Entwicklung von Weizen und assoziierten Wildkräutern wird aufgrund der erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen beeinflusst.

Die in dieser Studie erhobenen Resultate zeigen, dass sich erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen in keinem der beiden Untersuchungsjahre auf die vegetative und generative Entwicklung des Weizens auswirkten. So wurden weder die Blattentwicklung, die Nebentriebentwicklung noch die Halmentwicklung oder die Blühzeit der begasten Pflanzen im Gegensatz zu den Pflanzen unter Kontrollbedingungen signifikant beeinflusst. Auch die vegetative und generative Entwicklung der Wildkräuter wurde nicht aufgrund des erhöhten Kohlendioxids beeinflusst.

Im Gegensatz dazu wiesen einige Studien ein beschleunigtes Wachstum und folglich eine früher einsetzende Seneszenz sowie meist eine Abnahme der Chlorophyll-Konzentration der Pflanzen unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen nach (SIONIT ET AL. 1980, NIE ET AL. 1995, SICHER & BUNCE 1998). Hierbei wurden diese Effekte sowohl unter kontrollierten als auch unter Freilandbedingungen bestätigt. So berichten beispielsweise MCMASTER ET AL. (1999) von einer beschleunigten Entwicklung der Blätter und der Nebentriebe von *Triticum aestivum* unter kontrollierten Bedingungen. Auch unter Freilandbedingungen wurde von einer früher einsetzenden Blüte und Seneszenz von Kartoffeln berichtet (MIGLIETTA ET AL. 1998).

Interessanterweise zeigen die Resultate der vorliegenden Studie keinen Effekt des erhöhten Kohlendioxids auf die untersuchten vegetativen und generativen Wachstumsphasen des Sommerweizens. Diese Ergebnisse werden von BATTI ET AL. (1996) und MOOT ET AL. (1996) bei Untersuchungen von Winterweizen unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen bestätigt. Auch MULHOLLAND ET AL. (1998) konnten keine direkten Effekte der langfristig erhöhten CO₂-Konzentrationen auf die Dauer der generativen Phase von Sommerweizen feststellen. BATTI ET AL. (1996) untersuchten die Entwicklung von Winterweizen unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen und unter erhöhten Temperaturen. Sie konnten keine Beeinflussung der Pflanzenentwicklung aufgrund der CO₂-Begasung feststellen, das Pflanzenwachstum wurde allerdings aufgrund erhöhter Temperaturen beschleunigt. Auch REEKIE

(1996) stellte fest, dass erhöhtes Kohlendioxid eine untergeordnete Rolle bei der Beeinflussung der Pflanzenentwicklung spielt. Es ist allerdings möglich, dass aufgrund einer verringerten Transpiration unter erhöhtem Kohlendioxid und der damit verringerten Kühlung der Blätter die Temperatur im Pflanzenbestand ansteigt. Erhöhtes Kohlendioxid scheint damit indirekt über eine Regulation der Temperatur in das Pflanzenwachstum eingreifen zu können (PINTER ET AL. 2000). Dies scheint in der vorliegenden Studie nicht zuzutreffen, eine Erfassung der Temperatur des Bestandes scheint jedoch in weiterführenden Studien sinnvoll.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass in den meisten Fällen die Effekte von erhöhten CO₂-Konzentrationen auf die Pflanzenentwicklung sehr gering waren. So stellten beispielsweise SIONIT ET AL. (1980) fest, dass die Blüte von Weizen unter erhöhten Kohlendioxidkonzentrationen ein bis zwei Tage früher einsetzte als die Blüte der Kontrollpflanzen. Auch SLAVER & RAWSON (1997) stellten nur tendenziell eine beschleunigte Entwicklung von Weizen unter langfristig erhöhtem Kohlendioxid fest, die jedoch keine agrarwirtschaftliche Relevanz bewirkten. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie hinsichtlich der vegetativen und generativen Entwicklung sprechen gegen eine Wachstumsbeschleunigung unter erhöhten Kohlendioxidkonzentrationen. Da die Aufnahmen zur Phänologie in der vorliegenden Untersuchung im wöchentlichen Turnus durchgeführt wurden, können somit schwache Reaktionen der Pflanzen nur ungenau erfasst werden. Damit ist nicht vollständig auszuschließen, dass die Entwicklung der Pflanzen geringfügig beeinflusst wurde. Für zukünftige Studien scheint es daher ratsam, eine höhere Frequenz in der Bestimmung der Pflanzenentwicklung anzustreben.

Arbeitshypothese 6: Während der Vegetationsperiode kommt es zu einer artspezifischen Wachsförderung, wodurch Änderungen in der Vegetationsstruktur der Pflanzengemeinschaft auftreten. Die Deckung des gesamten Pflanzenbestandes wird während der Vegetationsperiode aufgrund der erhöhten CO₂-Konzentrationen gefördert.

Die vorliegenden Resultate zu den Deckungsgraden während der Vegetationsperiode zeigen, dass es in der untersuchten Pflanzengemeinschaft nicht zu einer artspezifischen Wachsförderung kam. Darüber hinaus wiesen die Resultate generell keine Erhöhung der Biomasse während der Vegetationsperiode auf. Erhöhte CO₂-Konzentrationen bewirkten folglich keine Veränderung der Vegetationsstruktur des untersuchten Bestandes.

Die bisherigen Studien zu den Reaktionen von Pflanzengemeinschaften auf erhöhte CO₂-Konzentrationen zeigen ein breites Spektrum an Veränderungen. Hierbei wurde zwar die Biomasse der Pflanzengemeinschaft nicht immer gefördert, doch interessanterweise bewirkten

die erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen meist eine Veränderung der Struktur der Pflanzengemeinschaft (LEADLEY ET AL. 1999, MARISSINK & HANSSON 2002). So konnten KÖRNER ET AL. (1997) zwar keine Veränderung der Gesamtbiomasse eines alpinen Graslandes, jedoch eine Veränderung der Vegetationsstruktur nachweisen. Hierbei kam es zu einer Verschiebung der Biomasse der dominanten Art *Carex curvula* hin zu subdominanten Arten. POORTER ET AL. (1996) zeigten in einer Meta-Analyse von Studien zur CO₂-Anreicherung, dass schnellwachsende Wildkräuter am heftigsten mit einer Erhöhung der Biomasse reagierten. Da die untersuchten Wildkrautarten in den vorliegenden Studie nach der Einteilung von POORTER ET AL. (1996) schnellwachsende Arten sind, ist ebenfalls eine heftige Reaktion dieser Arten zu vermuten. Aufgrund der vorliegenden Resultate konnte eine Förderung der Deckungsgrade und damit der Blattfläche der Pflanzen jedoch nicht nachgewiesen werden, was unter anderem auf die unterschiedlichen Rahmenbedingungen der beiden Studien zurückzuführen ist. POORTER ET AL. (1996) beschreiben im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit die Reaktionen von Monokulturen unter erhöhten CO₂-Konzentrationen. Pflanzen in Konkurrenzsituationen scheinen demzufolge aufgrund der interspezifischen Konkurrenz ein komplexeres Reaktionsmuster aufzuweisen.

Darüber hinaus ergab die Literaturrecherche zu diesem Themengebiet, dass die meisten Studien die Auswirkungen von erhöhtem Kohlendioxid auf Pflanzengemeinschaften nicht wie in der vorliegenden Studie während nur einer Vegetationsperiode, sondern mittels einer dauerhaften Begasung über mehrere Versuchsjahre untersuchten (LEADLEY ET AL. 1999, REICH ET AL. 2001, NIKLAUS ET AL. 2001, KAMMANN ET AL. 2005). Beispielsweise zeigten LEADLEY ET AL. (1999) in diesem Zusammenhang, dass die Reaktion der Biomasse in ihrer Studie von der Dauer der Begasung abhing. Die Autoren untersuchten eine natürliche Grasland-Gesellschaft unter einer langfristigen Kohlendioxid-Begasung von drei Jahren. Die Pflanzen wurden während der Untersuchungsjahre geerntet und die Biomasse bestimmt. Allerdings kam es erst ab dem zweiten Jahr der Begasung zu einer Verschiebung der Vegetationsstruktur und einer art-spezifischen Wachsförderung. Es kam zwar im ersten Untersuchungsjahr zu Veränderungen auf physiologischer Ebene der Pflanzen, allerdings erst ab dem zweiten Jahr zu einer Wachsförderung einiger Arten der Pflanzengemeinschaft. Ein derartiges Reaktionsmuster wäre auch in der vorliegenden Studie denkbar. Allerdings musste hier aus versuchstechnischen Gründen die Pflanzengemeinschaft in jedem Jahr neu ausgesät werden. Dies ist für die Kulturform *Triticum aestivum* üblich und entspricht der ackerbaulichen Praxis. Die Ackerwildkrautflora würde aber unter den (halb-)natürlichen Bedingungen des Ackerbaus eigenständig im System aussamen, wodurch eine langfristige Adaption mit den zu erwartenden Effekten möglich ist.

Hierdurch bedingt können keine Aussagen über langfristige Veränderungen der Vegetationsstruktur in Weizen-Wildkraut-Beständen getroffen werden. Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Unterschiede in der Physiologie des Sommerweizens unterstreichen jedoch deutlich die Möglichkeit vergleichbarer langfristiger Veränderungen, die LEADLEY ET AL. (1999) in ihrer Studie beschreiben. Aus den Resultaten dieser Studie kann demzufolge abgeleitet werden, dass einjährige Pflanzengemeinschaften unter Freilandbedingungen aufgrund einer vegetationsbedingten relativ kurzen Expositionsdauer nicht auf die erhöhten CO₂-Konzentrationen reagieren.

Ferner ist zu beachten, dass in der vorliegenden Studie die Vegetationsstruktur mittels einer nicht-destruktiven Methode, der Schätzung der Deckungsgrade (Deckungsgrad-Methode), erfolgte. Im Gegensatz dazu untersuchten die meisten bisherigen Studien die Vegetationsstruktur mittels einer destruktiven Methode, der Ernte des Pflanzenmaterials (Ernte-Methode). Ein direkter Vergleich dieser Methoden ist aus folgenden Gründen nur bedingt möglich. Zum einen kann eine eventuelle Förderung der Halmbiomasse oder der generativen Organe mittels der Deckungsgrad-Methode nur schwer erfasst werden. Folglich kann eine Veränderung der Vegetationsstruktur hinsichtlich einer unterschiedlichen Förderung dieser Pflanzenteile in der vorliegenden Studie nicht ausgeschlossen werden. Darüber hinaus ist die Deckung der Pflanzen nur auf eine Ebene reduziert, wodurch eine Überlappung von Blättern nur bedingt erfasst werden kann. Ein Vorteil der Deckungsgrad-Methode ist die Erfassung auch derjenigen Pflanzenarten, die am Ende der Vegetationsperiode bei der Ernte des Pflanzenmaterials bereits abgestorben sind. Für zukünftige Arbeiten empfiehlt sich daher eine Kombination von nicht-destruktiven und destruktiven Methoden während der Vegetationsperiode.

4.1 FAZIT UND AUSBLICK

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die untersuchten Pflanzen auf biochemischer und physiologischer Ebene stark auf die erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen reagierten. Diese Änderungen im Stoffwechsel der Pflanzen wirkten sich jedoch nicht auf die Deckungsgrade der Pflanzen aus. Erhöhtes Kohlendioxid bewirkte demzufolge keine Wachsförderung der untersuchten Arten während der Vegetationsperiode. Darüber hinaus wiesen die Blätter und Körner des Sommerweizens Veränderungen sowohl im Primär- als auch im Sekundärstoffwechsel auf. Hierbei scheint erhöhtes Kohlendioxid in die Kohlenhydratverteilung der Pflanze und verschiedene Abwehrmechanismen einzugreifen. So zeigten die vorliegenden Resultate, dass die Pflanzenabwehr der vegetativen Pflanzenorgane unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentra-

tionen erniedrigt wird. Demzufolge wäre es interessant, inwiefern solche Pflanzen bei einem Pathogenbefall in einer zukünftigen CO₂-Welt reagieren. Diese Reaktionsmuster könnten insbesondere bei der Entwicklung resistenter Sorten von besonderem Interesse sein.

In der vorliegenden Studie lag der Fokus auf der Analyse niedermolekularer Verbindungen, die starke Reaktionen auf die CO₂-Begasung zeigten. Allerdings wurde hierbei nur ein Ausschnitt des gesamten Proteoms, sozusagen die „Spitze des Eisberges“, untersucht. Es ist jedoch aufgrund der vorliegenden Resultate zu erwarten, dass ein viel größeres Spektrum an Proteinen beeinflusst wird. Eine umfassende Analyse der Veränderungen des Pflanzenproteoms, etwa mittels einer Kombination der SELDI-TOF-MS und der 2DE-Technologien, könnte zukünftig weitere Veränderungen der Proteine detektieren. Auch der Einsatz neuer Methoden wie etwa der 2D *Fluoreszenz Difference Gel Electrophoresis* (2D-DIGE) oder der zweidimensionale Flüssigkeitschromatographie (2D-LC) kann zukünftig neue Erkenntnisse über die vielfältigen Reaktionen der Pflanzenproteome auf Umweltveränderungen liefern (KOMATSU ET AL. 2006). Ein verstärkter Einsatz der Proteomik auf dem Gebiet der Stressphysiologie und vor allem hinsichtlich der Qualitätssicherung der Kulturpflanzen scheint daher in Zukunft unabdingbar.

Auch die Analyse der Pflanzen an unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten gab Aufschluss über die komplexen Veränderungen auf biochemischer und physiologischer Ebene. Die vorliegenden Resultate weisen demnach darauf hin, dass die Pflanzen vor allem während der generativen Entwicklungsphase besonders sensibel auf die erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen reagierten. Auch ADAM ET AL. (2000) und KÖRNER (2003) weisen auf die Notwendigkeit der Berücksichtigung der Entwicklungsstadien bei der Interpretation von CO₂-Effekten hin. Zukünftige Studien sollten demzufolge kontinuierliche Analysen während der Pflanzenentwicklung anstreben.

Darüber hinaus wäre es interessant, inwiefern sich die Wildkräuter an langfristig erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen anpassen können. Die bisherigen Studien lassen darauf schließen, dass die Pflanzen erst nach einer mehrjährigen Begasung und damit nicht in der ersten Generation auf erhöhtes Kohlendioxid reagieren. Da die Kulturarten nach gängiger ackerbaulicher Praxis jährlich neu ausgesät werden, ist es möglich, dass angepasste Wildkräuter unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen einen Vorteil gegenüber den Kulturarten haben. Hierbei ist zu erwarten, dass vor allem konkurrenzstarke Unkräuter, wie etwa die Gemeine Quecke, in einer zukünftigen CO₂-Welt aufgrund einer starken Förderung der Biomasse ein immer größer werdendes Problem darstellen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Anstieg der atmosphärischen Kohlendioxid-Konzentration aufgrund anthropogener Einflüsse der letzten 150 Jahre stellt die wichtigste Komponente des globalen Klimawandels dar. Verschiedene Modelle prognostizieren auch für die Zukunft eine weitere Erhöhung des Kohlendioxides in unserer Atmosphäre, so dass mit einer zunehmenden Erwärmung der Erde und direkten Veränderungen der Pflanzenwelt zu rechnen ist.

Die meisten bislang durchgeführten experimentellen Studien zur CO₂-Wirkungsforschung wurden unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt, während weltweit nur circa 30 Anlagen existieren, in denen Experimente unter Freilandbedingungen durchgeführt werden. Vor diesem Hintergrund waren die Ziele der vorliegenden Arbeit, die Auswirkungen erhöhter CO₂-Konzentrationen auf eine Pflanzen-Gemeinschaft hinsichtlich (i) des Pflanzenproteoms, (ii) der Physiologie, (iii) der Bestandesentwicklung sowie (iv) der potentiellen Beziehungen zwischen diesen Wirkungskriterien unter Freilandbedingungen zu untersuchen.

Dazu wurde eine Weizen-Wildkraut-Gemeinschaft mittels der Mini-FACE-Technologie zwei unterschiedlichen Behandlungen ausgesetzt: (a) *Ambient* (CO₂-Konzentration der Umgebungsluft, circa 380 ppm) und (b) *FACE* (*Ambient* + 150 ppm CO₂). Im Fokus der Untersuchungen standen die Kulturart Sommerweizen (*Triticum aestivum* cv. Triso) und die Wildkrautart Ackersenf (*Sinapis arvensis* L.) hinsichtlich ihrer biochemischen und physiologischen Reaktionen auf die CO₂-Behandlung. Der erstmalige Einsatz der SELDI-TOF-MS-Technologie auf dem Gebiet der CO₂-Wirkungsforschung ermöglichte die quantitative und qualitative Analyse niedermolekularer Proteine mit sehr geringen Konzentrationen, was mit den bisherigen Standardmethoden der Proteomik nur bedingt möglich war. Zusätzlich zu den biochemischen und physiologischen Analysen wurde während der Vegetationsperiode die Bestandesentwicklung mittels kontinuierlicher Bestimmung der phänologischen Entwicklungsstadien und der Deckungsgrade untersucht.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Proteinmuster des Sommerweizens und des Ackersenfs aufgrund der CO₂-Exposition beeinflusst wurden. Dabei zeigte sich, dass kein spezifisches Protein neu gebildet wurde, sondern Veränderungen der relativen Konzentrationen mehrerer Proteine auftraten. Das Ausmaß dieser Veränderungen war hierbei in beiden Arten vom Entwicklungszustand abhängig, in dem sich die Pflanzen zum Zeitpunkt der Beprobung befanden. Das Proteinmuster der Blätter des Weizens wurde hauptsächlich während der generativen Pflanzenentwicklung beeinflusst. Demnach scheint dieser Zeitpunkt eine Phase besonderer Sensibilität gegenüber Umweltveränderungen zu sein.

Insgesamt konnten drei Proteine identifiziert werden, die signifikant von erhöhten CO₂-Konzentrationen beeinflusst wurden. Hierbei handelt es sich um ein Protein aus dem Primärstoffwechsel der Pflanzen, den Saccharose-H⁺-Symporter aus den Körnern des Weizens. Dieses Protein stellt eine wichtige Kontrollstelle für den Saccharose-Import in die sich entwickelnden Körner dar. Die erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen scheinen folglich über eine Regulation der Saccharose-H⁺-Symporter aktiv in die Assimilatverteilung der Pflanzen einzugreifen. Darüber hinaus reagierten auch Proteine des Sekundärstoffwechsels auf die CO₂-Begasung. Hier konnten das PR4-Protein in den Körnern und die LRR-Kinase in den Blättern identifiziert werden. Beide Proteine stehen in engem Zusammenhang mit der Abwehrreaktion der Pflanze gegenüber Pathogenen. Erhöhtes Kohlendioxid bewirkte in den vegetativen Organen eine Erniedrigung der Abwehrrerkennung, was bei einem Befall von Pathogenen negative Auswirkungen auf die Pflanze haben kann.

Der Konzentration an löslichen Proteinen sowie des Gesamt-Stickstoffs wurden in den Blättern des Sommerweizens verringert, während das C/N-Verhältnis der Blätter anstieg. Demgegenüber wurde die relative Chlorophyll a-Konzentration und die Entwicklung des Sommerweizens nicht beeinflusst, wodurch ein beschleunigtes Wachstum der Pflanzen unter erhöhtem CO₂ ausgeschlossen werden kann. Das vorliegende Reaktionsmuster weist demzufolge auf eine verbesserte Stickstoff-Nutzungs-Effizienz der Pflanzen unter erhöhten Kohlendioxid-Konzentrationen hin. Es kam nicht zu einer Förderung der Biomasseentwicklung einzelner Sommerweizenpflanzen während der Vegetationsperiode; parallele Untersuchungen weisen jedoch auf ein erhöhtes Wachstum und einen höheren Ertrag der Pflanzen am Ende der Vegetationsperiode hin. Die Deckungsgrade des Weizens und der Wildkräuter wurden in keinem der beiden Untersuchungsjahre aufgrund erhöhter CO₂-Konzentrationen verändert. Die Resultate lassen den Schluss zu, dass einjährige ackerbaulich genutzte Systeme unter Freilandbedingungen zwar hinsichtlich der Proteomik und Physiologie starke Veränderungen zeigen, die Bestandesentwicklung jedoch aufgrund einer relativ kurzen Expositionsdauer nicht beeinflusst wurde. Die in dieser Studie nachgewiesenen Reaktionen auf Proteomebene könnten langfristig bei der Züchtung optimal angepasster Pflanzen eine bedeutende Rolle spielen.

6 SUMMARY

The enhancement of the atmospheric carbon dioxide concentration in the last 150 years due to human activities is one of the main components of global change. For the future, different scenarios predict a steadily increase of carbon dioxide in our atmosphere. As carbon dioxide is the most important carbon source for plants, higher CO₂ concentrations have the potential to cause direct effects on plant metabolism and vegetation development.

Until now almost all of the studies concerning the effects of elevated CO₂ on plants were carried out under controlled conditions, whereas the effects under natural conditions are investigated at only 33 sites worldwide. The aims of this study were to investigate the effects of elevated carbon dioxide on a plant community under natural conditions with regard of (i) the plant proteome, (ii) the plant physiology, (iii) the vegetation development and (iv) the potential interactions between these criteria.

Therefore a Mini-FACE system was used to expose a plant community composed of wheat and weeds to two different treatments: (a) *Ambient* (ambient CO₂ concentration, circa 380 ppm) and (b) *FACE* (*Ambient* + 150 ppm CO₂). The study mainly focussed on the biochemical and physiological reactions of spring wheat (*Triticum aestivum* cv. Triso) as a crop species and wild mustard (*Sinapis arvensis* L.) as a weed species on carbon dioxide enrichment. The SELDI-TOF-MS technology was applied for the first time in the topic of carbon dioxide impacts on plants. The technology provides the opportunity to quantitatively and qualitatively investigate low molecular weight proteins with low abundances, which has been difficult to realise with the standardized methodology in proteomics until now. In addition to the biochemical and physiological analysis, the vegetation development was investigated continuously during the vegetation period using non-destructive methods. This included the assessment of species phenology and species dominance.

The results of the performed study show that the carbon dioxide enrichment affects the protein profiles of both species wheat and wild mustard. Interestingly, many alterations in the protein concentrations were found, but no protein could be detected to be exclusively expressed under CO₂ treatment. The degree of modification in both species was influenced by their developmental stage. Particularly the protein profile of wheat leaves was strongly influenced during generative plant development, therefore the plants seems to be highly sensitive to environmental changes during this developmental stage. Altogether three proteins were identified which were affected by CO₂ treatment. The first protein, the saccharose-H⁺-symporter protein, was detected in the grain of spring wheat and is associated with the plant's

primary metabolism. This protein plays an important role in controlling the import of saccharose in developing grain. Consequently, elevated CO₂ seems to regulate the allocation of assimilates in an active way by influencing the saccharose-H⁺-symporter concentration in the grain of spring wheat. Furthermore, the remaining two proteins, the PR4 protein localized in the grains and the LRR-kinase protein accumulated in the leaves of spring wheat, are associated with the secondary plant metabolism and they also responded to the elevated CO₂ concentrations. These proteins are linked with defense reactions of the plants against pathogens. The elevated CO₂ concentrations caused a decrease in defense recognition in the vegetative tissue. If the plant is infected by pathogens this down-regulation could result in a negative impact. The concentration of soluble proteins and of total nitrogen decreased in the leaves of spring wheat whereas the C/N ratio increased. Despite this the relative concentration of Chlorophyll a was not affected and therefore an accelerated growth of the plants due to the carbon dioxide enrichment can be excluded. Thus the detected pattern of responses suggests an enhanced nitrogen use efficiency under increased CO₂ concentrations. The biomass of single spring wheat plants was unaltered during the vegetation period whereas other investigations in parallel showed an enhanced growth and a greater yield of spring wheat at the end of the vegetation period. Species dominance of wheat and weeds was neither influenced in the first nor the second year of investigation with regard to CO₂ enrichment.

The results indicate that annual crop systems under natural conditions indeed exhibit strong reactions concerning proteomics and physiology, but not concerning the plant development probably due to a relative short time of exposition. Based on long term considerations the detected reactions of the plant proteome may play an important role in the breeding of optimal adapted plants.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- ADAM, N.R.; WALL, G.W.; KIMBALL, B.A.; PINTER, P.J.; LAMORTE, R.L.; HUNSAKER, D.J.; ADAMSEN, F.J.; THOMPSON, T.; MATTHIAS, A.D.; LEAVITT, S.W. & WEBBER, A.N. (2000): Acclimation response of spring wheat in a free-air CO₂ enrichment (FACE) atmosphere with variable soil nitrogen regimes. 1. Leaf position and phenology determine acclimation response. *Photosynthesis Research*, 66: 65-77.
- ADAM, N.R.; WALL, G.W.; KIMBALL, B.A.; IDSO, S.B. & WEBBER, A.N. (2004): Photosynthetic down-regulation over long-term CO₂ enrichment in leaves of sour orange (*Citrus aurantium*) trees. *New Phytologist*, 163: 341-347.
- AGRAWAL, G.K.; RAKWAL, R.; YONEKURA, M.; KUBO, A. & SAJI, H. (2002): Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for investigating ozone stress in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Proteomics*, 2: 947-959.
- AGRAWAL, G.K.; YONEKURA, M.; IWAHASHI, Y.; IWAHASHI, H. & RAKWAL, R. (2005): Systems, trends and perspectives of proteomics in dicot plants Part III: Unraveling the proteomes influenced by the environment, and at the levels of function and genetic relationships. *Journal of Chromatography B*, 815: 137-145.
- AGRAWAL, M. & DEEPAK, S.S. (2003): Physiological and biochemical responses of two cultivars of wheat to elevated levels of CO₂ and SO₂, singly and in combination. *Environmental Pollution*, 121: 189-197.
- ANDERSON, L. & SEILHAMER, J. (1997): A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*, 18: 533-537.
- AUGUSTIN, L.; BARBANTE, C.; BARNES, P.R.F.; BARNOLA, J.M.; BIGLER, M.; CASTELLANO, E.; CATTANI, O.; CHAPPELLAZ, J.; DAHL-JENSEN, D.; DELMONTE, B.; DREYFUS, G.; DURAND, G.; FALOURD, S.; FISCHER, H.; FLÜCKIGER, J.; HANSSON, M.E.; HUYBRECHTS, P.; JUGIE, R.; JOHNSEN, S.J.; JOUZEL, J.; KAUFMANN, P.; KIPFSTUHL, J.; LAMBERT, F.; LIPENKOV, V.Y.; LITTOT, G.V.C.; LONGINELLI, A.; LORRAIN, R.; MAGGI, V.; MASSON-DELMOTTE, V.; MILLER, H.; MULVANEY, R.; OERLEMANS, J.; OERTER, H.; OROMBELLI, G.; PARRENIN, F.; PEEL, D.A.; PETIT, J.R.; RAYNAUD, D.; RITZ, C.; RUTH, U.; SCHWANDER, J.; SIEGENTHALER, U.; SOUCHEZ, R.; STAUFFER, B.; STEFFENSEN, J.P.; STENNI, B.; STOCKER, T.F.; TABACCO, I.E.; UDISTI, R.; VAN DE WAL, R.S.W.; VAN DEN BROEKE, M.; WEISS, J.; WILHELMS, F.; WINTHER, J.G.; WOLFF, E.W. & ZUCHELLI, M., (2004): Eight glacial cycles from an Antarctic ice core. *Nature*, 429: 623-628.
- BAE, H. & SICHER, R. (2004): Changes of soluble protein expression and leaf metabolite levels in *Arabidopsis thaliana* grown in elevated atmospheric carbon dioxide. *Field Crops Research*, 90: 61-73.
- BAKER, J.T.; ALLEN, L.H.; BOOTE, K.J. & PICKERING, N.B., (1996): Assessment of rice responses to global climate change: CO₂ and temperature. In: Koch, G.W. & Mooney, H.A. (Editoren), *Carbon dioxide and Terrestrial Ecosystems*. Academic Press, San Diego, 265-282.
- BARBIER-BRYGOO, D. (2004): Introduction: Focus on plant proteomics. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 913-917.

- BARNES, J.D.; OLLERENSHAW, J.H. & WHITFIELD, C.P. (1995): Effects of elevated CO₂ and/or O₃ on growth, development and physiology of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Global Change Biology*, 1: 129-142.
- BATTS, G.R.; WHEELER, T.R.; MORISON, J.I.L.; ELLIS, R.H. & HADLEY, P., (1996): Developmental and tillering responses of winter wheat (*Triticum aestivum*) crops to CO₂ and temperature. *Journal of Agricultural Science*, 127: 23-35.
- BAXTER, R.; ASHENDEN, T.W.; AND FARRAR, J.F. (1997): Effect of elevated CO₂ and nutrient status on growth, dry matter partitioning and nutrient content of *Poa alpina* var. *vivipara* L. *Journal of Experimental Botany*, 48: 1477-1486.
- BEERLING, D.J.; MCELWAIN, J. & OSBORNE, C.P. (1998): Stomatal responses of the 'living fossil' *Ginkgo biloba* L. to changes in atmospheric CO₂ concentrations. *Journal of Experimental Botany*, 49: 1603-1607.
- BESTEL-CORRE, G.; DUMAS-GAUDOT, E.; POINSOT, V.; DIEU, M.; DIERICK, J.-F.; VAN TUINEN, D.; REMACLE, J.; GIANINAZZI-PEARSON, V. & GIANINAZZI, S. (2002): Proteome analysis and identification of symbiosis-related proteins from *Medicago truncatula* Gaertn. by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis*, 23: 122-137.
- BOLWELL, G.P.; SLABAS, A.R.; & WHITELEGGE, J.P. (2004): Proteomics: empowering systems biology in plants. *Phytochemistry*, 65: 1443-1447.
- BOWES, G. (1991): Growth at elevated CO₂: Photosynthetic responses mediated through RubisCO. *Plant, Cell and Environment*, 14: 795-806.
- BOWES, G. (1993): Facing the inevitable: Plants and increasing atmospheric CO₂. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 44: 309-322.
- BOWES, G.; VU, J.C.V.; HUSSAIN, M.W.; PENNANEN, A.H. & ALLEN, L.H. (1996): An overview of how RubisCO and carbohydrate metabolism may be regulated at elevated atmospheric CO₂ and temperature. *Agricultural and Food Science in Finland*, 5: 261-270.
- BUSCH, A.; MICHEL, S.; HOPPE, C.; DRIESCH, D.; CLAUSSEN, U. & VON EGGELING, F. (2005): Proteome analysis of maternal serum samples for trisomy 21 pregnancies using ProteinChip arrays and bioinformatics. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 53: 341-343.
- CAPORALE, C.; DI BERARDINO, I.; LEONARDI, L.; BERTINI, L.; CASCONI, A.; BUONOCORE, V. & CARUSO, C. (2004): Wheat pathogenesis-related proteins of class 4 have ribonuclease activity. *FEBS Letters*, 575: 71-76.
- CHAPMAN, K. (2002): The ProteinChip® Biomarker System from Ciphergen Biosystems: a novel proteomics platform for rapid biomarker discovery and validation. *Biochemical Society Transactions*, 30: 82-87
- CHENG, S.H.; MOORE, B.D. & SEEMANN, J.R. (1998): Effects of short- and long-term elevated CO₂ on the expression of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes and carbohydrate accumulation in leaves of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology* 116: 715-723.

- CHIOU, T.J. & BUSH, D.R., (1998): Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 95: 4784-4788.
- CHUNG, H.; ZAK, D.R. & LILLESKOV, E.A. (2006): Fungal community composition and metabolism under elevated CO₂ and O₃. *Oecologia*, 147: 143-154.
- COLEMAN, J.S.; MC CONNAUGHAY, K.D.M. & BAZZAZ, F.A. (1993): Elevated CO₂ and plant nitrogen-use - is reduced tissue nitrogen concentration size-dependent? *Oecologia*, 93: 195-200.
- CONROY, J.P.; SENEWEERA, S.; BASRA, A.S.; ROGERS, G. & NISSENWOOLLER, B. (1994): Influence of rising atmospheric CO₂ concentrations and temperature on growth, yield and grain quality of cereal crops. *Australian Journal of Plant Physiology*, 21: 741-758.
- COOK, A.C.; TISSUE, D.T.; ROBERTS, S.W. & OECHEL, W.C. (1998): Effects of long-term elevated [CO₂] from natural CO₂ springs on *Nardus stricta*: Photosynthesis, biochemistry, growth and phenology. *Plant, Cell and Environment* 21: 417-425.
- COTRUFO, M.F.; INESON, P. & SCOTT, A. (1998): Elevated CO₂ reduces the nitrogen concentrations of plant tissue. *Global Change Biology* 4: 43-54.
- COWLING, S.A. & SAGE, R.F. (1998): Interactive effects of low atmospheric CO₂ and elevated temperature on growth, photosynthesis and respiration in *Phaseolus vulgaris*. *Plant, Cell and Environment* 21: 427-435.
- COX, P.M.; BETTS, R.A.; JONES, C.D.; SPALL, S.A. & TOTTERDELL, I.J. (2000): Acceleration of global warming due to carbon-cycle feedbacks in a coupled climate model. *Nature*, 408: 184-187.
- CRAIGON, J.; FANGMEIER, A.; JONES, M.H.; DONNELLY, A.; BINDI, M.; DE TEMMERMAN, L.; PERSSON, K. & OJANPERÄ, K. (2002): Growth and marketable-yield responses of potato to increasing CO₂ and ozone. *European Journal of Agronomy*, 17: 273-289.
- CURE, J.D. & ACOCK, B., (1986): Crop response to carbon dioxide doubling: a literature survey. *Agricultural and Forest Meteorology*, 38: 127-145.
- DIERSCHKE, H. (1972): Zur Aufnahme und Darstellung phänologischer Erscheinungen in Pflanzengesellschaften. Grundfragen und Methoden in der Pflanzensoziologie. Ber. Int. Symp. IVV Rinteln. Junk, Den Haag, 291-311.
- DIÉVART, A. & CLARK, S.E. (2004): LRR-containing receptors regulating plant development and defense. *Development*, 131:251-261.
- DIJKSTRA, P.; SCHAPENDONK, A.H.; GROENWOLD, K.; JANSEN, M. & VAN DE GEIJN, S. C. (1999): Seasonal changes in the response of winter wheat to elevated atmospheric CO₂ concentration grown in Open-Top Chambers and field tracking enclosures. *Global Change Biology*, 5: 563-576.
- DONNELLY, B.E.; MADDEN, R.D.; PORTER, D. & DILLWITH, J.W. (2005): The wheat (*Triticum aestivum* L.) leaf proteome. *Proteomics*, 5: 1624-1633.
- DRAKE, B.G.; GONZÁLEZ-MELER, M.A. & LONG, S. P. (1997): More efficient plants: A consequence of rising atmospheric CO₂? *Annual Review of Plant Physiology*, 48: 609-639.

- DRAKE, B.G.; AZCON-BIETO, J.; BUNCE, J.; DIJKSTRA, P.; FARRAR, J.; GIFFORD, R.M.; GONZALEZ-MELER, M.A.; KOCH, G.; LAMBERS, H.; SIEDOW, J. & WULLSCHLEGER, S. (1999): Does elevated atmospheric CO₂ concentration inhibit mitochondrial respiration in green plants? *Plant, Cell and Environment* 22, 649-657.
- DRISCOLL, S.P.; PRINS, A.; OLMOS, E.; KUNERT, K.J. & FOYER, C.H. (2005): Specification of adaxial and abaxial stomata, epidermal structure and photosynthesis to CO₂ enrichment in maize leaves. *Journal of Experimental Botany* 57: 381-390.
- DUBEY, H. & GROVER, A. (2001): Current initiatives in proteomics research: The plant perspective. *Current Science*, 80: 262-269.
- EAMUS, D. (1996): Tree responses to CO₂ enrichment: CO₂ and temperature interactions, biomass allocation and stand-scale modelling. *Tree Physiology*, 16: 43-47.
- EICKLER, B. (2004): Auswirkungen erhöhter atmosphärischer CO₂-Konzentrationen auf Kohlenhydrate und Futterqualität von Wildkrautarten und Weizen. Diplomarbeit, Institut für Landschafts- und Pflanzenökologie, Universität Hohenheim.
- EMANUEL, K. (2005): Increasing destructiveness of tropical cyclones over the past 30 years. *Nature*, 436: 686-688.
- ERBS, M. & FANGMEIER, A. (2006): Atmospheric carbon dioxide enrichment effects on ecosystems - experiments and the real world. *Progress in Botany* 67, 441-459.
- FALK, J., KRAUB, N., DÄHNHARDT, D. & KRUPINSKA, K. (2002): The senescence associated gene of barley encoding 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is expressed during oxidative stress. *Journal of Plant Physiology*, 159: 1245-1253.
- FANGMEIER, A. & JÄGER, H.-J. (1998): CO₂ enrichment, ozone, nitrogen fertilizer and wheat: physiological background of growth and yield responses. In: De Kok, L.J. & I. Stulen, I., Responses of Plant Metabolism to Air Pollution and Global Change. Backhuys Publ., Leiden, 299-304.
- FANGMEIER, A.; DE TEMMERMAN, L.; MORTENSEN, L.; KEMP, K.; BURKE, J.; MITCHELL, R.; VAN OIJEN, M. & WEIGEL, H. J. (1999): Effects on nutrients and on grain quality in spring wheat crops grown under elevated CO₂ concentrations and stress conditions in the European, multiple-site experiment 'ESPACE-wheat'. *European Journal of Agronomy*, 10: 215-229.
- FANGMEIER, A.; CHROST, B.; HÖGY, P. & KRUPINSKA, K. (2000): CO₂ enrichment enhances flag leaf senescence in barley due to greater grain nitrogen sink capacity. *Environmental and Experimental Botany* 44, 151-164.
- FANGMEIER, A. & JÄGER, H.-J. (2001): Wirkungen erhöhter CO₂-Konzentrationen. In: Guderian, R., Handbuch der Umweltveränderungen und Ökotoxikologie, Band 2A: Terrestrische Ökosysteme. Springer, Berlin/Heidelberg/New York, 382-433.
- FANGMEIER, A., 2002. Globaler Klimawandel: direkte Wirkungen auf Nahrungspflanzen. In: Böcker, R. & Sandhage-Hofmann, A.: Globale Klimaerwärmung und Ernährungssicherung. Heimbach, Stuttgart, 51-60.

- GAHRTZ, M.; SCHMELZER, E.; STOLZ, J. & SAUER, N. (1996): Expression of the PmSUC1 sucrose carrier gene from *Plantago major* L. is induced during seed development. *The Plant Journal*, 9: 93-100.
- GEIGER, M.; WALCH-LIU, P.; ENGELS, C.; HARNECKER, J.; SCHULZE, E.D.; LUDEWIG, F.; SONNEWALD, U.; SCHEIBLE, W.R. & STITT, M. (1998): Enhanced carbon dioxide leads to a modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity in older plants, and a large stimulation of nitrate reductase activity and higher levels of amino acids in young tobacco plants. *Plant, Cell and Environment* 21, 253-268.
- GRÜTERS, U. (1999): On the role of wheat stem reserves when source-sink balance is disturbed by elevated CO₂. *Journal of Applied Botany - Angewandte Botanik*, 73: 55-62.
- GRÜTERS, U.; FANGMEIER, A. & JÄGER, H.-J., (2000): Scaling the response of wheat to elevated CO₂: Comparison of photosynthetic acclimation and organ/plant growth. *Journal of Applied Botany - Angewandte Botanik*, 74:74-82 pp.
- GYGI, S.P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B.R. & AEBERSOLD, R. (1999): Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular Cell Biology*, 19: 1720-1730.
- HAJÓS, G.; SZABÓ, E. & JANÁKY, T. (2004): Two-dimensional electrophoresis, MALDI-TOF MS and blotting for identification and characterisation of pathogenesis-related proteins in wheat cultivar. *Chromatographia Supplement*, 60: S257-S259.
- HASLAM, R.P.; DOWNIE, A.L.; RAVETON, M.; GALLARDO, K.; JOB, D.; PALLETT, K.E.; JOHN, P.; PARRY, M.A.J. & COLEMAN, J.O.D. (2003): The assessment of enriched apoplasmic extracts using proteomic approaches. *Annals of Applied Biology*, 143: 81-91.
- HEGERFELD, J. (2004). Die Beeinflussung des Stickstoff- und Mineralstoffhaushaltes durch erhöhte CO₂-Konzentrationen in Arten der Ackerbegleitflora. Diplomarbeit, Institut für Landschafts- und Pflanzenökologie, Universität Hohenheim.
- HIRANO, H.; ISLAM, N. & KAWASAKI, H. (2004): Technical aspects of functional proteomics in plants. *Phytochemistry*, 65: 1487-1498.
- HOCKING, P.J. & MEYER, C.P. (1991): Carbon dioxide enrichment decreases critical nitrate and nitrogen concentrations in wheat. *Journal of Plant Nutrition*, 14: 571-584.
- HÖGY, P. (2002): Wirkungen erhöhter CO₂ und / oder Ozonkonzentrationen auf den Ertrag und die Qualität landwirtschaftlicher Nutzpflanzen. Dissertation, Institut für Pflanzenökologie, Justus-Liebig-Universität Giessen.
- HUMBECK, K.; QUAST, S. & KRUPINSKA, K. (1996): Functional and molecular changes in the photosynthetic apparatus during senescence of flag leaves from field-grown barley plants. *Plant, Cell & Environment*, 19: 337-344.
- HUMBECK, K. & KRUPINSKA, K. (2006): The abundance of minor chlorophyll a/b-binding proteins CP29 and LHCI of barley (*Hordeum vulgare* L.) during leaf senescence is controlled by light. *Journal of Experimental Botany*, 54: 375-383.
- HUTCHENS, T.W. & YIP, T.T. (1993): New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 7: 576-580.

- IDSO, S.B. & KIMBALL, B.A. (1992): Effects of atmospheric CO₂ enrichment on photosynthesis, respiration, and growth of sour orange trees. *Plant Physiology*, 99 :341-343.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) (2001): Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change: Climate Change 2001. The Scientific Basis. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 881.
- JACOB, J., GREITNER, C. & DRAKE, B.G. (1995): Acclimation of photosynthesis in relation to RubisCO and nonstructural carbohydrate contents and in situ carboxylase activity in *Scirpus olneyi* grown at elevated CO₂ in the field. *Plant, Cell and Environment*, 18: 875-884.
- KAMMANN, C.; GRÜNHAGE, L.; GRÜTERS, U.; JANZE, S. & JÄGER, H.-J. (2006): Response of aboveground grassland biomass and soil moisture to moderate long-term CO₂ enrichment. *Basic and Applied Ecology*, 6: 351-365.
- KARTSCHALL, T.; GROSSMAN, S.; PINTER, P.J.; GARCIA, R.L.; KIMBALL, B.A.; WALL, G.W.; HUNSAKER, D.J. & LAMORTE, R. L. (1995): A simulation of phenology, growth, carbon dioxide exchange and yields under ambient atmosphere and free-air carbon dioxide enrichment (FACE) Maricopa, Arizona, for wheat. *Journal of Biogeography* 22: 611-622.
- KAUDER, F.; LUDEWIG, F. & HEINEKE, D. (2000): Ontogenetic changes of potato plants during acclimation to elevated carbon dioxide. *Journal of Experimental Botany*, 5: 429-437.
- KAV, N.N.V.; SRIVASTAVA, S.; GOONEWARDENE, L. & BLADE, S.L. (2004): Proteome-level changes in the roots of *Pisum sativum* in response to salinity. *Annals of applied Biology*, 145: 217-230.
- KAWAMURA, Y & UEMARA, M. (2003): Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of *Arabidopsis* leaves associated with cold acclimation. *The Plant Journal*, 36: 141-154.
- KENDALL, A.C.; TURNER, J.C. & THOMAS, S.M. (1985): Effects of CO₂ enrichment at different irradiances on growth and yield of wheat. *Journal of Experimental Botany*, 36: 252-260.
- KIMBALL, B. A. (1983): Carbon dioxide and agricultural yield: An assemblage and analysis of 430 prior observations. *Agronomy Journal*, 75: 779-788.
- KIMBALL, B.A.; MORRIS, C.F.; PINTER, P.J.; WALL, G.W.; HUNSAKER, D.J.; ADAMSEN, F.J.; LAMORTE, R.L.; LEAVITT, S.W.; THOMPSON, T.L.; MATTHIAS, A.D. & BROOKS, T.J. (2001): Elevated CO₂, drought and soil nitrogen effects on wheat grain quality. *New Phytologist*, 150: 295-303.
- KNEPP, R.G.; HAMILTON, J.G.; MOHAN, J.E.; ZANGERL, A.R.; BERENBAUM, M.R. & DELUCIA, E.H. (2005): Elevated CO₂ reduces leaf damage by insect herbivores in a forest community. *New Phytologist*, 167: 207-218.
- KOCH, K. (2004): Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 235-246.

- KOMATSU, S.; ZANG, X. & TANAKA, N. (2006): Comparison of two proteomics techniques used to identify proteins regulated by gibberellin in rice. *Journal of Proteome Research*, 5: 270-276.
- KÖRNER, C.; DIEMER, M.; SCHÄPPI, B.; NIKLAUS, P. & ARNONE, J.A. (1997): The responses of alpine grassland to four seasons of CO₂ enrichment: a synthesis. *Acta Oecologia - Oecologia Plantarum*, 18: 165-175.
- KÖRNER, C. (2001): Die CO₂-Erhöhung der Atmosphäre aus ökologischer Sicht. In: Larcher, W.: *Ökophysiologie der Pflanzen*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 161-166.
- KÖRNER, C. (2003): Nutrients and sink activity drive plant CO₂ responses - caution with literature-based analysis. *New Phytologist*, 159: 537-538.
- LARCHER, W. (1994): *Ökophysiologie der Pflanzen*. Eugen Ulmer, Stuttgart.
- LAWLOR, D.W. & MITCHELL, R.A.C. (2000): Crop ecosystem responses to climate change: Wheat. In: Reddy, K.R. & Hodges, H.F.: *Climate Change and Global Crop Productivity*. CABI Publishing, Wallingford, UK, 57-80.
- LAEMMLI, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 358: 15-16
- LEADLEY, P.W.; NIKLAUS, P.A.; STOCKER, R. & KÖRNER, C. (1999): A field study of the effects of elevated CO₂ on plant biomass and community structure in a calcareous grassland. *Oecologia*, 118: 39-49.
- LEHMANN, R.; MELLE, C.; ESCHER, N. & VON EGGELING, F. (2005): Detection and identification of protein interactions of S100 proteins by ProteinChip technology. *Journal of Proteome Research*, 4: 1717-1721.
- LI, C.R.; LIANG, Y.H. & HEW, C.S. (2002): Responses of RubisCO and sucrose-metabolizing enzymes to different CO₂ in a tropical epiphytic orchid *Oncidium Goldiana*. *Plant Science*, 163: 313-320.
- LOHMAN, K.N.; GAN, S.; JOHN, M.S. & AMASINO, R.M. (1994): Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 92: 322-328.
- MARISSINK, M. & HANSSON, M. (2002): Floristic composition of a Swedish semi-natural grassland during six years of elevated atmospheric CO₂. *Journal of Vegetation Science*, 13: 733-742.
- MARLAND, G.; BODEN, T.A. & ANDRES, R.J. (2000): Global, regional, and national fossil fuel CO₂ emissions. In: *Trends: A Compendium of Data on Global Change*. Oak Ridge, Carbon dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Library, U.S. Department of Energy, <cdiac.esd.ornl.gov>
- MC ELRONE, A.J.; REID, C.D.; HOYE, K.A.; HART, E. & JACKSON, R.B. (2005): Elevated CO₂ reduces disease incidence and severity of a red maple fungal pathogen via changes in host physiology and leaf chemistry. *Global Change Biology*, 11: 1828-1836.
- MC KEE, I.F. & WOODWARD, F.I. (1994): CO₂ enrichment responses of wheat: interactions with temperature, nitrate and phosphate. *New Phytologist*, 127: 447-453.

- MC MASTER, G.S.; LECAIN, D.R.; MORGAN, J.A.; AIGUO, L. & HENDRIX, D.L. (1999): Elevated CO₂ increases wheat CER, leaf and tiller development, and shoot and root growth. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 183: 119-128.
- MELLE, C.; ERNST, G.; SCHIMMEL, B.; BLEUL, A.; KOSCIELNY, S.; WIESNER, A.; BOGUMIL, R.; MÖLLER, U.; HALBHUBER, K.J. & VON EGGELING, F. (2004): A technical triade for proteomic identification and characterization of cancer biomarkers. *Cancer Research*, 64: 4099-4104.
- MELLE, C.; ERNST, G.; SCHIMMEL, B.; BLEUL, A.; KAUFMANN, R.; HOMMANN, M.; RICHTER, K.K.; DAFFNER, W.; SETTMACHER, U.; CLAUSSEN, U. & VON EGGELING, F. (2005): Characterization of pepsinogen C as a potential biomarker for gastric cancer using a histo-proteomic approach. *Journal of Proteome Research*, 4: 1799-1804.
- MÉCHIN, V.; BALLIAU, T.; CHÂTEAU-JOUBERT, S.; DEVANTURE, M.; LANGELLA, O.; NÉGRONI, L.; PRIOUL, J.-L.; THÉVENOT, C.; ZIVY, M. & DAMERVAL, C. (2004): A two-dimensional map of maize endosperm. *Phytochemistry*, 65: 1609-1618.
- MIGLIETTA, F.; MAGLIULO, V.; BINDI, M.; CERIO, L.; VACCARI, F.P.; LODUCA, V. & PERESSOTTI, A. (1998): Free air CO₂ enrichment of potato (*Solanum tuberosum* L.): development, growth and yield. *Global Change Biology*, 4: 163-172.
- MILLER, A.; TSAI, C.H.; HEMPHILL, D.; ENDRES, M.; RODERMEL, S. & SPALDING, M. (1997): Elevated CO₂ effects during leaf ontogeny - A new perspective on acclimation. *Plant Physiology*, 115: 1195-1200.
- MITCHELL, C.E.; REICH, P.B.; TILMAN, D. & GROTH, J.V. (2003): Effects of elevated CO₂, nitrogen deposition, and decreased species diversity on foliar fungal plant disease. *Global Change Biology*, 9: 438-451.
- MITCHELL, R.A.C.; GIBBARD, C.L.; MITCHELL, V.J. & LAWLOR, D.W. (1996): Effects of shading in different developmental phases on biomass and grain yield of winter wheat at ambient and elevated CO₂. *Plant, Cell and Environment*, 19: 615-621.
- MIYAZAKI, S.; FREDRICKSEN, M.; HOLLIS, K.C.; POROYKO, V.; SHEPLEY, D.; GALBRAITH, D.W.; LONG, S.P. & BOHNERT, H.J. (2004): Transcript expression profiles of *Arabidopsis thaliana* grown under controlled conditions and open-air elevated concentrations of CO₂ and of O₃. *Field Crops Research*, 90: 47-59.
- MOORE, B.D.; CHENG, S.H.; SIMS, D. & SEEMANN, J.R. (1999): The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂. *Plant, Cell and Environment*, 22: 567-582.
- MOOT, D.J.; HENDERSON, A.L.; PORTER, J.R. & SEMENOV, M.A. (1996): Temperature, CO₂ and the growth and development of wheat: Changes in the mean and variability of growing conditions. *Climatic Change*, 33: 351-368.
- MORISON, J.I.L. (1998): Stomatal responses to increased CO₂ concentration. *Journal of Experimental Botany*, 26: 1317-1328.

- MULHOLLAND, B.J.; CRAIGON, J.; BLACK, C.R.; COLLS, J.J.; ATHERTON, J. & LANDON, G. (1998): Effects of elevated CO₂ and O₃ on the rate and duration of grain growth and harvest index in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Global Change Biology*, 4: 627-635.
- NGUYEN, H.T.; JOSHI, C.P.; KLUEVA, N.; WENG, J.; HENDERSHOT, K.L. & BLUM, A. (1994): The heat-shock response and expression of heat-shock proteins in wheat under diurnal heat stress and field conditions. *Australian Journal of Plant Physiology*, 21,:857-867.
- NIE, G.Y.; LONG, S.P.; GARCIA, R.L.; KIMBALL, B.A.; LAMORTE, R.L.; PINTER, P.J.; JUGE, N.JR; WALL, G.W. & WEBBER, A.N. (1995): Effects of free-air CO₂ enrichment on the development of the photosynthetic apparatus in wheat, as indicated by changes in leaf proteins. *Plant, Cell and Environment*, 18: 855-864.
- NIKLAUS, P.A.; KANDELER, E.; LEADLEY, P.W.; SCHMID, B.; TSCHERKO, D. & KÖRNER, C. (2001): A link between plant diversity, elevated CO₂ and soil nitrate. *Oecologia*, 127: 540-548.
- NOIRAUD, N.; DELROT, S. & LEMOINE, R. (2000): The sucrose transporter of celery: identification and expression during salt stress. *Plant Physiology*, 122: 1447-1455.
- NOODÉN, L.D. (1988): Whole plant senescence. In: Noodén, L.D. & Leopold, A.C.: *Senescence and aging in plants*. Academic Press, San Diego, 391-439.
- NOWAK, R.S.; ELLSWORTH, D.S. & SMITH, S.D. (2004): Functional responses of plants to elevated atmospheric CO₂ - do photosynthetic and productivity data from FACE experiments support early predictions? *New Phytologist*, 162: 253-280.
- PAL, M.; RAO, L.S.; JAIN, V.; SRIVASTAVA, A.C.; PANDEY, R.; RAJ, R. & SINGH, K.P. (2005): Effects of elevated CO₂ and nitrogen on wheat growth and photosynthesis. *Biologia Plantarum*, 49: 467-470.
- PARROTT, D.; YANG, L.; SHAMA, L. & FISCHER, A.M. (2005): Senescence is accelerated, and several proteases are induced by carbon "feast" conditions in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Planta*, 222: 989-1000.
- PATRICK, J.W. & OFFLER, C.E. (1995): Post-sieve element transport of sucrose in developing seeds. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22 :681-702.
- PAUL, N.D. & PELLNY, T.K. (2003): Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *Journal of Experimental Botany*, 54: 539-547.
- PETTERSON, R.; MC DONALD, J.S. & STADENBERG, I. (1993): Response of small birch plants (*Betula pendula* Roth.) to elevated CO₂ and nitrogen supply. *Plant, Cell & Environment*, 16: 1115-1121.
- PINHEIRO, C.; KEHR, J. & RICARDO, C.P. (2005): Effect of water stress on lupin stem protein analysed by two-dimensional gel electrophoresis. *Planta*, 221: 716-728.
- PINTER, P.J.; KIMBALL, B.A.; WALL, G.W.; LAMORTE, R.L.; HUNSAKER, D.J.; ADAMSEN, F.J.; FRUMAU, K.F.A.; VUGTS, H.F.; HENDREY, G.R.; LEWIN, K.F.; NAGY, J.; JOHNSON, H.B.; WECHSUNGE, F.; LEAVITT, S.W.; THOMPSON, T.L.; MATTHIAS, A.D. & BROOKS, T.J. (2000): Free-air CO₂ enrichment (FACE): blower effects on wheat canopy microclimate and plant development. *Agricultural and Forest Meteorology*, 103: 319-333.

- POLLE, A.; PFIRRMANN, T.; CHAKRABARTI, S. & RENNENBERG, H. (1993): The effects of enhanced ozone and enhanced carbon dioxide concentrations on biomass, pigments and antioxidative enzymes in spruce needles (*Picea abies* L.). *Plant, Cell and Environment*, 16: 311-316.
- POORTER, H., (1993): Interspecific variation in the growth response of plants to an elevated ambient CO₂ concentration. In: Rozema, J.; Lambers, H.; Van de Geijn, S.C. & Cambridge, M.L.: CO₂ and biosphere. Kluwer Academic, Dordrecht, 77-97.
- POORTER, H.; ROUMET, C. & CAMPBELL, B.D. (1996): Interspecific variation in the growth response of plants to elevated CO₂: A search for functional types. In: Körner, C. & Bazzaz, F.A.: Carbon Dioxide, Populations, and Communities. Academic Press, San Diego, 375-412.
- POORTER, H.; VAN BERKEL, Y.; BAXTER, R.; DEN HERTOOG, J.; DIJKSTRA, P.; GIFFORD, R. M.; GRIFFIN, K.L.; ROUMET, C.; ROY, J. & WONG, S.C. (1997): The effect of elevated CO₂ on the chemical composition and construction costs of leaves of 27 C₃ species. *Plant, Cell and Environment*, 20: 472-482.
- PORTER, D.R. & WEBSTER, J.A. (2000): Russian wheat aphid-induced protein alterations in spring wheat. *Euphytica*, 111: 199-203.
- PRITCHARD, S.G.; JU, Z.; VAN SANTEN, E.; QIU, J.; WEAVER, D.B.; PRIOR, S.A. & ROGERS, H.H. (2000): The influence of elevated CO₂ on the activities of antioxidative enzymes in two soybean genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27: 1061-1068.
- PRITCHARD, S.G. & AMTHOR, J.S. (2005): Crops and environmental change. An introduction to effects of global warming, increasing atmospheric CO₂ and O₃ concentrations, and soil salinization on crop physiology and yield. Food Products Press, New York / London / Oxford.
- REEKIE, E.G. (1996): The effect of elevated CO₂ on developmental processes and its implications for plant-plant interactions. In: Körner, C. & Bazzaz, F.A.: Carbon Dioxide, Populations, and Communities. Academic Press, San Diego, pp. 333-346.
- REHM, H., (2002): Der Experimentator: Proteinbiochemie / Proteomics. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- REICH, P.B.; KNOPS, J.; TILMAN, D.; CRAINE, J.; ELLSWORTH, D.; TJOELKER, M.; LEE, T.; WEDIN, D.; NAEEM, S.; BAHAUDDIN, D.; HENDREY, G.; JOSE, S.; WRAGE, K.; GOTH, J. & BENGSTON, W. (2001): Plant diversity enhances ecosystem responses to elevated CO₂ and nitrogen deposition. *Nature*, 410: 809-812.
- RENAUT, J.; LUTTS, S.; HOFFMANN, L. & HAUSMANN, J.-F. (2004): Responses of poplar to chilling temperatures: Proteomic and physiological aspects. *Plant Biology*, 6: 81-90.
- RICHARDS, J.F.; OLSON, J.S. & ROTT, R.M. (1983): Development of a Data Base for Carbon Dioxide Releases Resulting from Conversion of Land to Agricultural Uses. In: Trends: A Compendium of Data on Global Change. Oak Ridge, Carbon dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Library, U.S. Department of Energy, <cdiac.esd.ornl.gov>

- ROBERTSON, E.J. & LEECH, R.M. (1995): Significant changes in cell and chloroplast development in young wheat leaves (*Triticum aestivum* cv. Hereward) grown in elevated CO₂. *Plant Physiology*, 107: 63-71.
- ROGERS, A. AND ELLSWORTH, D.S. (2002): Photosynthetic acclimation of *Pinus taeda* (loblolly pine) to long-term growth in elevated pCO₂ (FACE). *Plant, Cell and Environment*, 25: 851-858.
- ROGERS, G.S.; PAYNE, L.; MILHAM, P. & CONROY, J. (1993): Nitrogen and phosphorus requirements of cotton and wheat under changing atmospheric CO₂ concentrations. *Plant Soil*, 155/156: 231-234.
- ROGERS, G.S.; MILHAM, P.J.; GILLINGS, M. & CONROY, J.P. (1996): Sink strength may be the key to growth and nitrogen responses in N-deficient wheat at elevated CO₂. *Australian Journal of Plant Physiology*, 23: 253-264.
- ROGERS, G.S.; GRAS, P.W.; BATEY, I.L.; MILHAM, P.J.; PAYNE, L. & CONROY, J.P. (1998): The influence of atmospheric CO₂ concentration on the protein, starch and mixing properties of wheat flour. *Australian Journal of Plant Physiology*, 25: 387-393.
- ROGERS, H.H. & DAHLMAN, R.C. (1993): Crop responses to CO₂ enrichment. In: Rozema, J.; Lambers, H.; Van de Geijn, S.C. & Cambridge, M.L.: CO₂ and biosphere. Kluwer Academic, Dordrecht, 117-131.
- ROITSCH, T. (1999): Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 198-206.
- SAGE, R.F.; SHARKEY, T.D. & SEEMANN, J.R. (1989): Acclimation of photosynthesis to elevated CO₂ in five C₃ species. *Plant Physiology*, 89: 590-596.
- SAGE, R.F. (2002) How terrestrial organisms sense, signal, and respond to carbon dioxide. *Integrative and Comparative Biology*, 42: 469-480.
- SALEKDEH, GH.H.; SIOPONGCO, J.; WADE, L.J.; GHAREYAZIE, B. & BENNETT, J. (2002): Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics*, 2: 1131-1145.
- SCHÜTZ, M. (2002): Untersuchungen zum Wachstum und Gaswechsel von Weizenbeständen unter globalen Klimaveränderungen unter besonderer Berücksichtigung von Veränderungen der atmosphärischen CO₂-Konzentrationen und des Bodenwasserhaushalts. Dissertation, Institut für Pflanzenökologie, Justus-Liebig-Universität Giessen.
- SCHWANZ, P. & POLLE, A. (1998): Antioxidative systems, pigment and protein contents in leaves of adult Mediterranean oak species (*Quercus pubescens* and *Q. ilex*) with lifetime exposure to elevated CO₂. *New Phytologist*, 140: 411-423.
- SICHER, R.C.; KREMER, D.F. & RODERMEL, S.R. (1994): Photosynthetic acclimation to elevated CO₂ occurs in transformed tobacco with decreased ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content. *Plant Physiology* 104, 409-415. 1994.
- SICHER, R.C. & BUNCE, J.A. (1997): Relationship of photosynthetic acclimation to changes of RubisCO activity in field-grown winter wheat and barley during growth in elevated carbon dioxide. *Photosynthesis Research*, 52: 27-38.

- SICHER, R.C. & BUNCE, J.A. (1998): Evidence that premature senescence affects photosynthetic decline of wheat flag leaves during growth in elevated carbon dioxide. *International Journal of Plant Science*, 159: 798-804.
- SIEGENTHALER, U.; STOCKER, T.F.; MONNIN, E.; LÜTHI, D.; SCHWANDER, J.; STAUFFER, B.; RAYNAUD, D.; BARNOLA, J.-M.; FISCHER, H.; MASSON-DELMOTTE, V. & JOUZEL, J. (2005): Stable Carbon Cycle-Climate Relationship During the Late Pleistocene, *Science*, 310: 1313-1317.
- SIMPSON, R.J.; LAMBERS, H. & DALLING, M.J. (1983): Nitrogen distribution during grain growth in wheat (*Triticum aestivum* L.) IV. Development of a quantitative model of the translocation of nitrogen to the grain. *Plant Physiology*, 71: 7-14.
- SIONIT, N.; HELLMERS, H. & STRAIN, B.R. (1980): Growth and yield of wheat under CO₂ enrichment and water stress. *Crop Science*, 67: 687-690.
- SLAFER, G.A. & RAWSON, H.M. (1997): CO₂ effects on phasic development, leaf number and rate of leaf appearance in wheat. *Annals of Botany*, 79: 75-81.
- STITT, M. (1991). Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant, Cell and Environment*, 22: 741-762 .
- STITT, M. & KRAPP, A. (1999): The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant, Cell and Environment*, 22: 583-621.
- SURANO, K.; DALEY, P.; HOUPIS, J.; SHINN, J.; HELMS, J.; PALLASOU, R. & COSTELLA, M. (1986): Growth and physiological responses of *Pinus ponderosa* to long-term elevated CO₂ enrichment. *Tree Physiology*, 2: 243-259.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. (2000): *Physiologie der Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- TESKEY, R.O. (1995): A field study of the effects of elevated CO₂ on carbon assimilation, stomatal conductance and leaf and branch growth of *Pinus taeda* trees. *Plant, Cell and Environment*, 18: 565-573.
- THIELLEMENT, H.; BAHRMAN, N.; DAMERVAL, C.; PLOMION, C.; ROSSIGNOL, M.; SANTONI, V.; DE VIENNE, D. & ZIVY, M. (1999): Proteomics for genetic and physiological studies in plants. *Electrophoresis*, 20: 2013-2026.
- THOMPSON, G.B., BROWN, J.K., & WOODWARD, F.I., (1993): The effects of host carbon dioxide, nitrogen and water supply on the infection of wheat by powdery mildew and aphids. *Plant, Cell & Environment*, 16: 687-694.
- THOMPSON, G.B. & WOODWARD, F.I. (1994): Some influences of CO₂ enrichment, nitrogen nutrition and competition on grain yield and quality in spring wheat and barley. *Journal of Experimental Botany*, 45: 937-942.
- TOTTMAN, D.R. & BROAD, H. (1987): The decimal code for the growth stages of cereals, with illustrations. *Annals of Applied Botany*, 110: 441-454.

- TRUERNIT, E. (2001): Plant physiology: The importance of sucrose transporters. *Current Biology*, 11: R169-R171.
- UBA (2005): Die Zukunft in unseren Händen - 21 Thesen zur Klimaschutzpolitik des 21. Jahrhunderts. Umweltbundesamt.
- VAN OOSTEN, J.-J. & BESFORD, R.T. (1994): Sugar feeding mimics effect of acclimation to high CO₂-rapid down regulation of RubisCO small subunit transcripts but not of large subunit transcripts. *Journal of Plant Physiology*, 143: 306-312.
- VON CAEMMERER, S.; GHANNOUM, O.; CONROY, J.P.; CLARK, H. & NEWTON, P.C.D. (2001): Photosynthetic responses of temperate species to free air CO₂ enrichment (FACE) in a grazed New Zealand pasture. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28: 439-450.
- VON EGGELING, F.; JUNKER, K.; FIEDLER, W.; WOLLSCHIED, V.; DÜRST, M.; CLAUSSEN, U. & ERNST, G. (2001): Mass spectrometry meets chip technology: A new proteomic tool in cancer research? *Electrophoresis*, 22: 2898-2902.
- VORDERWÜHLBECKE, S.; CLEVERLEY, S.; WEINBERGER, S.R. & WIESNER, A. (2005): Protein quantification by the SELDI-TOF-MS-based ProteinChip[®] System. *Nature Methods*, 2: 393-395.
- VU, C.V.; ALLEN, L.H. & BOWES, G. (1983): Effects of light and elevated atmospheric CO₂ in the ribulose biphosphate carboxylase activity and ribulose biphosphate level of soybean leaves. *Plant Physiology*, 73: 729-734
- WATSON, B.S.; LEI, Z.; DIXON, R.A. & SUMNER, L.W. (2004): Proteomics of *Medicago sativa* cell walls. *Phytochemistry*, 65: 1709-1720.
- WEBBER, A.N.; NIE, G.Y. & LONG, S.P. (1994): Acclimation of photosynthetic proteins to rising atmospheric CO₂. *Photosynthesis Research*, 39: 413-425.
- WEBER, H.; BORISJUK, L. & WOBUS, U. (1997): Sugar import and metabolism during seed development. *Trends in Plant Science*, 2: 169-174.
- WEBSTER, P.J.; HOLLAND, G.J.; CURRY, J.A. & CHANG, H.-R. (2005): Changes in Tropical Cyclone Number, Duration, and Intensity in a Warming Environment. *Science*, 309: 1844-1846.
- WHITTAKER, J.B. & TRIBE, N.P. (2001): Insects and plants in a changing atmosphere. *Ecology* 89, 507-518.
- WIESNER, A. (2004): Detection of Tumor Markers with ProteinChip[®] Technology. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 5: 45-67.
- WILLIAMS, L.E.; LEMOINE, R. & SAUER, N. (2000): Sugar transporters in higher plants - a diversity of roles and complex regulation. *Trends in Plant Science*, 5: 283-290.
- WILSON, A.T. (1978): Pioneer agriculture explosion and CO₂ levels in the atmosphere. *Science*, 273: 40-41.
- WITZE, A. (2006): Bad weather ahead. *Nature*, 441: 564-566.

- WOODROW, I.E. (1994): Optimal acclimation of the C₃ photosynthesis system under enhanced CO₂. *Photosynthesis Research*, 39: 401-412.
- WOODWARD, F.I. & KELLY, C.K. (1995): The influence of CO₂ concentration on stomatal density. *New Phytologist*, 131: 311-327.
- WU, D.-X.; WANG, G.-X.; BAI, Y.-F. & LIAO, J.-X. (2004): Effects of elevated CO₂ concentration on growth, water use, yield and grain quality of wheat under two soil water levels. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 104: 493-507.
- XIE, Z.; ZHU, J.; ZHANG, Y.; MA, H.; LIU, G.; HAN, Y.; ZENG, Q. & CAI, Z. (2002): Responses of rice (*Oryza sativa*) growth and its C, N and P composition to FACE (free-air carbon dioxide enrichment) and N, P fertilization. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*, 13: 1223-1230.
- ZIMMERMANN, P. & ZENTGRAF, U. (2004): Der Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und Blattseneszenz während der Entwicklung von Pflanzen. *Gesunde Pflanzen*, 56: 208-217.

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1: Emission und atmosphärische Konzentration von CO ₂ 1990-2100.....	2
Abb. 2.1: Versuchsgelände.....	12
Abb. 2.2: Plot mit CO ₂ -Begasung.....	15
Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Begasung.....	15
Abb. 2.4: Schema der Versuchsfläche.....	16
Abb. 2.5: Räumliche Unterteilung der Plotfläche.....	18
Abb. 2.6: Unterteilung der Hauptähre in vier Fraktionen.....	21
Abb. 2.7: Markierung einer Weizenpflanze.....	22
Abb. 2.8: SELDI TOF-MS ProteinChip System.....	23
Abb. 2.9: Bindeoberflächen für <i>ProteinChip Arrays</i>	24
Abb. 2.10: Prinzip der SELDI TOF-MS.....	25
Abb. 2.11: Nettoladung von Proteinen in Abhängigkeit des pH Wertes des Bindepuffers.....	26
Abb. 2.12 : Ablauf der Identifizierung eines Proteins.....	28
Abb. 2.13: Metallrahmen zur Schätzung der Deckungsgrade.....	36
Abb. 3.1: Ausschnitt eines Proteinspektrums von Sommerweizen.....	39
Abb. 3.2: Summe der detektierten Signale über den gesamten Untersuchungszeitraum in Fahnenblatt, Blatt 7 Blatt 6 und Körnern von Sommerweizen.....	40
Abb. 3.3: Schema der Ergebnisse.....	41
Abb. 3.4: Zeitlicher Verlauf von Peak 1 (10531 Da) im Fahnenblatt des Sommerweizens.....	48
Abb. 3.5: Zeitlicher Verlauf von Peak 2 (10650 Da) im Fahnenblatt des Sommerweizens.....	49
Abb. 3.6 : 2D-Gelelektrophorese der Fahnenblätter (FB).....	56
Abb. 3.7: Eindimensionale Gradienten-Gelelektrophorese des Fahnenblatts (FB).....	56
Abb. 3.8: Eindimensionale Gradienten-Gelelektrophorese der Körner.....	57
Abb. 3.9: Verdauspektrum der Probe A und des Nullwertes.....	58
Abb. 3.10: Lösliches Protein in den Fahnenblättern und Blatt 7 von Sommerweizen.....	63
Abb. 3.11: C-, N-Konzentration und C/N-Verhältnis in den Fahnenblättern und Blatt 7 von Sommerweizen.....	67
Abb. 3.12: C-, N-Konzentration und C/N-Verhältnis in den Körnern von Sommerweizen.....	69
Abb. 3.13: SPAD-Werte in Fahnenblättern und Blatt 7 von Sommerweizen.....	72
Abb. 3.14: Biomasse des Haupttriebs (HT): Fahnenblatt, Blatt 7, Blatt 6, Ähre von Sommerweizen.....	74
Abb. 3.15: Biomasse der Blätter, Ähren und der Gesamtpflanze von Sommerweizen.....	76
Abb. 3.16: Lösliches Protein in Blättern von Ackersenf.....	80
Abb. 3.17: SPAD-Werte der Blätter 7, 5 und 3 von Ackersenf.....	82

Abb. 3.18: Gesamtdeckung des Weizen-Wildkraut-Bestandes im Jahr 2003.....	87
Abb. 3.19: Gesamtdeckung des Weizen-Wildkraut-Bestandes im Jahr 2004.....	88
Abb. 10.1: Tagesmittelwerte (A) und Tagesverlauf (B) der Kohlendioxid- Konzentration 2003.....	140
Abb. 10.2: Tagesmittelwerte (A) und Tagesverlauf (B) der Kohlendioxid- Konzentration 2004.....	141
Abb. 10.3: Tägliche Strahlungssummen, Tagesmittelwerte der Lufttemperatur, relativen Luftfeuchte, relativen Bodenfeuchte und der Bodentemperatur 2003.....	142
Abb. 10.4: Täglichen Strahlungssummen, Tagesmittelwerte der Lufttemperatur, relativen Luftfeuchte, relativen Bodenfeuchte und der Bodentemperatur 2004.....	143

9 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2.1: Ausgesäte Arten und Pflanzendichten im Jahr 2003.....	13
Tab. 2.2: Ausgesäte Arten und Pflanzendichten im Jahr 2004.....	14
Tab. 2.3: Übersicht der untersuchten Parameter während des Untersuchungszeitraums.....	18
Tab. 2.4: Übersicht der Untersuchungen und Termine im Jahr 2004.....	19
Tab. 2.5: Übersicht der Zwischenernten von <i>Sinapis arvensis</i> und <i>Triticum aestivum</i> im Jahr 2004.....	20
Tab. 2.6: Beprobte Pflanzenteile von <i>Triticum aestivum</i> im Jahr 2004 und gemessene Parameter.....	21
Tab. 2.7: Aufnahmeschlüssel nach DIERSCHKE.....	35
Tab. 3.1: Proteinmuster der Fahnenblätter von Sommerweizen.....	43
Tab. 3.2: Proteinmuster in Fahnenblättern (FB) während der Blüte.....	44
Tab. 3.3: Proteinmuster in Fahnenblättern (FB) während der Fruchtentwicklung.....	45
Tab. 3.4: Proteinmuster in Fahnenblättern (FB) zum Zeitpunkt der Milchreife.....	46
Tab. 3.5: Proteinmuster in Fahnenblättern (FB) während der späten Milchreife.....	46
Tab. 3.6: Übersicht der signifikanten Effekte von sieben Signalen in Fahnenblättern an den fünf Untersuchungsterminen.....	50
Tab. 3.7: Proteinmuster in Blatt 7 (B7) zum Zeitpunkt der Blüte.....	51
Tab. 3.8: Proteinmuster in Blatt 7 (B7) während der Fruchtbildung.....	52
Tab. 3.9: Proteinmuster in Weizenkörnern (Kö) zum Zeitpunkt der Milchreife.....	53
Tab. 3.10: Proteinmuster in Weizenkörnern (Kö) zum Zeitpunkt der späten Milchreife.....	54
Tab. 3.11: Identifizierung einiger Proteine in Fahnenblättern (FB) und Körnern (Kö) von Sommerweizen.....	59
Tab. 3.12: Resultate des General Regression Models (GRM), Konzentration von löslichen Proteinen in Blättern von Sommerweizen.....	62
Tab. 3.13: Resultate des General Regression Models (GRM), N-Konzentration und C/N-Verhältnis in Fahnenblättern (FB) von Sommerweizen.....	65
Tab. 3.14: Resultate des General Regression Models (GRM), N-Konzentration und C/N-Verhältnis in Blatt 7 (B7) von Sommerweizen.....	66
Tab. 3.15: Resultate des General Regression Models (GRM), N-Konzentration und C/N-Verhältnis in Körnern (Kö) von Sommerweizen.....	69
Tab. 3.16: Resultate des General Regression Models (GRM) SPAD-Wert in Fahnenblättern (FB) und Blatt 7 (B7) von Sommerweizen.....	70
Tab. 3.17: Resultate des General Regression Models (GRM), SPAD-Wert in Blatt 5 (B5) und Blatt 3 (B3) von Sommerweizen.....	71

Tab. 3.18: Resultate des General Regression Models (GRM), Biomasse einer Sommerweizenpflanze.....	73
Tab. 3.19: Resultate des General Regression Models (GRM), Biomasse der Fraktionen.....	77
Tab. 3.20: Signifikant unterschiedlich exprimierte Signale in Blättern von Ackersenf.....	79
Tab. 3.21: Resultate des General Regression Models (GRM) des Konzentration an löslichen Proteinen in Blättern von Ackersenf.....	80
Tab. 3.22: Resultate des General Regression Models (GRM) des SPAD-Wertes in Blatt 7, Blatt 5 und Blatt 3 von Ackersenf.....	81
Tab. 3.23: wichtige Entwicklungsstadien des Sommerweizens während der Untersuchungsperiode 2004.....	85
Tab. 3.24: Deckung der einzelnen Pflanzenarten am ersten Untersuchungstermin (54 TNA) 2004.....	88
Tab. 10.1: Zusammenfassung der pflanzenbaulichen Maßnahmen für das Untersuchungsjahr 2003.....	139
Tab. 10.2: Zusammenfassung der pflanzenbaulichen Maßnahmen für das Untersuchungsjahr 2004.....	139
Tab. 10.3-10.27: Resultate der multiplen Vergleichstests (N unequal HSD Test).....	144-154

10 ANHANG

10.1 MATERIALIEN FÜR DIE LABORVERSUCHE

Geräte

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

- Ready Gel System, Bio Rad
- Power Supply 1000/500, BioRad
- PAGER[®]Duramide[®]Precast Gels, 10-20% Tris – Glycine gels, Cambrex

2D Gelelektrophorese

- Wasserbad Haake D8, Fisons
- Polyacrylamid-Gelelektrophoresekammer Protean II xi Cell, Bio Rad
- Kühler Multi Temp III, Amersham Bioscience
- Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL, Amersham Bioscience
- 2D Apparatur Multiphor II, Amersham Bioscience
- Filterpapier Elektrodenstrip, Amersham Bioscience
- Drystrip Aligner, Amersham Bioscience
- Drystrip Kit Elektroden, Amersham Bioscience
- Tray und Elektroden, Amersham Bioscience
- Immobiline Dry Strip pI 3-11, Amersham Biosciences
- NuPage[™] 4-12% Bis-Tris ZOOM[™], Invitrogen

Trypsin-Verdau

- Protein Chip[®] Peptide Mapping Kit, CIPHERGEN

SELDI TOF MS Technologie

- ProteinChip System 4000 Series (PCS 4000 TOF – MS Personal), CIPHERGEN
- SAX Chip, CIPHERGEN
- WCX Chip, CIPHERGEN

Proteinkonzentrationsbestimmung

- WPA biowave S 2100 Diode Array Spectrophotometer, Biochrom
- Halbmikroküvetten

sonstige Geräte/Verbrauchsmaterialien

- MS1 Minishaker, IKA
- REAX top, Heidolph
- Tubes, verschiedene Ausführungen, Sarstedt bzw. Eppendorf
- Spitzen, ungestopft, bis 10 µl, bis 200 µl bis 1000 µl, Gilson
- Falconröhrchen 15 ml, 50 ml, Greiner Bio One
- Biofuge Stratos Heraeus
- Waage BP 61, Sartorius

Chemikalien

Herstellung des Zelllysats

- CHAPS, Roche
- Tris Pufferan, Roth

- EDTA, Disodiumsalz – Dihydrat, Sigma
- 2-β-Mercaptoethanol, Merck
- Triton X-100, Ferak
- Magnesiumchlorid, 0,1 M, Sigma
- Leupetin, Serva
- PMSF, Roth

Bradford Proteinkonzentrationsbestimmung

- Bradford Färbelösung, Bio Rad

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

- Acrylamid-Bis-Lösung, Serva
- APS, Gibco
- Isopropanol, Roth
- SDS, Roth

2D-Gelelektrophorese

- Bromphenolblau, Sigma
- DTT, Invitrogen
- Dry Strip Cover Fluid, plusone
- Glycerol, Merck
- IPG Puffer, Amersham
- Kerosin, Aldrich
- Urea, Bio Rad

Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung

- Bromphenolblau, Sigma
- Coomassie Brilliant Blue G 250, Serva

Trypsin-Verdau

- Acetonitril, Aldrich
- Ammoniumbicarbonat, Sigma
- Essigsäure, Roth
- Methanol, Roth
- Trypsin, Roche

SELDI-TOF MS

- Sinapinsäure (SPA), CIPHERGEN
- Zimtsäure (CHCA), CIPHERGEN
- All – In – One peptide Standard, CIPHERGEN
- ACN, Aldrich
- Aldrich Trifluoressigsäure, Aldrich

Fraktionierung

- PLRP-S beads (15-20µm, 300A), Polymer Laboratories

Protein-Molekularmassenmarker

- BenchMark Prestained Protein Ladder, Invitrogen
- Mark12 Unstained Standard, Invitrogen

10.2 PFLANZENBAULICHE MAßNAHMEN CO₂-BEGASUNG UND KLIMAPARAMETER

Tab. 10.1: Zusammenfassung der pflanzenbaulichen Maßnahmen für das Untersuchungsjahr 2003

Datum	Pflanzenbauliche Maßnahmen 2003
01.-03.05.2003	Bodenbearbeitung der Flächen
04.05.03	Mechanische Saatbettbereinigung
05.05.03	Aussaat und Bewässerung
06.05.03	Bewässerung
07.05.03	Bewässerung
16.05.03	Bewässerung
21.05.03	NPK-Düngung (50%)
02.06.03	Entfernen von Fremdarten
03.06.04	Bewässerung
10.06.03	Bewässerung
16.06.03	Bewässerung
19.06.03	Bewässerung
21.06.03	Bewässerung
23.06.03	Bewässerung
25.06.03	Bewässerung
26.06.03	Bewässerung
28.06.03	Bewässerung
30.06.03	Bewässerung
10.07.03	Bewässerung
13.07.03	Bewässerung

Tab. 10.2: Zusammenfassung der pflanzenbaulichen Maßnahmen für das Untersuchungsjahr 2004

Datum	Pflanzenbauliche Maßnahmen 2004
23.-28.3.2004	Bodenbearbeitung
29.03.2004	Mechanische Saatbettbereinigung
30.03.2004	Aussaat und Bewässerung (30 l pro Plot)
04.04.2004	Bewässerung (10 l pro Plot)
14.04.2004	Bewässerung (15 l pro Plot)
16.04.2004	Bewässerung (10 l pro Plot)
20.04.2004	Bewässerung (20 l pro Plot)
22.04.2004	Bewässerung (15 l pro Plot)
24.04.2004	Bewässerung (15 l pro Plot), NPK-Düngung (50%)
27.04.2004	Bewässerung (15 l/Plot)
29.04.2004	Bewässerung (15 l/Plot)
18.05.2004	Vogelschutznetze wurden entfernt
27.05.2004	Bewässerung (15 l pro Plot), NPK-Düngung (25%)
15.06.2004	Bewässerung (15 l pro Plot), NPK-Düngung (25%)

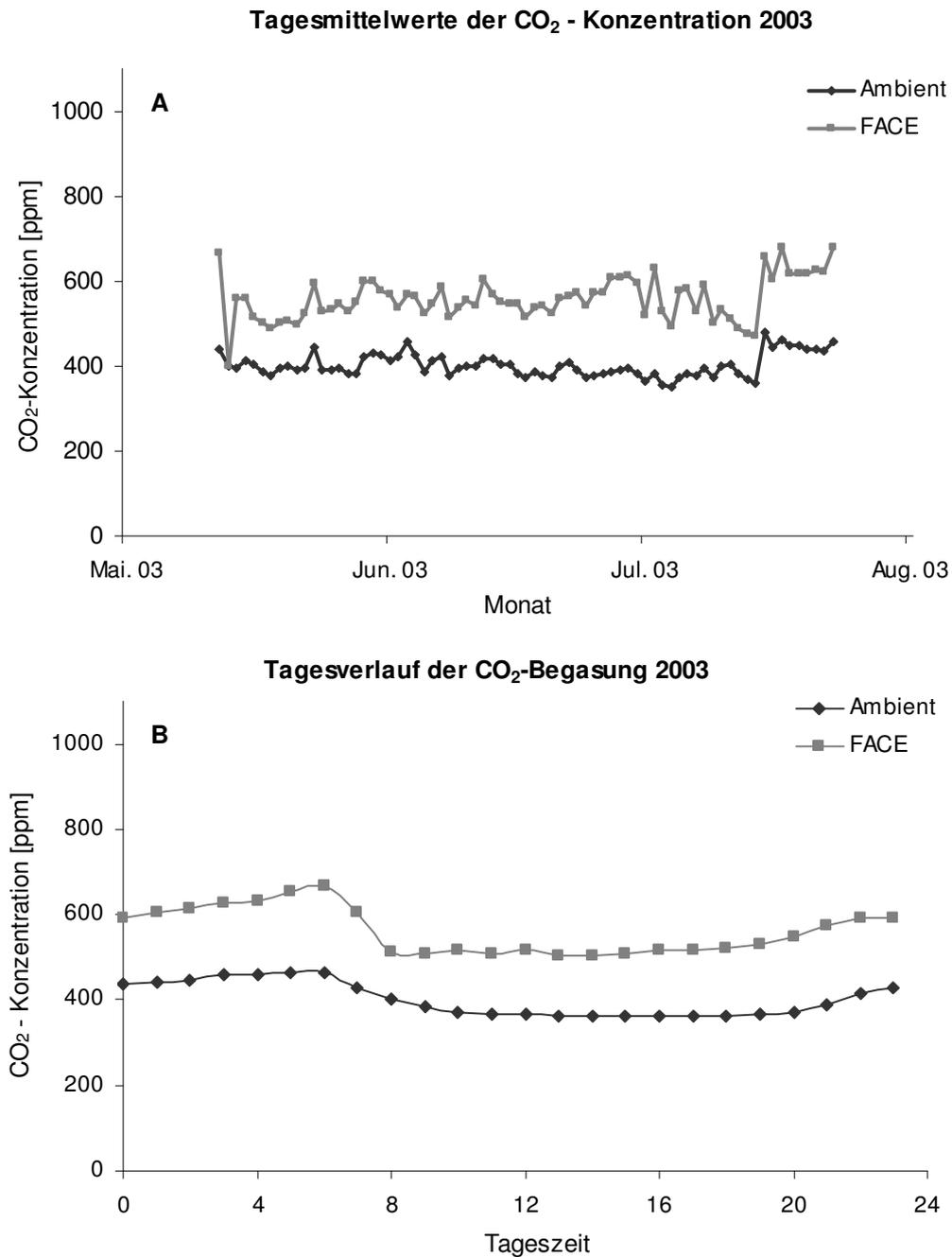
10.3 CO₂-BEGASUNG 2003 UND 2004

Abb. 10.1: Tagesmittelwerte (A) und Tagesverlauf (B) der Kohlendioxid-Konzentration auf den *Ambient*- und *FACE*-Plots im Untersuchungsjahr 2003. Dargestellt sind die Mittelwerte der fünf parallelen Flächen.

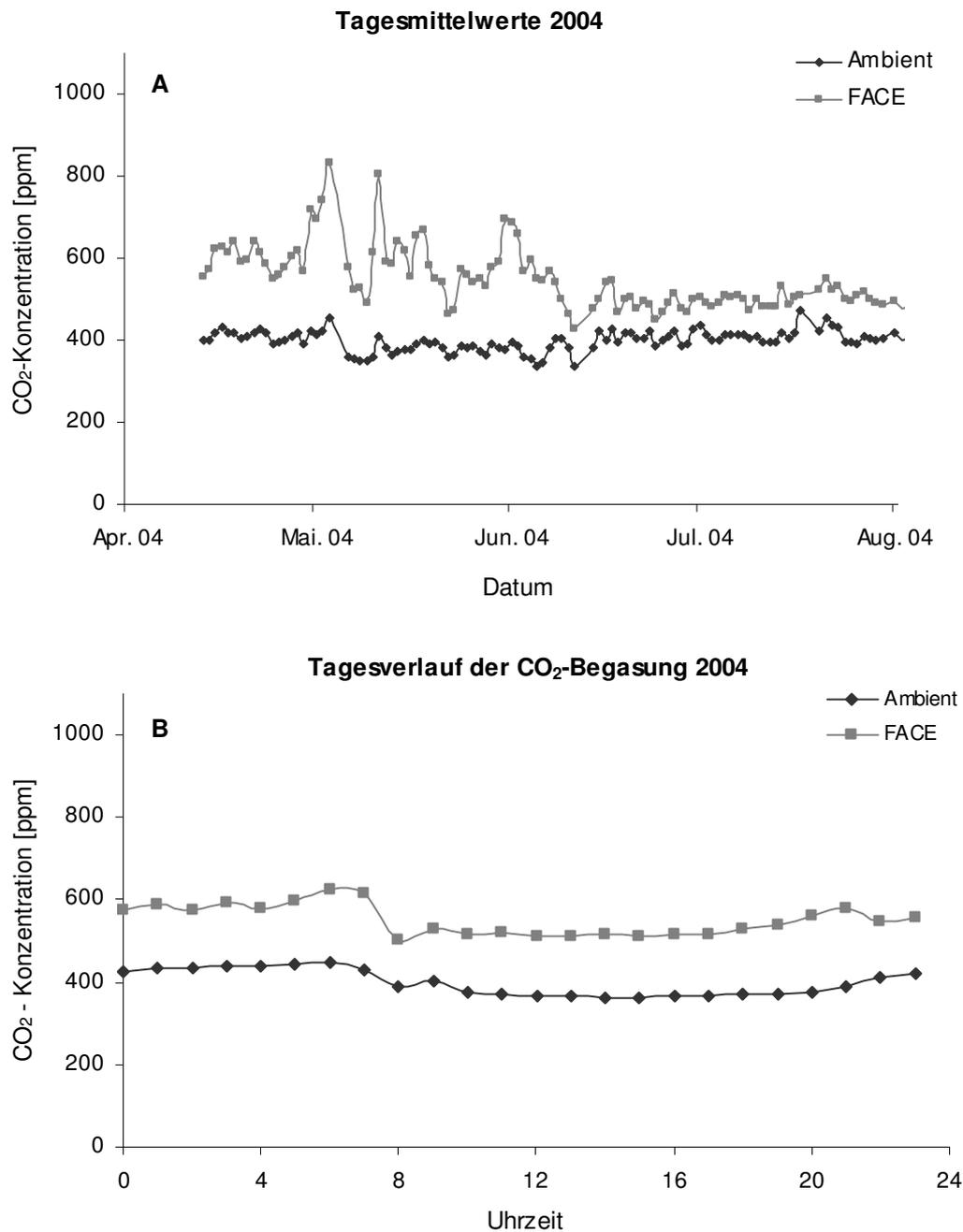


Abb. 10.2: Tagesmittelwerte (A) und Tagesverlauf (B) der Kohlendioxid-Konzentration auf den *Ambient*- und *FACE*-Plots im Untersuchungsjahr 2004. Dargestellt sind die Mittelwerte der fünf parallelen Flächen.

10.4 KLIMATISCHE PARAMETER IN DEN BEIDEN VERSUCHSJAHREN 2003 UND 2004

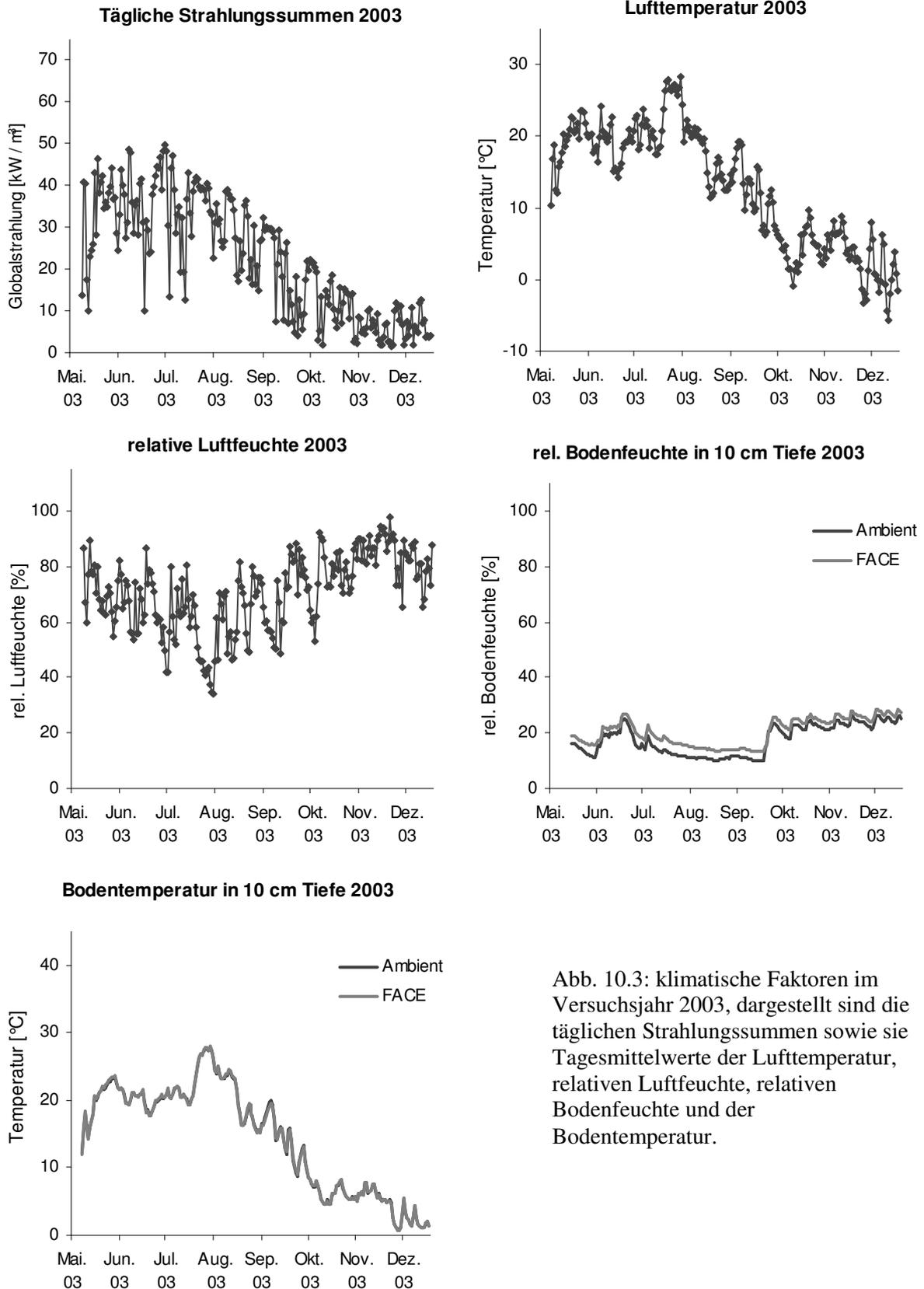


Abb. 10.3: klimatische Faktoren im Versuchsjahr 2003, dargestellt sind die täglichen Strahlungssummen sowie sie Tagesmittelwerte der Lufttemperatur, relativen Luftfeuchte, relativen Bodenfeuchte und der Bodentemperatur.

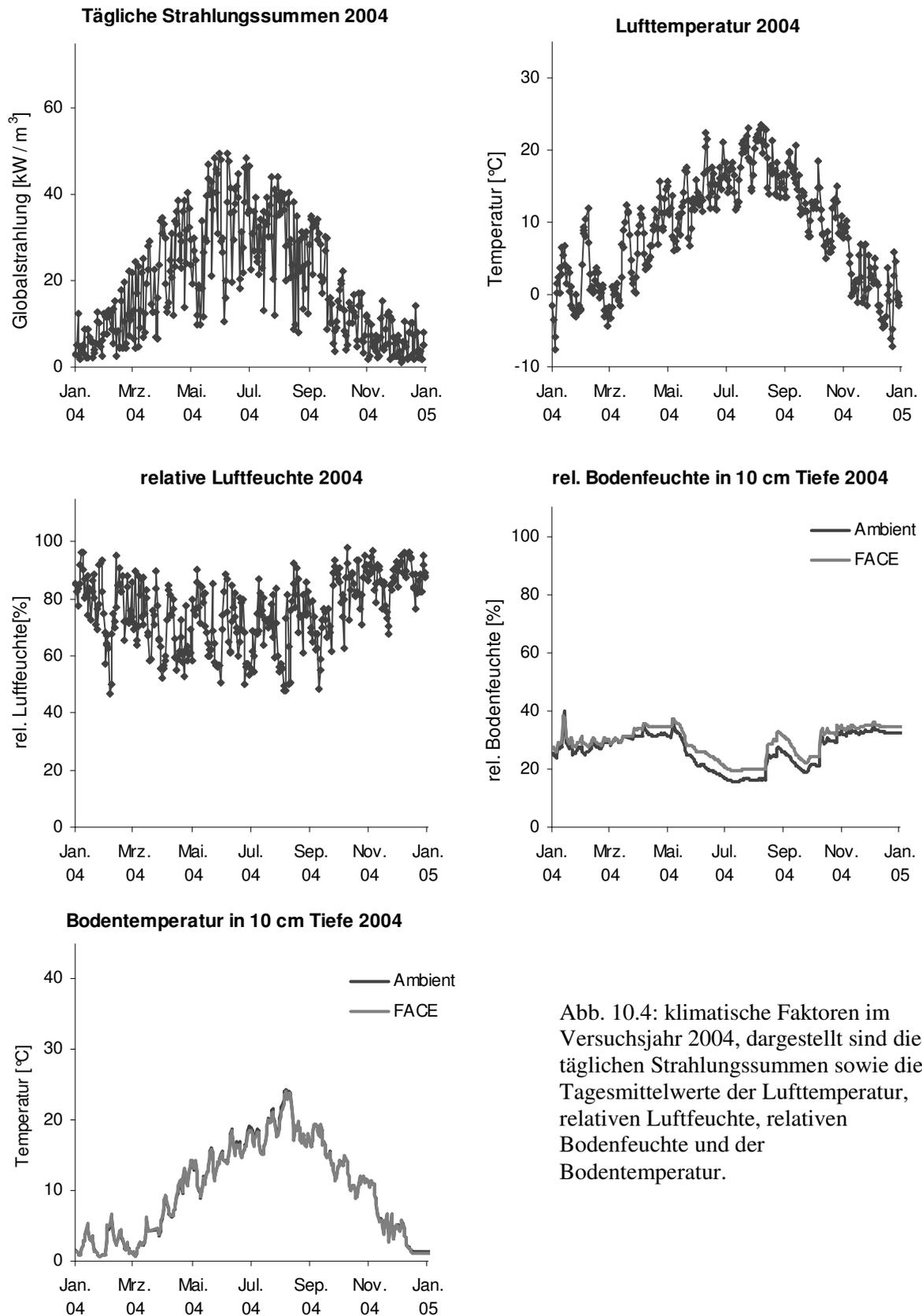


Abb. 10.4: klimatische Faktoren im Versuchsjahr 2004, dargestellt sind die täglichen Strahlungssummen sowie die Tagesmittelwerte der Lufttemperatur, relativen Luftfeuchte, relativen Bodenfeuchte und der Bodentemperatur.

10.5 ERGEBNISSE DER MULTIPLLEN VERGLEICHSTESTS

Tab. 10.3: Resultate des multiplen Vergleichstests (N unequal HSD Test) für den Faktor „Konzentration an löslichen Proteinen“ für die Fahnenblätter (FB) des Sommerweizens. Als Variablen wurden die „Tage nach der Aussaat (TNA)“ und die „CO₂-Behandlung,, (*Ambient*, *FACE*) eingesetzt. Dargestellt sind die p-Werte wobei gilt: signifikant, falls $p \leq 0,05$; hoch signifikant, falls $p \leq 0,01$; höchst signifikant, falls $p \leq 0,001$.

		Posthoc Test - Gehalt an löslichen Proteinen, FB									
		{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
78 TNA	Ambient {1}		1,0000	0,4455	1,0000	0,5212	0,9768	0,1110	0,2374	0,0002	0,0002
	FACE {2}	1,0000		0,4255	1,0000	0,5003	0,9722	0,1191	0,2518	0,0002	0,0002
86 TNA	Ambient {3}	0,4455	0,4255		0,4641	1,0000	0,9817	0,0003	0,0008	0,0002	0,0002
	FACE {4}	1,0000	1,0000	0,4641		0,5406	0,9805	0,1040	0,2246	0,0002	0,0002
92 TNA	Ambient {5}	0,5212	0,5003	1,0000	0,5406		0,9917	0,0004	0,0011	0,0002	0,0002
	FACE {6}	0,9768	0,9722	0,9817	0,9805	0,9917		0,0059	0,0167	0,0002	0,0002
99 TNA	Ambient {7}	0,1110	0,1191	0,0003	0,1040	0,0004	0,0059		1,0000	0,1387	0,0005
	FACE {8}	0,2374	0,2518	0,0008	0,2246	0,0011	0,0167	1,0000		0,0594	0,0002
106 TNA	Ambient {9}	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,1387	0,0594		0,4649
	FACE {10}	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0005	0,0002	0,4649	

Tab. 10.4: Resultate des multiplen Vergleichstests (N unequal HSD Test) für den Faktor „Konzentration an löslichen Proteinen“ für Blatt 7 (B7) des Sommerweizens. Als Variablen wurden die „Tage nach der Aussaat (TNA)“ und die „CO₂-Behandlung,, (*Ambient*, *FACE*) eingesetzt. Dargestellt sind die p-Werte wobei gilt: signifikant, falls $p \leq 0,05$; hoch signifikant, falls $p \leq 0,01$; höchst signifikant, falls $p \leq 0,001$.

		Posthoc Test - Gehalt an löslichen Proteinen, B7					
		{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
86 TNA	Ambient {3}		0,3405	0,5733	0,9994	0,7532	0,9997
	FACE {4}	0,3405		0,0056	0,1212	0,0498	0,2163
92 TNA	Ambient {5}	0,5733	0,0056		0,6820	1,0000	0,7462
	FACE {6}	0,9994	0,1212	0,6820		0,8907	1,0000
99 TNA	Ambient {7}	0,7532	0,0498	1,0000	0,8907		0,8756
	FACE {8}	0,9997	0,2163	0,7462	1,0000	0,8756	

Tab. 10.5: Resultate des multiplen Vergleichstests (N unequal HSD Test) für den Faktor „Konzentration an löslichen Proteinen“ für die Körner (Kö) des Sommerweizens. Als Variablen wurden die „Tage nach der Aussaat (TNA)“ und die „CO₂-Behandlung,, (*Ambient*, *FACE*) eingesetzt. Dargestellt sind die p-Werte wobei gilt: signifikant, falls $p \leq 0,05$; hoch signifikant, falls $p \leq 0,01$; höchst signifikant, falls $p \leq 0,001$.

		Posthoc Test - Gehalt an löslichen Proteinen, Kö						
		{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	
92 TNA	Ambient	{5}		0,3405	0,5733	0,9994	0,7532	0,9997
	FACE	{6}	0,3405		0,0056	0,1212	0,0498	0,2163
99 TNA	Ambient	{7}	0,5733	0,0056		0,6820	1,0000	0,7462
	FACE	{8}	0,9994	0,1212	0,6820		0,8907	1,0000
106 TNA	Ambient	{9}	0,7532	0,0498	1,0000	0,8907		0,8756
	FACE	{10}	0,9997	0,2163	0,7462	1,0000	0,8756	

Tab. 10.6: Resultate des multiplen Vergleichstests (N unequal HSD Test) für den Faktor „N-Konzentration“ für die Fahnenblätter (FB) des Sommerweizens. Als Variablen wurden die „Tage nach der Aussaat (TNA)“ und die „CO₂-Behandlung,, (*Ambient*, *FACE*) eingesetzt. Dargestellt sind die p-Werte wobei gilt: signifikant, falls $p \leq 0,05$; hoch signifikant, falls $p \leq 0,01$; höchst signifikant, falls $p \leq 0,001$.

		Posthoc Test - N-Konzentration, FB								
		{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	
78 TNA	Ambient	{1}		0,9923	0,3340	0,0005	0,0192	0,0002	0,0002	0,0002
	FACE	{2}	0,9923		0,8086	0,0040	0,1203	0,0012	0,0007	0,0007
86 TNA	Ambient	{3}	0,3340	0,8086		0,1431	0,8709	0,0529	0,0307	0,0297
	FACE	{4}	0,0005	0,0040	0,1431		0,8499	0,9998	0,9967	0,9963
92 TNA	Ambient	{5}	0,0192	0,1203	0,8709	0,8499		0,5850	0,4411	0,4328
	FACE	{6}	0,0002	0,0012	0,0529	0,9998	0,5850		1,0000	1,0000
99 TNA	Ambient	{7}	0,0002	0,0007	0,0307	0,9967	0,4411	1,0000		1,0000
	FACE	{8}	0,0002	0,0007	0,0297	0,9963	0,4328	1,0000	1,0000	

Tab. 10.7: Resultate des multiplen Vergleichstests (N unequal HSD Test) für den Faktor „N-Konzentration“ für die Fahnenblätter (FB) des Sommerweizens. Als Variablen wurden die „Tage nach der Aussaat (TNA)“ und die „CO₂-Behandlung,, (*Ambient*, *FACE*) eingesetzt. Dargestellt sind die p-Werte wobei gilt: signifikant, falls $p \leq 0,05$; hoch signifikant, falls $p \leq 0,01$; höchst signifikant, falls $p \leq 0,001$.

		Posthoc Test - N-Konzentration, B7								
		{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	
78 TNA	Ambient	{1}		0,2400	0,0440	0,0001	0,0028	0,0001	0,0006	0,0003
	FACE	{2}	0,2400		0,9887	0,0027	0,5125	0,0008	0,0280	0,0184
86 TNA	Ambient	{3}	0,0440	0,9887		0,0209	0,9425	0,0065	0,0913	0,0806
	FACE	{4}	0,0001	0,0027	0,0209		0,2288	0,9997	0,9967	1,0000
92 TNA	Ambient	{5}	0,0028	0,5125	0,9425	0,2288		0,0910	0,3389	0,3940
	FACE	{6}	0,0001	0,0008	0,0065	0,9997	0,0910		0,9999	1,0000
99 TNA	Ambient	{7}	0,0006	0,0280	0,0913	0,9967	0,3389	0,9999		0,9996
	FACE	{8}	0,0003	0,0184	0,0806	1,0000	0,3940	1,0000	0,9996	

Tab. 10.8: Resultate des multiplen Vergleichstests (N unequal HSD Test) für den Faktor „N-Konzentration“ für die Körner (Kö) des Sommerweizens. Als Variablen wurden die „Tage nach der Aussaat (TNA)“ und die „CO₂-Behandlung,, (*Ambient*, *FACE*) eingesetzt. Dargestellt sind die p-Werte wobei gilt: signifikant, falls $p \leq 0,05$; hoch signifikant, falls $p \leq 0,01$; höchst signifikant, falls $p \leq 0,001$.

Posthoc Test - N-Konzentration, Kö								
			{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
92 TNA	Ambient	{5}		0,9997	0,0483	0,0856	0,0002	0,0003
	FACE	{6}	0,9997		0,0893	0,1516	0,0003	0,0004
99 TNA	Ambient	{7}	0,0483	0,0893		0,9998	0,1035	0,1783
	FACE	{8}	0,0856	0,1516	0,9998		0,0591	0,1066
106 TNA	Ambient	{9}	0,0002	0,0003	0,1035	0,0591		0,9997
	FACE	{10}	0,0003	0,0004	0,1783	0,1066	0,9997	

Tab. 10.9: Resultate des multiplen Vergleichstests (N unequal HSD Test) für den Faktor „C-Konzentration“ für die Fahnenblätter (FB) des Sommerweizens. Als Variablen wurden die „Tage nach der Aussaat (TNA)“ und die „CO₂-Behandlung,, (*Ambient*, *FACE*) eingesetzt. Dargestellt sind die p-Werte wobei gilt: signifikant, falls $p \leq 0,05$; hoch signifikant, falls $p \leq 0,01$; höchst signifikant, falls $p \leq 0,001$.

Posthoc Test - C-Konzentration, FB										
			{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
78 TNA	Ambient	{1}		1,0000	1,0000	0,9129	0,9998	0,3577	0,9128	0,9986
	FACE	{2}	1,0000		1,0000	0,8575	0,9989	0,2849	0,8574	0,9946
86 TNA	Ambient	{3}	1,0000	1,0000		0,8968	0,9997	0,3331	0,8966	0,9977
	FACE	{4}	0,9129	0,8575	0,8968		0,9920	0,9718	1,0000	0,9981
92 TNA	Ambient	{5}	0,9998	0,9989	0,9997	0,9920		0,6280	0,9920	1,0000
	FACE	{6}	0,3577	0,2849	0,3331	0,9718	0,6280		0,9719	0,7291
99 TNA	Ambient	{7}	0,9128	0,8574	0,8966	1,0000	0,9920	0,9719		0,9981
	FACE	{8}	0,9986	0,9946	0,9977	0,9981	1,0000	0,7291	0,9981	

Tab. 10.10: Resultate des multiplen Vergleichstests (N unequal HSD Test) für den Faktor „C-Konzentration“ für das Blatt 7 (B7) des Sommerweizens. Als Variablen wurden die „Tage nach der Aussaat (TNA)“ und die „CO₂-Behandlung,, (*Ambient*, *FACE*) eingesetzt. Dargestellt sind die p-Werte wobei gilt: signifikant, falls $p \leq 0,05$; hoch signifikant, falls $p \leq 0,01$; höchst signifikant, falls $p \leq 0,001$.

Posthoc Test - C-Konzentration, B7										
			{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
78 TNA	Ambient	{1}		0,9733	0,8275	0,6090	0,9998	0,9987	1,0000	0,9954
	FACE	{2}	0,9733		0,9997	0,9774	0,8801	0,9999	1,0000	1,0000
86 TNA	Ambient	{3}	0,8275	0,9997		0,9993	0,6610	0,9880	0,9988	0,9999
	FACE	{4}	0,6090	0,9774	0,9993		0,3439	0,8926	0,9757	0,9874
92 TNA	Ambient	{5}	0,9998	0,8801	0,6610	0,3439		0,9729	0,9977	0,9476
	FACE	{6}	0,9987	0,9999	0,9880	0,8926	0,9729		1,0000	1,0000
99 TNA	Ambient	{7}	1,0000	1,0000	0,9988	0,9757	0,9977	1,0000		1,0000
	FACE	{8}	0,9954	1,0000	0,9999	0,9874	0,9476	1,0000	1,0000	

Tab. 10.11: Resultate des multiplen Vergleichstests (N unequal HSD Test) für den Faktor „C-Konzentration“ für die Körner des Sommerweizens. Als Variablen wurden die „Tage nach der Aussaat (TNA)“ und die „CO₂-Behandlung,, (*Ambient*, *FACE*) eingesetzt. Dargestellt sind die p-Werte wobei gilt: signifikant, falls $p \leq 0,05$; hoch signifikant, falls $p \leq 0,01$; höchst signifikant, falls $p \leq 0,001$.

Posthoc Test - C-Konzentration, Kö								
			{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
92 TNA	Ambient	{5}		0,9997	0,9281	0,0517	0,4162	0,5325
	FACE	{6}	0,9997		0,9852	0,0959	0,2675	0,3619
99 TNA	Ambient	{7}	0,9281	0,9852		0,3092	0,0796	0,1181
	FACE	{8}	0,0517	0,0959	0,3092		0,0007	0,0010
106 TNA	Ambient	{9}	0,4162	0,2675	0,0796	0,0007		1,0000
	FACE	{10}	0,5325	0,3619	0,1181	0,0010	1,0000	

Tab. 10.12: Resultate des multiplen Vergleichstests (N unequal HSD Test) für den Faktor „CN-Verhältnis“ für das Blatt 7 (B7) des Sommerweizens. Als Variablen wurden die „Tage nach der Aussaat (TNA)“ und die „CO₂-Behandlung,, (*Ambient*, *FACE*) eingesetzt. Dargestellt sind die p-Werte wobei gilt: signifikant, falls $p \leq 0,05$; hoch signifikant, falls $p \leq 0,01$; höchst signifikant, falls $p \leq 0,001$.

Posthoc Test - C/N, B7										
			{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
78 TNA	Ambient	{1}		0,4735	0,2033	0,0002	0,0434	0,0001	0,0011	0,0006
	FACE	{2}	0,4735		0,9993	0,0094	0,8909	0,0009	0,0250	0,0244
86 TNA	Ambient	{3}	0,2033	0,9993		0,0346	0,9942	0,0034	0,0548	0,0636
	FACE	{4}	0,0002	0,0094	0,0346		0,1694	0,9765	0,9596	0,9996
92 TNA	Ambient	{5}	0,0434	0,8909	0,9942	0,1694		0,0214	0,1476	0,2044
	FACE	{6}	0,0001	0,0009	0,0034	0,9765	0,0214		0,9998	1,0000
99 TNA	Ambient	{7}	0,0011	0,0250	0,0548	0,9596	0,1476	0,9998		0,9977
	FACE	{8}	0,0006	0,0244	0,0636	0,9996	0,2044	1,0000	0,9977	

Tab. 10.13: Resultate des multiplen Vergleichstests (N unequal HSD Test) für den Faktor „CN-Verhältnis“ für die Körner des Sommerweizens. Als Variablen wurden die „Tage nach der Aussaat (TNA)“ und die „CO₂-Behandlung,, (*Ambient*, *FACE*) eingesetzt. Dargestellt sind die p-Werte wobei gilt: signifikant, falls $p \leq 0,05$; hoch signifikant, falls $p \leq 0,01$; höchst signifikant, falls $p \leq 0,001$.

Posthoc Test - C/N, Kö								
			{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
92 TNA	Ambient	{5}		0,9997	0,0535	0,0812	0,0002	0,0003
	FACE	{6}	0,9997		0,0962	0,1417	0,0003	0,0004
99 TNA	Ambient	{7}	0,0535	0,0962		1,0000	0,0990	0,1604
	FACE	{8}	0,0812	0,1417	1,0000		0,0658	0,1098
106 TNA	Ambient	{9}	0,0002	0,0003	0,0990	0,0658		0,9999
	FACE	{10}	0,0003	0,0004	0,1604	0,1098	0,9999	

Tab. 10.14: Resultate des multiplen Vergleichstests (N unequal HSD Test) für den Faktor „SPAD“ für die Fahnenblätter des Sommerweizens. Als Variablen wurden die „Tage nach der Aussaat (TNA)“ und die „CO₂-Behandlung,, (*Ambient*, *FACE*) eingesetzt. Dargestellt sind die p-Werte wobei gilt: signifikant, falls $p \leq 0,05$; hoch signifikant, falls $p \leq 0,01$; höchst signifikant, falls $p \leq 0,001$.

		Posthoc Test - SPAD FB									
		{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
70 TNA	Ambient {1}		0,7386	0,9999	0,9999	0,8274	0,9764	0,9815	0,9990	1,0000	0,8923
	FACE {2}	0,7386		0,3772	0,3436	0,0208	0,0969	0,1748	0,4249	0,9829	0,1379
79 TNA	Ambient {3}	0,9999	0,3772		1,0000	0,9891	0,9998	0,9998	1,0000	0,9997	0,9858
	FACE {4}	0,9999	0,3436	1,0000		0,9878	0,9998	0,9998	1,0000	0,9997	0,9862
85 TNA	Ambient {5}	0,8274	0,0208	0,9891	0,9878		1,0000	1,0000	0,9999	0,9102	1,0000
	FACE {6}	0,9764	0,0969	0,9998	0,9998	1,0000		1,0000	1,0000	0,9828	0,9998
93 TNA	Ambient {7}	0,9815	0,1748	0,9998	0,9998	1,0000	1,0000		1,0000	0,9732	0,9999
	FACE {8}	0,9990	0,4249	1,0000	1,0000	0,9999	1,0000	1,0000		0,9959	0,9981
97 TNA	Ambient {9}	1,0000	0,9829	0,9997	0,9997	0,9102	0,9828	0,9732	0,9959		0,7862
	FACE {10}	0,8923	0,1379	0,9858	0,9862	1,0000	0,9998	0,9999	0,9981	0,7862	

Tab. 10.15: Resultate des multiplen Vergleichstests (N unequal HSD Test) für den Faktor „SPAD“ für Blatt 7 des Sommerweizens. Als Variablen wurden die „Tage nach der Aussaat (TNA)“ und die „CO₂-Behandlung,, (*Ambient*, *FACE*) eingesetzt. Dargestellt sind die p-Werte wobei gilt: signifikant, falls $p \leq 0,05$; hoch signifikant, falls $p \leq 0,01$; höchst signifikant, falls $p \leq 0,001$.

		Posthoc Test - SPAD B7							
		{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
64 TNA	Ambient {1}		0,9911	0,7844	1,0000	1,0000	0,0085	0,4933	0,2818
	FACE {2}	0,9911		0,2027	0,9856	0,9995	0,0811	0,9170	0,6669
70 TNA	Ambient {3}	0,7844	0,2027		0,7647	0,5144	0,0000	0,0191	0,0149
	FACE {4}	1,0000	0,9856	0,7647		1,0000	0,0041	0,4735	0,2694
79 TNA	Ambient {5}	1,0000	0,9995	0,5144	1,0000		0,0161	0,6903	0,4214
	FACE {6}	0,0085	0,0811	0,0000	0,0041	0,0161		0,9438	1,0000
85 TNA	Ambient {7}	0,4933	0,9170	0,0191	0,4735	0,6903	0,9438		0,9963
	FACE {8}	0,2818	0,6669	0,0149	0,2694	0,4214	1,0000	0,9963	

Tab. 10.16: Resultate des multiplen Vergleichstests (N unequal HSD Test) für den Faktor „SPAD“ für Blatt 5 des Sommerweizens. Als Variablen wurden die „Tage nach der Aussaat (TNA)“ und die „CO₂-Behandlung,, (*Ambient*, *FACE*) eingesetzt. Dargestellt sind die p-Werte wobei gilt: signifikant, falls $p \leq 0,05$; hoch signifikant, falls $p \leq 0,01$; höchst signifikant, falls $p \leq 0,001$.

		Posthoc Test - SPAD B5									
		{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
44 TNA	Ambient {1}		0,9767	0,9777	0,6667	0,0000	0,0000	0,0003	0,0001	0,6055	0,5400
	FACE {2}	0,9767		0,4767	0,1337	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1104	0,0895
49 TNA	Ambient {3}	0,9777	0,4767		0,9990	0,0001	0,0000	0,0167	0,0089	0,9975	0,9959
	FACE {4}	0,6667	0,1337	0,9990		0,0017	0,0001	0,1609	0,1035	1,0000	1,0000
56 TNA	Ambient {5}	0,0000	0,0000	0,0001	0,0017		0,9992	0,9352	0,9727	0,0024	0,0066
	FACE {6}	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,9992		0,5093	0,6343	0,0001	0,0003
64 TNA	Ambient {7}	0,0003	0,0000	0,0167	0,1609	0,9352	0,5093		1,0000	0,1987	0,3011
	FACE {8}	0,0001	0,0000	0,0089	0,1035	0,9727	0,6343	1,0000		0,1309	0,2130
70 TNA	Ambient {9}	0,6055	0,1104	0,9975	1,0000	0,0024	0,0001	0,1987	0,1309		1,0000
	FACE {10}	0,5400	0,0895	0,9959	1,0000	0,0066	0,0003	0,3011	0,2130	1,0000	

Tab. 10.17: Resultate des multiplen Vergleichstests (N unequal HSD Test) für den Faktor „SPAD“ für Blatt 3 des Sommerweizens. Als Variablen wurden die „Tage nach der Aussaat (TNA)“ und die „CO₂-Behandlung,, (*Ambient*, *FACE*) eingesetzt. Dargestellt sind die p-Werte wobei gilt: signifikant, falls $p \leq 0,05$; hoch signifikant, falls $p \leq 0,01$; höchst signifikant, falls $p \leq 0,001$.

		Posthoc Test - SPAD B3					
		{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
44 TNA	Ambient {1}		0,9773	0,0062	0,0643	0,0000	0,0000
	FACE {2}	0,9773		0,0639	0,3302	0,0000	0,0000
49 TNA	Ambient {3}	0,0062	0,0639		0,9770	0,0001	0,0000
	FACE {4}	0,0643	0,3302	0,9770		0,0000	0,0000
56 TNA	Ambient {5}	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000		0,9150
	FACE {6}	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,9150	

Tab. 10.18: Resultate des multiplen Vergleichstests (N unequal HSD Test) für den Faktor „Biomasse HT“ für das Fahnenblatt (FB) des Sommerweizens. Als Variablen wurden die „Tage nach der Aussaat (TNA)“ und die „CO₂-Behandlung,, (*Ambient*, *FACE*) eingesetzt. Dargestellt sind die p-Werte wobei gilt: signifikant, falls $p \leq 0,05$; hoch signifikant, falls $p \leq 0,01$; höchst signifikant, falls $p \leq 0,001$.

		Posthoc Test - Biomasse HT, FB									
		{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
78 TNA	Ambient {1}		0,9094	1,0000	0,9998	0,9717	1,0000	0,7236	0,8615	0,4111	0,0012
	FACE {2}	0,9094		0,7257	0,5881	1,0000	0,8960	0,0666	0,1629	0,0197	0,0002
86 TNA	Ambient {3}	1,0000	0,7257		1,0000	0,8608	1,0000	0,9081	0,9653	0,6532	0,0027
	FACE {4}	0,9998	0,5881	1,0000		0,7486	0,9999	0,9646	0,9890	0,7837	0,0043
92 TNA	Ambient {5}	0,9717	1,0000	0,8608	0,7486		0,9655	0,1178	0,2514	0,0377	0,0002
	FACE {6}	1,0000	0,8960	1,0000	0,9999	0,9655		0,7458	0,8758	0,4338	0,0013
99 TNA	Ambient {7}	0,7236	0,0666	0,9081	0,9646	0,1178	0,7458		1,0000	1,0000	0,0511
	FACE {8}	0,8615	0,1629	0,9653	0,9890	0,2514	0,8758	1,0000		1,0000	0,0443
106 TNA	Ambient {9}	0,4111	0,0197	0,6532	0,7837	0,0377	0,4338	1,0000	1,0000		0,1212
	FACE {10}	0,0012	0,0002	0,0027	0,0043	0,0002	0,0013	0,0511	0,0443	0,1212	

Tab. 10.19: Resultate des multiplen Vergleichstests (N unequal HSD Test) für den Faktor „Biomasse HT“ für das Blatt 7 des Sommerweizens. Als Variablen wurden die „Tage nach der Aussaat (TNA)“ und die „CO₂-Behandlung,, (*Ambient*, *FACE*) eingesetzt. Dargestellt sind die p-Werte wobei gilt: signifikant, falls $p \leq 0,05$; hoch signifikant, falls $p \leq 0,01$; höchst signifikant, falls $p \leq 0,001$.

		Posthoc Test - Biomasse HT, B7							
		{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
78 TNA	Ambient {1}		1,0000	1,0000	0,9905	0,9579	0,8441	0,0007	0,0601
	FACE {2}	1,0000		1,0000	0,9763	0,9215	0,7717	0,0005	0,0450
86 TNA	Ambient {3}	1,0000	1,0000		0,9482	0,8652	0,6823	0,0004	0,0326
	FACE {4}	0,9905	0,9763	0,9482		1,0000	0,9988	0,0056	0,2628
92 TNA	Ambient {5}	0,9579	0,9215	0,8652	1,0000		1,0000	0,0107	0,3753
	FACE {6}	0,8441	0,7717	0,6823	0,9988	1,0000		0,0250	0,5603
99 TNA	Ambient {7}	0,0007	0,0005	0,0004	0,0056	0,0107	0,0250		0,9054
	FACE {8}	0,0601	0,0450	0,0326	0,2628	0,3753	0,5603	0,9054	

Tab. 10.20: Resultate des multiplen Vergleichstests (N unequal HSD Test) für den Faktor „Biomasse HT“ für die Ähre (Ae) des Sommerweizens. Als Variablen wurden die „Tage nach der Aussaat (TNA)“ und die „CO₂-Behandlung,, (*Ambient*, *FACE*) eingesetzt. Dargestellt sind die p-Werte wobei gilt: signifikant, falls $p \leq 0,05$; hoch signifikant, falls $p \leq 0,01$; höchst signifikant, falls $p \leq 0,001$.

		Posthoc Test - Biomasse HT, Ae						
			{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
92 TNA	Ambient	{5}		1,0000	0,2106	0,2328	0,2862	0,9903
	FACE	{6}	1,0000		0,1947	0,2174	0,2664	0,9874
99 TNA	Ambient	{7}	0,2106	0,1947		1,0000	1,0000	0,8110
	FACE	{8}	0,2328	0,2174	1,0000		0,9991	0,7219
106 TNA	Ambient	{9}	0,2862	0,2664	1,0000	0,9991		0,8773
	FACE	{10}	0,9903	0,9874	0,8110	0,7219	0,8773	

Tab. 10.21: Resultate des multiplen Vergleichstests (N unequal HSD Test) für den Faktor „Biomasse HT“ des Sommerweizens. Als Variablen wurden die „Tage nach der Aussaat (TNA)“ und die „CO₂-Behandlung,, (*Ambient*, *FACE*) eingesetzt. Dargestellt sind die p-Werte wobei gilt: signifikant, falls $p \leq 0,05$; hoch signifikant, falls $p \leq 0,01$; höchst signifikant, falls $p \leq 0,001$.

		Posthoc Test - Biomasse Ähren Gesamt										
			{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
78 TNA	Ambient	{1}		1,0000	0,9998	1,0000	0,0579	0,1291	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
	FACE	{2}	1,0000		0,9877	0,9965	0,0190	0,0469	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
86 TNA	Ambient	{3}	0,9998	0,9877		1,0000	0,2073	0,3820	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
	FACE	{4}	1,0000	0,9965	1,0000		0,1491	0,2919	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
92 TNA	Ambient	{5}	0,0579	0,0190	0,2073	0,1491		1,0000	0,0002	0,0022	0,0002	0,0002
	FACE	{6}	0,1291	0,0469	0,3820	0,2919	1,0000		0,0002	0,0009	0,0002	0,0002
99 TNA	Ambient	{7}	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002		0,9977	0,9145	0,1412
	FACE	{8}	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0022	0,0009	0,9977		0,5442	0,0266
106 TNA	Ambient	{9}	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,9145	0,5442		0,7274
	FACE	{10}	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,1412	0,0266	0,7274	

Tab. 10.22: Resultate des multiplen Vergleichstests (N unequal HSD Test) für den Faktor „Biomasse HT“ des Sommerweizens. Als Variablen wurden die „Tage nach der Aussaat (TNA)“ und die „CO₂-Behandlung,, (*Ambient*, *FACE*) eingesetzt. Dargestellt sind die p-Werte wobei gilt: signifikant, falls $p \leq 0,05$; hoch signifikant, falls $p \leq 0,01$; höchst signifikant, falls $p \leq 0,001$.

		Posthoc Test - Biomasse Blätter Gesamt									
		{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
78 TNA	Ambient {1}		1,0000	0,9664	0,9014	1,0000	0,9869	0,7225	0,9998	0,0011	0,0065
	FACE {2}	1,0000		0,9957	0,9766	1,0000	0,9991	0,8828	1,0000	0,0026	0,0126
86 TNA	Ambient {3}	0,9664	0,9957		1,0000	0,9317	1,0000	0,9998	1,0000	0,0288	0,0720
	FACE {4}	0,9014	0,9766	1,0000		0,8372	1,0000	1,0000	0,9995	0,0528	0,1103
92 TNA	Ambient {5}	1,0000	1,0000	0,9317	0,8372		0,9680	0,6267	0,9989	0,0007	0,0047
	FACE {6}	0,9869	0,9991	1,0000	1,0000	0,9680		0,9987	1,0000	0,0190	0,0538
99 TNA	Ambient {7}	0,7225	0,8828	0,9998	1,0000	0,6267	0,9987		0,9901	0,1198	0,1955
	FACE {8}	0,9998	1,0000	1,0000	0,9995	0,9989	1,0000	0,9901		0,0231	0,0270
106 TNA	Ambient {9}	0,0011	0,0026	0,0288	0,0528	0,0007	0,0190	0,1198	0,0231		1,0000
	FACE {10}	0,0065	0,0126	0,0720	0,1103	0,0047	0,0538	0,1955	0,0270	1,0000	

Tab. 10.23: Resultate des multiplen Vergleichstests (N unequal HSD Test) für den Faktor „Biomasse HT“ des Sommerweizens. Als Variablen wurden die „Tage nach der Aussaat (TNA)“ und die „CO₂-Behandlung,, (*Ambient*, *FACE*) eingesetzt. Dargestellt sind die p-Werte wobei gilt: signifikant, falls $p \leq 0,05$; hoch signifikant, falls $p \leq 0,01$; höchst signifikant, falls $p \leq 0,001$.

		Posthoc Test - Biomasse Gesamtpflanze									
		{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
78 TNA	Ambient {1}		1,0000	0,9999	0,9851	0,0788	0,0851	0,0006	0,0031	0,0261	0,0002
	FACE {2}	1,0000		0,9884	0,8709	0,0255	0,0278	0,0002	0,0010	0,0076	0,0002
86 TNA	Ambient {3}	0,9999	0,9884		1,0000	0,2515	0,2669	0,0026	0,0124	0,1008	0,0004
	FACE {4}	0,9851	0,8709	1,0000		0,5375	0,5594	0,0104	0,0395	0,2732	0,0009
92 TNA	Ambient {5}	0,0788	0,0255	0,2515	0,5375		1,0000	0,6869	0,8494	1,0000	0,0650
	FACE {6}	0,0851	0,0278	0,2669	0,5594	1,0000		0,6656	0,8351	1,0000	0,0611
99 TNA	Ambient {7}	0,0006	0,0002	0,0026	0,0104	0,6869	0,6656		1,0000	0,9142	0,7288
	FACE {8}	0,0031	0,0010	0,0124	0,0395	0,8494	0,8351	1,0000		0,9723	0,6781
106 TNA	Ambient {9}	0,0261	0,0076	0,1008	0,2732	1,0000	1,0000	0,9142	0,9723		0,1417
	FACE {10}	0,0002	0,0002	0,0004	0,0009	0,0650	0,0611	0,7288	0,6781	0,1417	

Tab. 10.24: Resultate des multiplen Vergleichstests (N unequal HSD Test) für den Faktor „Konzentration an löslichen Proteinen“ der Blätter des Ackersenfs. Als Variablen wurden die „Tage nach der Aussaat (TNA)“ und die „CO₂-Behandlung,, (*Ambient*, *FACE*) eingesetzt. Dargestellt sind die p-Werte wobei gilt: signifikant, falls $p \leq 0,05$; hoch signifikant, falls $p \leq 0,01$; höchst signifikant, falls $p \leq 0,001$.

Posthoc Test - Gehalt an löslichen Proteinen AS						
			{1}	{2}	{3}	{4}
49 TNA	Ambient	{1}		0,0853	0,0153	0,0038
	FACE	{2}	0,0853		0,8121	0,4136
57 TNA	Ambient	{3}	0,0153	0,8121		0,8956
	FACE	{4}	0,0038	0,4136	0,8956	

Tab. 10.25: Resultate des multiplen Vergleichstests (N unequal HSD Test) für den Faktor „SPAD“ von Blatt 7 (B7) des Ackersenfs. Als Variablen wurden die „Tage nach der Aussaat (TNA)“ und die „CO₂-Behandlung,, (*Ambient*, *FACE*) eingesetzt. Dargestellt sind die p-Werte wobei gilt: signifikant, falls $p \leq 0,05$; hoch signifikant, falls $p \leq 0,01$; höchst signifikant, falls $p \leq 0,001$.

Posthoc Test - SPAD B7								
			{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
70 TNA	Ambient	{1}		1,0000	0,2268	0,0091	0,1283	0,1598
	FACE	{2}	1,0000		0,2527	0,0110	0,1459	0,1804
79 TNA	Ambient	{3}	0,2268	0,2527		0,8526	0,9998	1,0000
	FACE	{4}	0,0091	0,0110	0,8526		0,9453	0,9177
85 TNA	Ambient	{5}	0,1283	0,1459	0,9998	0,9453		1,0000
	FACE	{6}	0,1598	0,1804	1,0000	0,9177	1,0000	

Tab. 10.26: Resultate des multiplen Vergleichstests (N unequal HSD Test) für den Faktor „SPAD“ von Blatt 5 (B5) des Ackersenfs. Als Variablen wurden die „Tage nach der Aussaat (TNA)“ und die „CO₂-Behandlung,, (*Ambient*, *FACE*) eingesetzt. Dargestellt sind die p-Werte wobei gilt: signifikant, falls $p \leq 0,05$; hoch signifikant, falls $p \leq 0,01$; höchst signifikant, falls $p \leq 0,001$.

		Posthoc Test - SPAD B5											
		{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}
49 TNA	Ambient {1}		0,6736	1,0000	0,4660	0,8690	0,9307	0,7683	0,9990	0,0000	0,0001	0,0003	0,0000
	FACE {2}	0,6736		0,9629	1,0000	0,0105	0,0188	0,0051	0,1266	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
56 TNA	Ambient {3}	1,0000	0,9629		0,8729	0,4597	0,5790	0,3335	0,9307	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	FACE {4}	0,4660	1,0000	0,8729		0,0035	0,0066	0,0016	0,0567	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
64 TNA	Ambient {5}	0,8690	0,0105	0,4597	0,0035		1,0000	1,0000	0,9998	0,0004	0,0310	0,0523	0,0000
	FACE {6}	0,9307	0,0188	0,5790	0,0066	1,0000		1,0000	1,0000	0,0002	0,0186	0,0347	0,0000
70 TNA	Ambient {7}	0,7683	0,0051	0,3335	0,0016	1,0000	1,0000		0,9982	0,0008	0,0532	0,0813	0,0000
	FACE {8}	0,9990	0,1266	0,9307	0,0567	0,9998	1,0000	0,9982		0,0000	0,0021	0,0058	0,0000
79 TNA	Ambient {9}	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0004	0,0002	0,0008	0,0000		0,9996	1,0000	0,2332
	FACE {10}	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0310	0,0186	0,0532	0,0021	0,9996		1,0000	0,0224
85 TNA	Ambient {11}	0,0003	0,0000	0,0000	0,0000	0,0523	0,0347	0,0813	0,0058	1,0000	1,0000		0,1804
	FACE {12}	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2332	0,0224	0,1804	

Tab. 10.27: Resultate des multiplen Vergleichstests (N unequal HSD Test) für den Faktor „SPAD“ von Blatt 3 (B3) des Ackersenfs. Als Variablen wurden die „Tage nach der Aussaat (TNA)“ und die „CO₂-Behandlung,, (Ambient, FACE) eingesetzt. Dargestellt sind die p-Werte wobei gilt: signifikant, falls $p \leq 0,05$; hoch signifikant, falls $p \leq 0,01$; höchst signifikant, falls $p \leq 0,001$.

		Posthoc Test - SPAD B3									
		{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
44 TNA	Ambient {1}		0,9980	0,0978	0,0002	0,9845	0,4561	0,0825	0,0015	0,0000	0,9664
	FACE {2}	0,9980		0,5328	0,0057	1,0000	0,9378	0,4883	0,0272	0,0000	0,6505
49 TNA	Ambient {3}	0,0978	0,5328		0,8331	0,7573	0,9993	1,0000	0,9725	0,0000	0,0098
	FACE {4}	0,0002	0,0057	0,8331		0,0267	0,3511	0,8634	1,0000	0,0000	0,0000
56 TNA	Ambient {5}	0,9845	1,0000	0,7573	0,0267		0,9889	0,7185	0,0945	0,0000	0,4799
	FACE {6}	0,4561	0,9378	0,9993	0,3511	0,9889		0,9987	0,6500	0,0000	0,0693
64 TNA	Ambient {7}	0,0825	0,4883	1,0000	0,8634	0,7185	0,9987		0,9809	0,0000	0,0081
	FACE {8}	0,0015	0,0272	0,9725	1,0000	0,0945	0,6500	0,9809		0,0000	0,0002
70 TNA	Ambient {9}	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000		0,0011
	FACE {10}	0,9664	0,6505	0,0098	0,0000	0,4799	0,0693	0,0081	0,0002	0,0011	

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Professor Dr. Andreas Fangmeier für die Überlassung des Themas sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in Hohenheim. Darüber hinaus sage ich danke für seine Unterstützung während meiner Promotionszeit.

Herrn PD Dr. Ferdinand von Eggeling danke ich für die uneingeschränkte Nutzung der vorhandenen Geräte und für die Bereitstellung eines Laborarbeitsplatzes in Jena. Ich bedanke mich sehr für die herzliche Betreuung vor Ort inklusive der vielen Anregungen und Gedankenanstöße, die mich immer einen Schritt weiterbrachten.

Für die gute Zusammenarbeit bedanke ich mich beim gesamten „Heidfeldhof-Team“. Insbesondere Dipl.-Biol. Martin Erbs danke ich für die Hilfe bei den IRMS-Messungen. Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Landschafts- und Pflanzenökologie für die Unterstützung und Zusammenarbeit während meiner Promotionszeit.

Dem Institut für Humangenetik und Anthropologie in Jena und insbesondere der CUCA Gruppe danke ich für die sehr nette Arbeitsatmosphäre und dafür, dass sie mich mit immer offenen Armen empfangen haben.

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt Herrn Dr. Christian Melle für die tolle Unterstützung und Betreuung in allen Situationen.

Für den starken Rückenwind in allen Lebenslagen möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Heidrun Moser bedanken. Ohne sie wäre ich nach so manchem Sturm nicht wieder aufgestanden.

Ein spezieller Dank gilt Herrn Dr. Ryan Oyama und Frau Dipl.-Biol. Julia Diegmann für die vielen fachlichen Gespräche und Denkanstöße. Darüber hinaus bedanke ich mich ganz herzlich für ihre Gastfreundschaft und die leckeren Auberginen.

Mein Dank gilt allen Korrekturlesern und -leserinnen, insbesondere Herrn Prof. Dr. Gerhard Augst, für das unermüdliche und zahlreiche Lesen dieser Arbeit sowie die hilfreichen Tipps und Kommentare.

Für die netten Teerunden bedanke ich mich bei Dr. Jürgen Franzaring, Ms. Youssef Atallah, Dipl.-Ing. Jenny Kopsch, Dipl.-Biol. Björn Schäfer, Dipl.-Ing. Roland Smetana und Dipl. Ing. Georg Zeltner.

Bei Herrn Dr. Dominik Müller und Dipl. Agr.-biol. Franziska Huttenlocher bedanke ich mich ganz herzlich für die vielen aufmunternden und fachlichen Gespräche.

Meinem Freund René Kristen danke für die fachlichen und privaten Gespräche, die mir in vielen Situationen weitergeholfen haben. Ich danke ihm besonders dafür, dass er immer an mich geglaubt und mich auch in scheinbar ausweglosen Situationen zum Lachen gebracht hat.

Meiner Familie und insbesondere meinen Eltern danke ich sehr für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht während meines Studiums und meiner Dissertation. Ich bedanke mich auch dafür, dass sie zu jeder Zeit für mich da waren und hinter mir standen.

