

**Einfluss von erhöhtem atmosphärischen CO₂
auf die N₂-fixierende Symbiose von *Trifolium repens* L.
und *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii***

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

Institut für Botanik
Institut für Pflanzenernährung

vorgelegt von
Sara Stöber

Marburg
2007

Dekan: Prof. Dr. Heinz Breer
1. berichtende Person: Prof. Dr. Nicolaus von Wirén
2. berichtende Person: Prof. Dr. Manfred Küppers
Eingereicht am: 04.04.2007
Mündliche Prüfung am: 19.07.2007

Die vorliegende Arbeit wurde am 10.07.2007 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

“The most beautiful experience we can have is the mysterious - the fundamental emotion which stands at the cradle of true art and true science.”

Albert Einstein

VERZEICHNISSE

Inhaltsverzeichnis.....	iv
Tabellenverzeichnis.....	vii
Abbildungsverzeichnis.....	vii
Bilderverzeichnis.....	xii

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Die CO ₂ -Problematik	2
1.2 Allgemeiner CO ₂ -Einfluss auf die Pflanzenwelt.....	4
1.3 Das Swiss FACE: Einfluss von erhöhtem atmosphärischen CO ₂ auf ein Modellgraslandökosystem	7
1.3.1 Anpassung von <i>Trifolium repens</i> an höhere CO ₂ -Konzentrationen	7
1.3.2 Steigerung der symbiotischen Stickstofffixierung als Folge erhöhter CO ₂ - Konzentration.....	9
1.3.3 Indirekte Beeinflussung der Mikroorganismen in der Rhizosphäre durch erhöhtes CO ₂	10
1.4 Die Symbiose von <i>Trifolium repens</i> und <i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>trifolii</i>	12
1.4.1 Phenole als Signalmoleküle im Infektionsprozess	12
1.4.2 Struktur und Funktion der Nod-Faktoren.....	16
1.4.3 Der Prozess der Knöllchenbildung und die symbiotische N ₂ -Fixierung	19
1.5 Zielsetzung.....	21
2 MATERIAL UND METHODEN.....	24
2.1 Beschreibung des Feldversuchs (Swiss FACE) und Probenentnahme.....	24
2.2 Isolation von N ₂ -fixierenden Mikroorganismen (Rhizobien) aus Wurzelknöllchen.....	25
2.3 Pflanzeninfektions-Test	27
2.3.1 Sterilisation und Keimung der Weißklee Samen	28

2.3.2	Präparation der Schrägagarröhrchen	28
2.3.3	Kultivierung der Bakterien und Inokulation der Pflanzen	29
2.4	Rep-PCR DNA Fingerprinting isolierter Rhizobien-Stämme	30
2.5	Gewinnung von Wurzelexsudaten unter sterilen Versuchsbedingungen	32
2.5.1	Kultivierung von <i>Trifolium repens</i> in Magenta Boxen.....	32
2.5.2	Gewinnung der Wurzelexsudate	35
2.5.3	Beprobung der Pflanzen und C/N-Analyse	35
2.6	Gewinnung von Wurzelexsudaten unter unsterilen Versuchsbedingungen	36
2.6.1	Kultivierung von <i>Trifolium repens</i> im hydroponischen Gefäßversuch	36
2.6.2	Gewinnung der Wurzelexsudate	39
2.6.3	Beprobung der Pflanzen und C/N-Analyse	41
2.7	Analyse der Wurzelexsudate.....	41
2.7.1	Aufbereitung der Wurzelexsudate.....	41
2.7.2	HPLC-Analyse der Wurzelexsudate.....	42
2.7.3	Massenspektrometrie aufgereinigter HPLC-Fractionen	44
2.7.4	<i>Nod</i> -Gen-Induktionstest	45
2.8	Statistische Auswertung	48
3	ERGEBNISSE.....	50
3.1	Auswirkung von erhöhter atmosphärischer CO₂-Konzentration auf die genetische Diversität der Rhizobien-Population im Swiss FACE.....	50
3.1.1	Nodulationsfähigkeit der isolierten Bakterien-Stämme	50
3.1.2	Genetische Diversität von <i>R. l. bv. trifolii</i> nach 10-jähriger CO ₂ -Begasung im Swiss FACE	51
3.2	Auswirkung von erhöhtem atmosphärischem CO₂ und N-Versorgung auf die Wurzelexsudation von <i>T. repens</i>	53
3.2.1	Analyse von Pflanzen und Wurzelexsudaten aus steriler Kultur.....	53
3.2.1.1	<i>Einfluss von CO₂-Konzentration und N-Versorgung auf das Spross- und Wurzelwachstum von T. repens.....</i>	<i>53</i>
3.2.1.2	<i>Veränderung der C- und N-Konzentration durch CO₂ und N-Versorgung .</i>	<i>57</i>
3.2.1.3	<i>Identifikation phenolischer Wurzelexsudate mittels HPLC-Analyse.....</i>	<i>59</i>
3.2.1.4	<i>Identifikation phenolischer Wurzelexsudate mittels Massen-spektroskopie</i>	<i>72</i>
3.2.1.5	<i>Biologische Aktivität der isolierten HPLC-Fractionen.....</i>	<i>74</i>
3.2.1.6	<i>Identifizierung der durch N-Mangel induzierten Fraktion C.....</i>	<i>74</i>

3.2.2	Analyse von Pflanzen und Wurzelexsudaten aus nicht-steriler Kultur	76
3.2.2.1	<i>Einfluss von CO₂ und N-Versorgung auf das Spross- und Wurzelwachstum von T. repens</i>	76
3.2.2.2	<i>Veränderung der C- und N-Konzentrationen durch CO₂ und N-Versorgung</i>	81
3.2.2.3	<i>Identifikation phenolischer Wurzelexsudate mittels HPLC-Analyse</i>	86
3.2.2.4	<i>Identifikation phenolischer Wurzelexsudate mittels Massen-spektroskopie</i>	95
3.2.2.5	<i>Biologische Aktivität der der isolierten HPLC-Fraktionen</i>	97
4	DISKUSSION	98
4.1	Genetische Anpassung von Rhizobien an ein neues C/N-Gleichgewicht im Swiss FACE	98
4.2	CO₂ stimuliert die Biomasseproduktion von Weißklee in Abhängigkeit der N-Versorgung und des Versuchsansatzes	102
4.3	CO₂ beeinflusst unter N-Limitierung ausschließlich das C/N-Verhältnis im Spross	106
4.4	Identifikation von Komponenten in Wurzelexsudaten als aglycosidische Flavone mit Signalfunktion	109
4.5	CO₂-Einfluss auf die Wurzelexsudation von T. repens ist abhängig von der N-Versorgung und dem Versuchsansatz	111
4.6	Schlussfolgerungen und Perspektiven	116
5	ZUSAMMENFASSUNG	118
6	SUMMARY	120
7	LITERATURVERZEICHNIS	122
8	ANHANG	143

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Wurzel/Spross-Verhältnis [TM] von steril kultivierten Weißkleepflanzen (19 Tage alt) in Abhängigkeit der atmosphärischen CO ₂ -Konzentration und der N-Versorgung. Angegeben sind die Mittelwerte ($n = 15$, $P < 0,05$).....	56
Tab. 2: C/N-Verhältnis in Spross und Wurzel von steril kultivierten Weißkleepflanzen (19 Tage alt) in Abhängigkeit der atmosphärischen CO ₂ -Konzentration und der N-Versorgung. Angegeben sind die Mittelwerte ($n = 15$, $P < 0,05$).....	59
Tab. 3: Wurzel/Spross-Verhältnis von nicht-steril kultivierten Weißkleepflanzen in Abhängigkeit der atmosphärischen CO ₂ -Konzentration und der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Angegeben sind die Mittelwerte ($n = 5$, $P < 0,05$).....	80
Tab. 4: C/N-Verhältnis in Spross und Wurzel in Abhängigkeit von der atmosphärischen CO ₂ -Konzentration, der N-Versorgung und dem Pflanzenalter. Angegeben sind die Mittelwerte ($n = 5$, $P < 0,05$).....	85

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die Kurve zeigt die atmosphärische CO ₂ -Konzentration vom Jahr 1000 bis zum Jahr 2000. Die Daten stammen aus Untersuchungen von Eisbohrkernen und aus direkten Messungen der letzten Jahrzehnte. Die Projektionen der CO ₂ -Konzentration von 2000 bis 2100 basieren auf den sechs illustrierten SRES-Szenarien des dritten IPCC-Berichts und – zum Vergleich – IS92a aus dem zweiten IPCC Bericht (Quelle: IPCC, 2001). 3	
Abb. 2: Chemische Struktur der von <i>T. repens</i> exsudierten Substanzen, die die <i>nod</i> -Gene von <i>R. l. bv. trifolii</i> aktivieren und Substanzen mit inhibitorischer Funktion (modifiziert nach REDMOND et al. 1986).....	14

- Abb. 3: Organisation der Nodulationsgene in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. Die Gene und die Richtung ihrer Transkription werden durch große Pfeile dargestellt. Die weißen Pfeile repräsentieren die *nod*-Gene; der schwarze Pfeil symbolisiert das *nodD*-Gen; die punktierten Pfeile kennzeichnen weitere, artspezifische Nodulationsgene und unbekannte „open reading frames“ (SCHLAMMAN et al. 1998). 15
- Abb. 4: Signalaustausch zwischen *Trifolium repens* und *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* während des Nodulationsprozesses. Die von der Wurzel exsudierten Flavonoide veranlassen die Expression der rhizobialen Nodulationsgene. Die Regulation dieser Gene wird durch das transkriptionelle Regulatorprotein NodD initiiert. Nach erfolgreicher Transkription erfolgt die Produktion und Sekretion der Nod-Faktoren. Hierbei sind die gemeinsamen *nod*-Gene (*nodA*, *B*, *C*) für die Synthese der Grundstruktur verantwortlich, während die spezifischen (*nodE*, *F*, *L*, *X*, *R*) die wirtsspezifischen Modifikationen der Basisstruktur bewirken (modifiziert nach BROUGHTON 2003). 17
- Abb. 5: Schematischer Ablauf der rep-PCR DNA Fingerprinting-Methode nach DE BRUIJN (Quelle: <http://www.msu.edu/user/debruijn/>) 32
- Abb. 6: Darstellung der Beziehung isolierter *R. l. bv. trifolii*-Stämme aus dem Swiss FACE. Nach Auswertung der rep-PCR-DNA Fingerprints mittels Hauptkomponentenanalyse können die Isolate in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die schwarzen (●) und weißen (○) Punkte repräsentieren einzelne isolierte Stämme von Weißkleeplätzen, die unter ambienten (350 ppm) und erhöhten CO₂-Konzentrationen (600 ppm) kultiviert wurden. 53
- Abb. 7: Spross- und Wurzeltrockenmasse von steril kultivierten *T. repens*-Pflanzen in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration und der N-Versorgung. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 15$, $P < 0,05$)..... 55
- Abb. 8: Prozentuale C- und N-Konzentration (bezogen auf die Trockenmasse) in Spross und Wurzel von 19 Tage alten *T. repens*-Pflanzen in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration und der N-Versorgung. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 15$, $P < 0,05$)..... 58
- Abb. 9: Chromatogramm eines Standards mit 7,4'- Dihydroxyflavon, 4-Hydroxy-7-Methoxyflavon, Umbelliferon und Formononetin. 60

-
- Abb. 10: Chromatogramm einer steril gewonnenen Exsudatprobe (800 ppm CO₂ und +N). Neben Umbelliferon und 7,4'-Dihydroxyflavon (7,4'-DHF) konnten die unbekanntes Fraktionen A, B, C, D und E detektiert werden. 60
- Abb. 11: Wellenlängenscan (200-400 nm) zur Bestimmung der phenolischen Standardsubstanzen. 62
- Abb. 12: Wellenlängenscan (200-400 nm) zur Bestimmung der phenolischen Verbindungen in den Wurzelexsudaten von *T. repens*. 62
- Abb. 13: Abgaberate von Umbelliferon in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 3, P < 0,05$). 63
- Abb. 14: Abgaberate von 7,4'-Dihydroxyflavon (7,4'-DHF) in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 3, P < 0,05$). 65
- Abb. 15: Abgaberate von Umbelliferon (links) und 7,4'-Dihydroxyflavon (rechts) relativ zur Wurzelfrischmasse von 19 Tage alten Weißkleeplanzen in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration und der N-Versorgung. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 3, P < 0,05$). 66
- Abb. 16: Abgaberate der unbekanntes, phenolischen Fraktion A in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 3, P < 0,05$). 67
- Abb. 17: Abgaberate der unbekanntes, phenolischen Fraktion B in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 3, P < 0,05$). 68
- Abb. 18: Abgaberate der unbekanntes, phenolischen Fraktion C in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 3, P < 0,05$). 69

-
- Abb. 19: Abgaberate der unbekannt, phenolischen Fraktion D in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 3, P < 0,05$)..... 70
- Abb. 20: Abgaberate der unbekannt, phenolischen Fraktion E in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 3, P < 0,05$)..... 71
- Abb. 21: Massenspektrum des synthetischen 7,4'-Dihydroxyflavone-Standards. 72
- Abb. 22: Massenspektrum der aus den Wurzelexsudaten isolierten 7,4'-Dihydroxyflavon-Fraktion 73
- Abb. 23: Massenspektrum der aus Wurzelexsudaten isolierten Fraktion C. *Oben:* bei 256 nm. *Unten:* bei 300 nm. 73
- Abb. 24: Wellenlängenscan (200-400 nm) ausgewählter synthetischer Standardsubstanzen zur Identifizierung der Fraktion C. 75
- Abb. 25: Spross- und Wurzel-Trockenmasse von nicht-steril kultivierten *T. repens*-Pflanzen in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 5, P < 0,05$)..... 79
- Abb. 26: Prozentuale C-Konzentration (bezogen auf die Trockenmasse) in Spross und Wurzel von *T. repens*-Pflanzen in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 5, P < 0,05$)..... 82
- Abb. 27: Prozentuale N-Konzentration (bezogen auf die Trockenmasse) in Spross und Wurzel von *T. repens*-Pflanzen in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 5, P < 0,05$)..... 84
- Abb. 28: Chromatogramm einer nicht-steril gewonnenen Exsudatprobe (800 ppm CO₂ und +N) von 28 Tage alten Weißkleepflanzen. Zusätzlich wurde hier Umbelliferon und die unbekannt Fraktion 2 detektiert. 87

-
- Abb. 29: Chromatogramm einer nicht-steril gewonnenen Exsudatprobe (800 ppm CO₂ und -N) von 24 Tage alten Weißkleepflanzen. Neben 7,4'-Dihydroxyflavon (7,4'-DHF) konnten die unbekanntes Fraktionen 3 und 4, sowie die Fraktionen 5 und 6 nachgewiesen werden..... 87
- Abb. 30: Wellenlängenscan (200-400 nm) zur Bestimmung der phenolischen Verbindungen in nicht-steril gewonnenen Wurzelexsudaten von Weißklee..... 89
- Abb. 31: Wellenlängenscan (200-400 nm) zur Bestimmung der weiteren phenolischen Verbindungen in nicht-steril gewonnenen Wurzelexsudaten von Weißklee..... 89
- Abb. 32: Abgaberate von 7,4'-Dihydroxyflavon relativ zur Wurzelfrischmasse in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 5, P < 0,05$)..... 90
- Abb. 33: Abgaberate der unbekanntes Fraktion 2 in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 5, P < 0,05$)..... 91
- Abb. 34: Abgaberate der unbekanntes Fraktion 4 in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 5, P < 0,05$)..... 92
- Abb. 35: Abgaberate der unbekanntes Fraktion 5 in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 5, P < 0,05$)..... 93
- Abb. 36: Abgaberate der unbekanntes Fraktion 6 in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 5, P < 0,05$)..... 94
- Abb. 37: Massenspektrum der aus Wurzelexsudaten isolierten Fraktion 2..... 96
- Abb. 38: Massenspektrum der aus Wurzelexsudaten isolierten Fraktion 4..... 96

Bilderverzeichnis

- Bild 1: Das Swiss FACE der ETH Zürich in Eschikon. Auf dem Bild ist einer der sechs CO₂-Begasungsringe mit innen liegenden Versuchsfeldern mit *Trifolium repens* und *Lolium perenne* in Monokultur bzw. Mischkultur zu sehen (Foto: M. Schneider)..... 8
- Bild 2: Repräsentatives Wachstum von *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*, kultiviert auf Trypton-Yeast-Agar, nach Isolation aus Wurzelknöllchen von *Trifolium repens*. 27
- Bild 3: Keimlinge von *Trifolium repens* (2 Tage nach der Aussaat) in Schrägagarröhrchen mit N-freiem Medium. 29
- Bild 4: *Links*: 18 Tage alte Weißkleeplanzen auf Nährlösung in einer Magenta Box. *Rechts*: Deckel einer Magenta Box mit Membran, die einen keimfreien Gasaustausch ermöglicht. 33
- Bild 5: Sterile Anzucht von *T. repens* in Magenta Boxen in einer Klimakammer. Zur besseren Durchlüftung der Nährlösung wurden die Gefäße auf einem Schüttler platziert und bei 75 rpm geschüttelt. 34
- Bild 6: 21 Tage alte Weißkleeplanzen in nicht-steriler hydroponischer Kultur.. 39
- Bild 7: Gewinnung von Wurzelexsudaten von *T. repens* (24 Tage alt). Vorne: Sammlung von Wurzelexsudaten mehrerer Planzen. Hinten: Sammlung von Exsudaten von Einzelpflanzen. 40
- Bild 8: Weißkleeplanzen mit Wurzelknöllchen nach 2,5 Wochen Wachstum nach der Inokulation. Vergrößert dargestellt sind die durch Leghämoglobin rosa gefärbten Knöllchen..... 50
- Bild 9: Chlorotische Weißkleeplanze ohne Knöllchen nach 2,5 Wochen Wachstum auf N-freiem Schrägagar..... 51
- Bild 10: Ausgewählte rep-PCR-Fingerprints der genomischen DNA von *R. l. bv. trifolii*-Isolaten. Stämme in Bild A (u.a. C1-55) wurden aus Knöllchen von Weißkleeplanzen isoliert, die unter ambienten CO₂-Konzentration (350 ppm) wuchsen. Stämme im Bild B (u.a. F1-1) stammen aus Knöllchen von Planzen, die unter erhöhter CO₂-Konzentration (600 ppm) kultiviert wurden. Als interner Standard diente der *R. l. bv. trifolii*-Stamm DSM 30141. 52

-
- Bild 11: Einfluss von erhöhter atmosphärischer CO₂-Konzentration und N-Versorgung auf das Wachstum von 19 Tage alten Weißkleeplanzen. *Links:* Weißkleeplanzen, kultiviert unter 400 und 800 ppm CO₂ bei ausreichender N-Versorgung. *Rechts:* Weißkleeplanzen mit unterschiedlicher N-Versorgung, kultiviert bei ambienter CO₂-Konzentration..... 54
- Bild 12: Einfluss von erhöhten atmosphärischen CO₂-Konzentrationen auf das Wachstum von 24 Tage alten Weißkleeplanzen. *Links:* Weißkleeplanzen, die bei 400 ppm CO₂ kultiviert wurden. *Rechts:* Pflanzen, die bei 800 ppm CO₂ aufwuchsen..... 76
- Bild 13: Einfluss der N-Versorgung auf das Wachstum von 30 Tage alten Weißkleeplanzen. *Links:* Weißkleeplanzen mit N-Düngung [2mM Ca(NO₃)₂]. *Rechts:* Pflanzen 6 Tage ohne N-Düngung..... 77

1 EINLEITUNG

Die Fülle an Publikationen, die den Anstieg des atmosphärischen Kohlendioxid (CO₂) und seine Auswirkungen auf terrestrische Ökosysteme zum Inhalt haben, lassen die enorme Bedeutung dieser Thematik erkennen (KIMBALL et al. 1993; KÖRNER 2000, 2006). Die internationalen Klimaschutzbemühungen, wie die Gründung des „Intergovernmental Panel on Climate Change“ (IPCC, „Zwischenstaatlicher Ausschuss für Klimaänderungen“) im Jahre 1988 und die Verabschiedung des Kyoto-Protokolls 1997 zeigen, dass der Klimawandel und seine Folgen von globalem Interesse und nicht das Problem eines einzelnen Staates sind. Die in diesem Zusammenhang entwickelten Klimamodelle sind ein wichtiges Werkzeug, um die Reaktionen der Biosphäre auf steigende CO₂-Konzentrationen vorherzusagen. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurde der Einfluss von erhöhten CO₂-Konzentrationen auf die Pflanzenwelt erkannt und fortan in vielen Studien genauer untersucht. Im Mittelpunkt der Forschungen standen und stehen vor allem das Wirken von CO₂ auf das Pflanzenwachstum, die physiologischen Vorgänge, aber auch auf die Artenzusammensetzung und interspezifische Konkurrenz innerhalb von Ökosystemen. Um den Einfluss der steigenden atmosphärischen CO₂-Konzentration auf die Biosphäre besser zu verstehen, wurden vor allem in den 1990er Jahren zahlreiche Freiland-CO₂-Begasungsexperimente (u.a. das Swiss FACE, s.u.) mit den unterschiedlichsten Arten als Modellpflanzen durchgeführt. Dabei interessierte neben der direkten Wirkung von CO₂ auf die Pflanze, zunehmend auch der indirekte CO₂-Einfluss auf Organismen der Rhizosphäre und auf spezielle Pflanzen-Mikroorganismen-Symbiosen, wie die Interaktion zwischen Leguminosen und Rhizobien. In der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit sollte der langzeitliche Einfluss erhöhter CO₂-Konzentrationen auf die Symbiose von *Trifolium repens* (*T. repens*) und *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* (*R. l. bv. trifolii*) im Feld- und Klimakammerversuch untersucht werden. Im Vordergrund der Untersuchungen standen hierbei die Identifikation genetischer Veränderungen und physiologischer Prozesse sowie die hieraus gewonnenen Erkenntnisse im Kontext der CO₂-Problematik zu diskutieren.

1.1 Die CO₂-Problematik

Schon in den 1930er Jahren diskutierten Klimaforscher über einen möglichen Zusammenhang der damals beobachteten Klimaerwärmung und dem Anstieg der CO₂-Konzentration mit zunehmender Industrialisierung. Erst seit den späten 50er Jahren konnte diese Vermutung anhand kontinuierlichen Konzentrationsmessungen von Kohlendioxid in der Atmosphäre am Mauna Loa (Hawai) belegt werden (KEELING & WHORF 2005). Zusätzlich lieferten Untersuchungen von Eisbohrkernen aus der Antarktis Informationen über die längerfristige Entwicklung der atmosphärischen CO₂-Konzentration.

Seit Beginn der Industriellen Revolution hat die CO₂-Konzentration der Atmosphäre um ca. 35% von 280 ppm auf gegenwärtig 380 ppm (Abb. 1) zugenommen (RAHMSTORF & SCHELLNHUBER 2006; KÖRNER 2006). Aktuelle Eisbohrkernuntersuchungen der Universität Bern zeigen, dass dies der höchste Wert seit mindestens 650.000 Jahren ist (SIEGENTHALER et al. 2005). Der Anstieg des atmosphärischen CO₂ ist - wie Isotopenanalysen bewiesen haben - zu 70 bis 90% auf die Verbrennung fossiler Rohstoffe (Kohle, Öl, Gas) und zu 10 bis 30% auf Veränderungen der Bodennutzung, insbesondere der Abholzung von Wäldern, zurückzuführen und folglich anthropogenen Ursprungs (IPCC, 2001). Daneben können Vulkanausbrüche als natürliche Ursache zur Anreicherung von CO₂ in die Atmosphäre beitragen. Dabei gelangt nur etwa die Hälfte (54%) des CO₂ in die Atmosphäre, der Rest wird von den Ozeanen und der Biosphäre aufgenommen, die somit als CO₂-Senke fungieren. Kohlendioxid, als wichtigstes klimawirksames Gas, hat mit 60% den größten Anteil am anthropogenen Treibhauseffekt (IPCC, 2001). Die restlichen 40% werden anderen Treibhausgasen, wie Methan, Distickstoffoxyd, Fluorkohlenwasserstoffe, Schwefelhexafluorid sowie fluorierten Chlorkohlenwasserstoffen, zugeschrieben. Infolge der gestiegenen Treibhausgaskonzentrationen in der Atmosphäre hat seit Ende des 19. Jahrhunderts auch die globale Durchschnittstemperatur um $0,6 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ zugenommen (IPCC, 2001).

Das IPCC prognostiziert in seinem dritten Zustandsbericht zum globalen Klimawandel von 2001, dass die CO₂-Konzentration – je nach Szenarium¹- bis

¹ Für den IPCC-Bericht wurden sechs verschiedene Zukunftsszenarien für den Prognosezeitraum von 2001 bis 2100 entwickelt, die auf unterschiedlichen Annahmen über den demographischen, gesellschaftlichen, wirtschaftlichen und technologischen Wandel basieren. Detaillierte Angaben finden sich im IPCC-Bericht „Climate Change 2001- The Scientific Basis“ von 2001 auf S. 18.

zum Jahre 2100 auf 540 bis 970 ppm (d.h. 90 bis 250% über der Konzentration von 280 ppm in 1750) steigen wird (Abb. 1). Unter der Annahme, dass der Klimawandel auch die Kohlenstoffaufnahme der Ozeane und der Biosphäre (Rückkopplungseffekt des Kohlenstoffkreislaufes) beeinflusst, erhöhen sich die Werte für den gleichen Zeitraum auf 490 bis 1260 ppm (IPCC, 2001). Für die globale Mitteltemperatur wird zudem ein Anstieg von 1,4 bis 5,8°C für den Zeitraum 2001 bis 2100 erwartet.

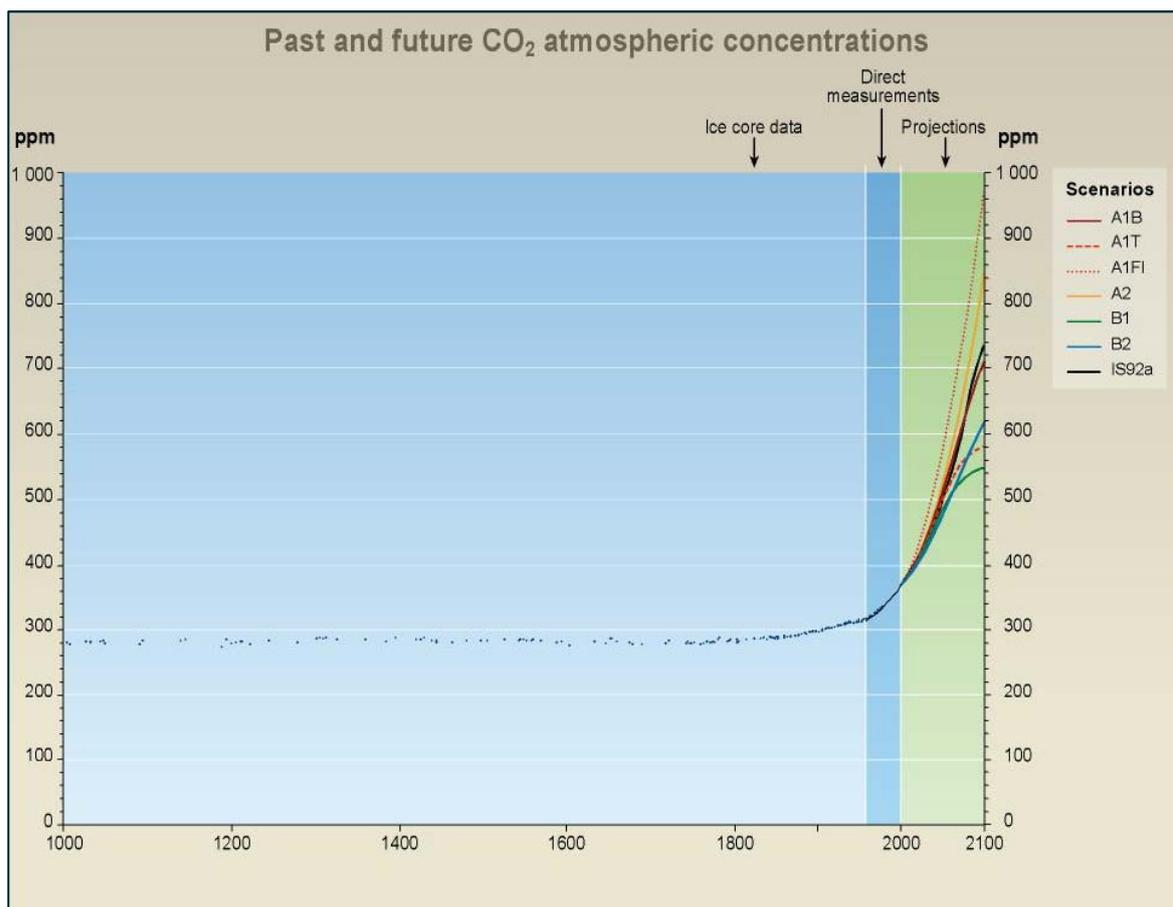


Abb. 1: Die Kurve zeigt die atmosphärische CO₂-Konzentration vom Jahr 1000 bis zum Jahr 2000. Die Daten stammen aus Untersuchungen von Eisbohrkernen und aus direkten Messungen der letzten Jahrzehnte. Die Projektionen der CO₂-Konzentration von 2000 bis 2100 basieren auf den sechs illustrierten SRES-Szenarien des dritten IPCC-Berichts und – zum Vergleich – IS92a aus dem zweiten IPCC Bericht (Quelle: IPCC, 2001).

Neuere Studien von COX et al. (2000) und SCHEFFER et al. (2006) zeigen allerdings, dass diese Prognosen mit großer Wahrscheinlichkeit zu niedrig angesetzt wurden, da dem Rückkopplungseffekt des Kohlenstoffkreislaufs eine größere Bedeutung zukommt, als bisher angenommen wurde. So rechnen die Wissenschaftler damit, dass die globale Mitteltemperatur um 15 bis 78% nach oben korrigiert werden muss und bis zum Ende diesen Jahrhunderts eine Erwärmung von 6,6 bis 7°C möglich wäre (SCHEFFER et al. 2006). Als Folge der stärkeren Erwärmung kommt es durch die positive Rückkopplung zu einer verminderten CO₂-Aufnahme der Ozeane, zudem erhöht sich der Kohlendioxid-ausstoß durch eine intensivere Zersetzung organischen Materials in der Biosphäre. Dementsprechend verlieren die Ozeane und die Biosphäre zukünftig ihre Bedeutung als CO₂-Senke und fungieren vermehrt als CO₂-Quelle.

1.2 Allgemeiner CO₂-Einfluss auf die Pflanzenwelt

Erhöhte CO₂-Konzentrationen beeinflussen nicht nur nachhaltig das globale Klima, sondern auch pflanzliche Ökosysteme in unterschiedlichem Ausmaß. Pflanzen, als photoautotrophe Organismen, benötigen atmosphärisches CO₂, um mittels Lichtenergie in der Photosynthese Kohlenhydrate zu bilden (Kohlenstoffassimilation) und somit letztendlich Biomasse aufzubauen:



Die CO₂-Assimilation (Carboxylierung) und anschließende Reduktion des fixierten Kohlenstoffs in die energetische Stufe der Kohlenhydrate erfolgt in der Dunkelreaktion der Photosynthese, dem Calvin-Zyklus. Dabei wird die Carboxylierung durch das Enzym *Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase* (*RubP-Carboxylase*) katalysiert. Da die *RubP-Carboxylase* die Eigenschaft besitzt, nicht nur CO₂, sondern auch Sauerstoff (O₂) als Substrat zu akzeptieren, womit die Photorespiration eingeleitet wird, wird sie auch als *Ribulose-bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase* (*RubisCO*) bezeichnet. Beide Substrate konkurrieren um das aktive Zentrum des Enzyms. Die großen Konzentrationsunterschiede von O₂ (21 Vol.%) und CO₂ (0,038 Vol.%) in der heutigen Atmosphäre bewirken, dass eine effektive Carboxylierung mittels der *RubisCO* nur erfolgen kann, weil die Affinität des Enzyms gegenüber CO₂ beträchtlich höher ist als gegenüber O₂ (Verhältnis der

Intensitäten von Oxygenase- und Carboxylasereaktion: 0,4:1; SCHOPFER & BRENNICKE 2006).

Bereits 1804 erkannte DE SAUSSURE, dass eine erhöhte CO₂-Konzentration das Pflanzenwachstum positiv beeinflusst. Erhöhtes CO₂ steigert im Allgemeinen die Photosyntheseleistung der Pflanzen und führt folglich zu einer erhöhten Biomasseproduktion („CO₂-Düngeeffekt“; KIMBALL 1983; KIMBALL et al. 1993; POORTER 1993; AINSWORTH & LONG 2005). Der CO₂-Effekt wird zusätzlich durch den Nährstoff- und Wasserhaushalt des Bodens, von Wetter- und Klimafaktoren, aber auch durch die Pflanzenart selbst und die Zusammensetzung des Ökosystems beeinflusst. KIMBALL (1983) und CURE & ACOCK (1986) prognostizierten, dass bei einer Verdoppelung der atmosphärischen CO₂-Konzentration das Pflanzenwachstum und der Ertrag von Kulturpflanzen um etwa 33% bzw. 41% zunehmen werden. Bewirtschaftetes Grasland zeigt vermutlich nur eine durchschnittliche Wachstumsstimulation von 16% (MOONEY et al. 1999).

Pflanzen variieren im Ausmaß ihrer CO₂-Antwort: so weisen C₄-Pflanzen aufgrund ihres dem Calvin-Zyklus vorgeschalteten effektiven Mechanismus der CO₂-Vorfixierung unter ambienter CO₂-Konzentration eine höhere CO₂-Assimilationsrate und daher stärkeres Wachstum und höhere Erträge auf als C₃-Pflanzen. Bei einer Verdoppelung des atmosphärischen CO₂ nimmt die Photosyntheserate der C₃-Arten um 66% zu, während bei C₄-Arten nur ein leichter Anstieg von etwa 4% zu beobachten ist (KIMBALL et al. 1993). Somit ist zu erwarten, dass in einer CO₂-angereicherten Umwelt die Erträge von C₃-Pflanzen (z.B. Weizen) verglichen mit denen von C₄-Pflanzen (z.B. Mais) ansteigen werden.

In der äußeren Blatt-Atmosphäre führen steigende CO₂-Konzentrationen dazu, dass die Stomata partiell oder früher geschlossen werden können. Die stomatäre Leitfähigkeit wird reduziert, was eine verminderte Transpiration und infolgedessen eine gesteigerte Wassernutzungseffizienz zur Folge hat (z.B. bei Hafer, Ackersenf und Weizen zwischen 40-100%; POLICY et al. 1993). Infolge der erhöhten Wassernutzungseffizienz zeigen solche Pflanzen auch bei Wassermangel noch eine Wachstumsstimulation bei zunehmender CO₂-Konzentration. Darüber hinaus ist auch die Nährstoffversorgung der Pflanzen für deren CO₂-Reaktion von Bedeutung: so wird die Wachstumsstimulierung unter Stickstoffmangel (oder anderen Nährstoffen) geringer ausfallen, als dies bei ausreichendem N-Angebot der Fall ist (CONROY et al. 1988; MARSCHNER 1995).

Eine weitere häufige Beobachtung, die mit der CO₂-Erhöhung einhergeht, ist ein Anstieg des Wurzel/Spross-Verhältnisses. ROGERS et al. (1996) evaluierten 264

Studien im Hinblick auf Veränderungen im Wurzel/Spross-Verhältnis unter erhöhtem CO₂ und fanden in 60% der Studien einen Anstieg und in 37,5% der übrigen Studien einen Rückgang. Unterschiede in der Verteilung wurden hauptsächlich der Pflanzenart und der Verfügbarkeit von Nährstoffen zugeschrieben.

Durch die Erhöhung der CO₂-Konzentrationen wird auch die Nettoaufnahme von CO₂ gesteigert. Physiologisch lässt sich diese Steigerung wie folgt erklären: die *RubisCO* ist bei derzeitig vorherrschender CO₂-Konzentration nicht gesättigt (DRAKE & GONZÁLEZ-MELER 1997; KÖRNER 1999; STRASBURGER et al. 2002) und steigende Konzentrationen des Treibhausgases hemmen zunehmend die Oxygenase-Aktivität des Enzyms (LONG & DRAKE 1992). Die spezifische Affinität der *RubisCO* ist allerdings temperaturabhängig. Bei steigenden Temperaturen, wie sie im Zusammenhang mit der globalen Klimaänderung prognostiziert werden, sinkt die Affinität der *RubisCO* für CO₂ und zugleich nimmt die Löslichkeit von CO₂ stärker ab als die von O₂ (BROOKS & FARQUHAR 1985; LONG & DRAKE 1992). Diese Faktoren begünstigen die Oxygenierung und somit die Photorespiration bei steigenden Temperaturen.

Als längerfristige Reaktion auf erhöhtes CO₂ wurde in den meisten Fällen eine Akklimatisierung der Photosynthese beobachtet (WEBBER et al. 1994; DRAKE & GONZÁLEZ-MELER 1997). Diese zeichnet sich aus durch:

- höhere Gewebe-C-Konzentration und größere C-Exporte (Wurzelexsudation)
- sinkende Protein (N)-Konzentration sowie geringere Konzentration und Aktivität der *RubisCO*
- eine Reduktion der Photosynthesekapazität

Es wird angenommen, dass nicht alle Kohlenhydrate, die die Photosynthese vermehrt unter hohen CO₂-Bedingungen bereitstellt, von der Pflanze genutzt werden können; deshalb wird die Photosyntheseaktivität in einem Feedback-Mechanismus reduziert. Zudem wird der Export bzw. die Exsudation von löslichen Kohlenhydraten und stickstoffhaltigen Verbindungen in die Rhizosphäre gesteigert (NORBY et al. 1987; VAN VEEN et al. 1991; JONGEN et al. 1995). Auch wird bei erhöhter CO₂-Konzentration weniger *RubisCO* benötigt (u.a. wegen der verminderten Photorespiration) und die Aktivität des Enzyms sinkt, was somit auch eine verminderte Photosynthesekapazität zur Folge hat. Studien belegen eine Reduktion der *RubisCO* um 15% und eine Verringerung der Enzymaktivität um 24% (DRAKE & GONZÁLEZ-MELER 1997). Da die *RubisCO* zu 25% aus Stickstoff (N) besteht, ist eine Verringerung des Bedarfs an *RubisCO* der Hauptgrund für die geringere N-Konzentration des Blattgewebes (KÖRNER 2000).

In Verbindung mit höheren C-Konzentrationen konnte deshalb eine Vergrößerung des C/N-Verhältnisses (v.a. in den Blättern) beobachtet werden sowie eine höhere N-Nutzungseffizienz (COÛTEAUX et al. 1991, GORISSEN et al. 1995; STITT & KRAPP 1999).

Steigende CO₂-Konzentrationen beeinflussen auch die Diversität und die Artenzusammensetzung von Ökosystemen. Treibende Kraft für mögliche Veränderungen in Pflanzengemeinschaften ist die unterschiedliche Förderung der Arten unter erhöhtem CO₂, die zu Modifikationen im Konkurrenzgefüge führen kann (BAZZAZ 1990; PATTERSON & FLINT 1990; DÍAZ 1995; REYNOLDS 1996; HÄTTENSCHWILER & KÖRNER 2003). In Experimenten mit Modellpflanzengemeinschaften, die die unterschiedliche CO₂-Reaktion von C₃- und C₄-Pflanzen untersuchten, zeigten C₃-Pflanzen in der Regel einen deutlichen Konkurrenzvorteil unter erhöhter CO₂-Konzentration (REYNOLDS 1996). Auch in CO₂-Freilandexperimenten mit Leguminosen und Gräsern als Untersuchungsobjekten konnte in der Regel eine Konkurrenzverschiebung zugunsten der Leguminosen beobachtet werden (SCHENK et al. 1997; HEBEISEN et al. 1997a).

1.3 Das Swiss FACE: Einfluss von erhöhtem atmosphärischen CO₂ auf ein Modellgraslandökosystem

Seit den 1960er Jahren lieferten zahlreiche Experimente wichtige Erkenntnisse, wie Pflanzen auf erhöhtes CO₂ reagieren (s.o.). Allerdings fehlten Untersuchungen, die auch interspezifische Reaktionen pflanzlicher Ökosysteme und Bodenprozesse unter steigenden CO₂-Konzentrationen berücksichtigten. Das Freiland-CO₂-Experiment „Swiss FACE“ (Free-Air-Carbon dioxide-Enrichment; Bild 1) untersuchte im schweizerischen Eschikon in den Jahren 1993 bis 2002 den Einfluss von erhöhtem atmosphärischen CO₂ auf ein Graslandökosystem mit *Trifolium repens* (Weißklee) und *Lolium perenne* (Deutsches Weidelgras) als Modellpflanzen (Kapitel 2.1).

1.3.1 Anpassung von *Trifolium repens* an höhere CO₂-Konzentrationen

Im Swiss FACE konnte für *T. repens* eine Steigerung des Pflanzenwachstums unter erhöhter CO₂-Konzentration beobachtet werden. In den ersten zwei Jahren des CO₂-Experiments kam es in Monokulturbeständen von Weißklee zu einer durchschnittlichen Ertragssteigerung von 20% (unabhängig von der Schnitt



Bild 1: Das Swiss FACE der ETH Zürich in Eschikon. Auf dem Bild ist einer der sechs CO₂-Begasungsringe mit innen liegenden Versuchsfeldern mit *Trifolium repens* und *Lolium perenne* in Monokultur bzw. Mischkultur zu sehen (Foto: M. Schneider).

häufigkeit und der Stickstoffdüngung), während im dritten Jahr nur noch 11% erreicht wurden (HEBEISEN et al. 1997a). Spätere Untersuchungen im Swiss FACE belegen sogar einen Anstieg in der Trockensubstanz von Weißklee von 80% bzw. 100% (VAN KESSEL et al. 2000; HARTWIG et al. 2002). In mehreren Topfexperimenten wurde ebenfalls eine CO₂-induzierte Wachstumsstimulation von Weißkleepflanzen nachgewiesen (SCHEIDEGGER & NÖSBERGER 1984; OVERDIECK & REINING 1986; NIJS et al. 1988; RYLE et al. 1992; ZANETTI et al. 1998). In Mischkultur mit *Lolium perenne* (*L. perenne*) wurden in den ersten drei Jahren des Swiss FACE ein Ertragszuwachs von 64% für Weißklee erfasst (HEBEISEN et al. 1997a), so dass der Anteil von *T. repens* in den Mischbeständen, insbesondere unter Stickstoffmangel (N-Mangel), deutlich zunahm. Aufgrund der Fähigkeit des Weißklee bei geringer N-Verfügbarkeit auf die symbiotische N₂-Fixierung als zusätzliche N-Quelle zurückzugreifen, ist das Wachstum und somit die CO₂-Antwort nicht N-limitiert, was eine erhöhte Konkurrenzfähigkeit der Leguminose gegenüber Nicht-Leguminosen wie

L. perenne erklären kann (ZANETTI et al. 1996, ZANETTI & HARTWIG 1997; HEBEISEN et al. 1997a).

Des Weiteren wurde – verglichen mit *L. perenne* – nur ein geringer Einfluss von CO₂ auf das Wurzelwachstum von *T. repens* beobachtet (HEBEISEN 1997a,b): die Wurzelmasse nahm in den ersten beiden Jahren durchschnittlich in allen Behandlungsvarianten um 27% (1993) bzw. 40% (1994) zu, im dritten Jahr hingegen um 26% (1995) ab. Die Zunahme der Wurzelmasse unter erhöhten CO₂-Konzentrationen steht im gleichen Verhältnis wie die Zunahme des gesamten Ertrags, so dass sich kein verändertes Wurzel-/Sprossverhältnis feststellen ließ (HEBEISEN et al. 1997a). In Klimakammerexperimenten führte erhöhtes CO₂ und N-Mangel zudem zu einer vermehrten Knöllchenbildung und zu einem höheren Knöllchentrockengewicht bei Weißklee (ZANETTI et al. 1998). Dies konnte auch für andere Leguminosen wie *Phaseolus vulgaris* dokumentiert werden (HAASE et al. 2007). Der CO₂-induzierte Anstieg in der Knöllchenbildung konnte einerseits auf eine höhere Bereitstellung an Assimilaten infolge gesteigerter Photosyntheseleistung zurückgeführt werden, andererseits auf eine möglicherweise größere Infektionsoberfläche der Wurzel aufgrund höherer Wurzelbiomasse.

1.3.2 Steigerung der symbiotischen Stickstofffixierung als Folge erhöhter CO₂-Konzentration

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse stehen in engem Zusammenhang mit den Beobachtungen von ZANETTI et al. (1996), die in den ersten drei Jahren des Swiss FACE eine gesteigerte symbiotische N₂-Fixierung und folglich einen gesteigerten N-Eintrag in das Ökosystem unter erhöhter CO₂-Konzentration nachweisen konnten. Auch CO₂-Experimente aus den 1970er Jahren bestätigten unter gesteigerter CO₂-Konzentration eine Zunahme der N₂-Fixierung (HARDY & HAVELKA 1976; MASTERSON & SHERWOOD 1978). Der Gesamt-N-Ertrag von *T. repens* im Swiss FACE nahm kontinuierlich unter erhöhtem CO₂ zu und der prozentuale symbiotisch fixierte Stickstoff (%N_{sym}) in *T. repens* stieg signifikant in beiden N-Düngungsvarianten und Wiesennutzungstypen an. Der zusätzlich assimilierte Stickstoff kam ausschließlich aus der symbiotischen N₂-Fixierung. Auch in der Mischkultur konnte ein erhöhter Eintrag an symbiotisch fixiertem Stickstoff (+7,8, 8,2 und 6,2 g m⁻² a⁻¹ jeweils in 1993, 1994 und 1995) in das Ökosystem nachgewiesen werden (ZANETTI et al. 1996). Der %N_{sym} war in der Mischkultur (aufgrund des höheren Anteils an *T. repens*) signifikant höher als bei *T. repens*-Pflanzen in Monokultur. Zusätzlich beeinflusste die N-Düngung das

Ausmaß der symbiotischen N_2 -Fixierung aufgrund einer größeren Stickstoff-limitierung (Konkurrenz mit *L. perenne*): bei hoher N-Düngung wurde eine signifikante Abnahme des %N_{sym} in allen drei Untersuchungsjahren beobachtet. Eine ausreichende N-Versorgung bewirkte, dass Pflanzen die Aufnahme von mineralischem N bevorzugten, wahrscheinlich weil dies weniger energieaufwendig ist als die symbiotische N_2 -Fixierung. Die Zunahme des %N_{sym} unter erhöhter CO_2 -Konzentration war das Ergebnis einer reduzierten Boden-N-Verfügbarkeit, die durch den CO_2 -induzierten gesteigerten Bedarf an Stickstoff der Pflanzen bzw. gesteigerten N-Umsatzes des Ökosystems hervorgerufen wurde (RICE et al. 1994; ZANETTI et al. 1996, 1997; ZANETTI & HARTWIG 1997). Der vermehrte N-Eintrag durch die symbiotische N_2 -Fixierung in das Ökosystem scheint somit das zu Beginn des Swiss FACE entstandene C/N-Ungleichgewicht allmählich ausgeglichen zu haben (HARTWIG et al. 2000, LÜSCHER et al., 2000 RICHTER 2003). In den folgenden Jahren des Swiss FACE wurde der gesteigerte N-Eintrag unter erhöhtem CO_2 mit der kombinierten Assimilation von N aus dem Boden sowie der symbiotischen N_2 -Fixierung erklärt, wobei der %N_{sym} bis zum Ende des CO_2 -Experiments - vor allem unter ausreichender N-Versorgung – höchstwahrscheinlich aufgrund einer höheren N-Verfügbarkeit des Bodens (s.o.) kontinuierlich abnahm (RICHTER 2003). Auch WEST et al. (2005) konnten in dem Freiland- CO_2 -Experiment BioCON (Cedar Creek, Minnesota, USA) eine verminderte N_2 -Fixierung infolge besserer Boden-N-Verfügbarkeit feststellen.

1.3.3 Indirekte Beeinflussung der Mikroorganismen in der Rhizosphäre durch erhöhtes CO_2

Die Wirkung von erhöhten atmosphärischen CO_2 -Konzentrationen ist nicht allein auf das Pflanzenwachstum beschränkt. Auch das mikrobielle Bodenleben und der Boden als solcher stehen mit großer Wahrscheinlichkeit unter CO_2 -Einfluss (ROGERS et al. 1994; PATERSON et al. 1997; SADOWSKY & SCHORTEMAYER 1997). Da die CO_2 -Konzentration im Boden 10- bis 50-fach höher ist als in der Atmosphäre (LAMBORG et al. 1983), ist ein direkter Einfluss von CO_2 auf mikrobielle Prozesse im Boden unwahrscheinlich. Vielmehr scheint CO_2 indirekt die Mikroorganismen durch Steigerung der Wurzelbiomasse, der Rhizodeposition bzw. Exsudation, aber auch durch die veränderte chemische Komposition der Wurzelexsudate und des pflanzlichen Gewebes zu beeinflussen (BAZZAZ 1990; COTRUFO et al. 1994; ROGERS et al. 1994; RATTRAY et al. 1995; SCHORTEMAYER et al. 1996, HARTWIG et al. 2002; DE GRAAFF et al.

2007). Im Swiss FACE konnten signifikante Veränderungen im Wachstum und in der Aktivität der Bodenmikroorganismen sowie Veränderungen in der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft unter erhöhter CO₂-Konzentration beobachtet werden. So stellten MARILLEY et al. (1999) eine deutliche Zunahme der *Pseudomonas*-Population in der Rhizosphäre von *L. perenne* unter erhöhtem atmosphärischen CO₂ fest, aber eine verminderte Dominanz in der Rhizosphäre von *T. repens*. Außerdem kam es in der Rhizosphäre von Weißklee zu einer Verdoppelung der Population von *R. l. bv. trifolii*, dem N₂-fixierenden Symbionten von *T. repens* (SCHOERTEMEYER et al. 1996). Die Rhizobien-Population in der Rhizosphäre von *L. perenne* zeigte hingegen keine Stimulation durch CO₂, was auf eine wirtsspezifische CO₂-Antwort schließen lässt. Darüber hinaus dokumentierten MONTEALEGRE et al. (2000) eine veränderte genetische Zusammensetzung innerhalb der Rhizobien-Population und eine veränderte Konkurrenzfähigkeit von *R. l. bv. trifolii* als Folge der erhöhten atmosphärischen CO₂-Konzentration. Molekularbiologische Untersuchungen zeigten, dass *R. l. bv. trifolii*-Stämme isoliert aus Wurzelknöllchen von Weißkleepflanzen, die unter erhöhter CO₂-Konzentration wuchsen, sich genetisch von den Rhizobien-Stämmen unterschieden, die aus Pflanzen isoliert wurden, die unter ambienter CO₂-Konzentration aufwuchsen. Zudem förderte die CO₂-Erhöhung bei einigen *R. l. bv. trifolii*-Stämmen die Konkurrenzfähigkeit in Bezug auf die Knöllchenbildung.

Als Ursache der beobachteten Veränderungen in der Populationsstruktur wurden qualitative und quantitative Veränderungen der Wurzelexsudate (einschließlich der Flavonoide) von *T. repens* vermutet (SCHOERTEMEYER et al. 1996; MARILLEY et al. 1999; MONTEALEGRE et al. 2000, 2002). Die gesteigerte symbiotische N₂-Fixierung und die vermehrte Knöllchenbildung unter erhöhter CO₂-Konzentration scheinen somit eine logische Folge der höheren Anzahl von *R. l. bv. trifolii* in der Weißklee-Rhizosphäre und der gesteigerten Konkurrenzfähigkeit der Rhizobien-Stämme zu sein.

1.4 Die Symbiose von *Trifolium repens* und *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*

Eine der bedeutendsten pflanzlichen Symbiosen ist die zur biologischen Stickstofffixierung befähigte symbiotische, mutualistische Interaktion zwischen Rhizobien (Mikrosymbiont) und den Leguminosen (Wirtspflanze bzw. Makrosymbiont). Die Ordnung der *Fabales* (*Leguminosae*) ist weltweit mit ihren drei Pflanzenfamilien *Mimosaceae*, *Caesalpinaceae* und *Fabaceae* eine der artenreichsten Pflanzengruppen. Die Vielfalt der Leguminosen zeigt sich darin, dass ihre Mitglieder sowohl Kräuter als auch Bäume umfassen und von der Arktis bis in die Tropen verbreitet sind.

Rhizobien sind gram-negative, stäbchenförmige Bodenbakterien, die den α -Proteobakterien zugeteilt und zur Familie der *Rhizobiaceae* gezählt werden. Sechs Gattungen werden unterschieden: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* und *Allorhizobium*. Das charakteristische Merkmal in der Rhizobien-Leguminosen Symbiose ist die Ausbildung von Wurzel- oder seltener Stengelknöllchen (z.B. *Sesbania rostrata*). Diese werden vom Makrosymbionten als symbiotische Organe gebildet und von dem Mikrosymbionten kolonisiert. Die zur N_2 -Fixierung befähigten *Rhizobien* stellen der Pflanze stickstoffhaltige Verbindungen zur Verfügung. Im Gegenzug liefert die Leguminose energiereiche Kohlenstoffverbindungen an den Mikrosymbionten. Die Leguminosen haben somit einen Konkurrenzvorteil gegenüber anderen Pflanzen, da es ihnen möglich ist, bei einer Unterversorgung an Stickstoff im Boden (NH_4^+ , NH_3^-), auf den hohen Anteil an molekularem Stickstoff (N_2) in der Erdatmosphäre (80%) zurückzugreifen. Hieraus resultiert die enorme landwirtschaftliche Bedeutung dieser Pflanzengruppe, zu der – neben bedeutenden Nutzpflanzen wie die Sojabohne (*Glycine max*), die Ackerbohne (*Vicia faba*) und die Erbse (*Pisum sativa*) – auch *T. repens* als wichtige Futterpflanze zählt.

1.4.1 Phenole als Signalmoleküle im Infektionsprozess

Die *Rhizobium*-Leguminosen-Interaktion ist sehr spezifisch und von einem chemischen Signalaustausch zwischen den beiden Symbiosepartnern begleitet (GÖTTFERT 1993; SCHULTZE 1994; VAN RHIJN & VANDERLEYDEN 1995; SCHULTZE & KONDOROSI 1998). Bereits vor dem physischen Kontakt beider Partner setzen die ersten chemischen Wechselwirkungen zwischen Makro- und

Mikrosymbiont ein. Hierbei kommt den Wurzelexsudaten eine bedeutende Rolle zu. Die pflanzlichen Exsudate bestehen aus hoch-molekularen (Mucilage, Polysaccharide, Proteine und Ektoenzyme) und aus nieder-molekularen Verbindungen, wie Zuckern, Aminosäuren, Carbonsäuren und Phenolen (NEUMANN & RÖMHELD 2001). Die Leguminosen geben über den subapikalen Teil ihrer Wurzeln wirtsspezifische Phenole in die Rhizosphäre ab, die als chemische Signalüberträger fungieren (Abb. 4).

Die Rhizobien reagieren zu Beginn der Rhizobien-Leguminosen-Interaktion zumeist positiv chemotroph auf Lockstoffe in den pflanzlichen Wurzelexsudaten und bewegen sich mittels ihrem peritrichen oder subpolaren Flagellum in Richtung der Leguminosenwurzeln (GAWORZEWSKA & CARLILE 1982; GULASH et al. 1984; BARBOUR et al. 1991). Die pflanzlichen Lockstoffe sind von unterschiedlicher chemischer Struktur und bewirken eine erste wirtsspezifische Selektion der Rhizobien-Stämme. Neben Aminosäuren und Zuckern können vor allem Phenolcarbonsäuren (z.B. in *Bradyrhizobium japonicum* Zimt- und Coumarinsäure; KAPE et al. 1992a) oder Flavonoide (z.B. in *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli* und *R. l.* bv. *trifolii* Apigenin und Luteolin; AGUILAR et al. 1988) eine chemotaktische Reaktion der Rhizobien bewirken. Die Chemotaxis ist nicht unbedingt notwendig für eine erfolgreiche Nodulation, aber von Bedeutung für eine höhere Konkurrenzfähigkeit der Rhizobien.

Im weiteren Verlauf des Interaktionsprozesses führen wirtsspezifische (Iso-) Flavonoide oder Betaine in dem kompatiblen *Rhizobium*-Stamm zur Aktivierung der Nodulationsgene (PETERS & VERMA 1990; PHILIPS 1992; JAIN & NAINAWATEE 2002; Abb. 4). REDMOND et al. (1986) dokumentierten Mitte der 1980er Jahren, dass 7,4'-Dihydroxyflavone (7,4'-DHF) als hydroxylierte Flavone die aktivste, nodulationsgen- (*nod*-Gen)-stimulierende Substanz in den Wurzelexsudaten von *T. repens* ist (Abb. 2). Neben dieser Substanz enthalten Weißkleeexsudate als weitere Aktivatoren Geraldon und 4'-Hydroxy-7-Methoxyflavon. Die Wirtspflanzen geben neben stimulierenden Flavonoiden auch Substanzen mit inhibitorischer Funktion ab. Im Falle von Weißklee konnten Umbelliferon (ein Coumarin) und Formononetin (ein Isoflavon) als solche nachgewiesen werden (DJORDJEVIC et al. 1987; Abb. 2). Sie haben die Aufgabe, den Infektionsprozess zu regulieren, indem sie die Anzahl der Wurzelknöllchen kontrollieren (FIRMIN et al. 1986) und somit eine „Übernodulation“ verhindern

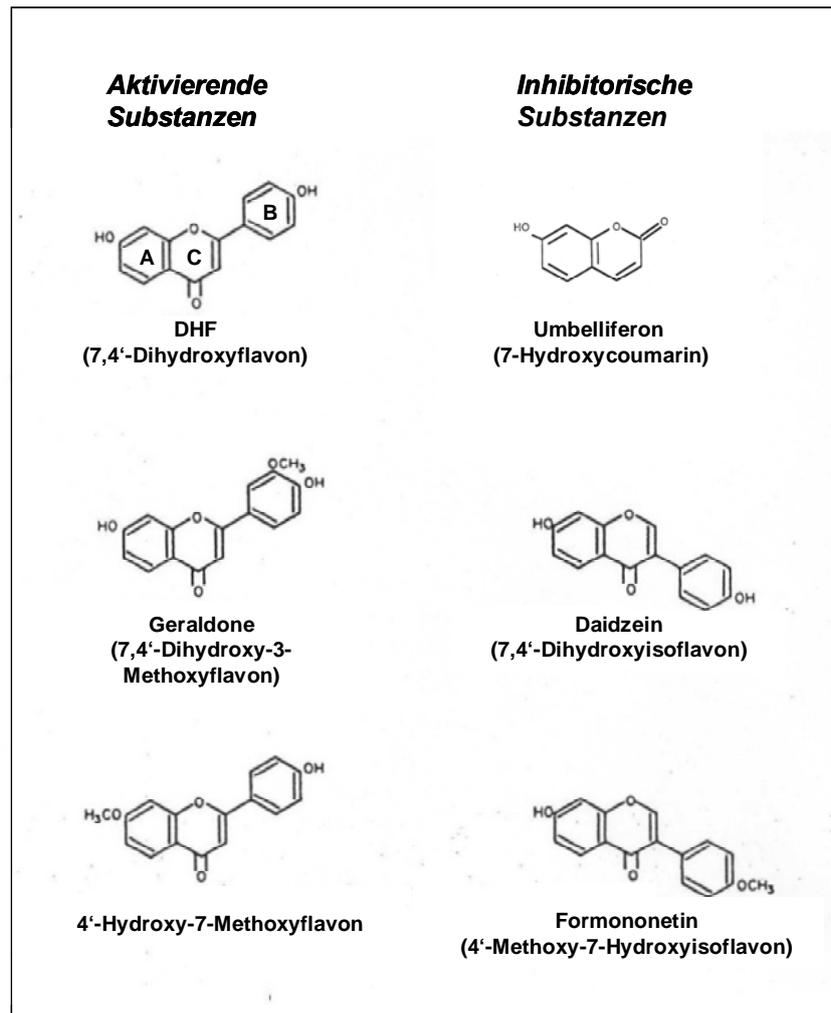


Abb. 2: Chemische Struktur der von *T. repens* exsudierten Substanzen, die die *nod*-Gene von *R. l. bv. trifolii* aktivieren und Substanzen mit inhibitorischer Funktion (modifiziert nach REDMOND et al. 1986).

(ROLFE 1988). Ob ein Flavonoid als Aktivator oder Inhibitor fungiert, ist wirtsspezifisch und abhängig von der Molekularstruktur der jeweiligen Substanz. Die Flavonoide bestehen aus zwei bis drei Kohlenstoffringen (A-, B- und C-Ring). Sie werden anhand der unterschiedlichen Substitution am C-Ring, der Position des B-Rings und dem oxidativen Status des heterozyklischen Rings in Untergruppen klassifiziert (DJORDJEVIC et al. 1987; ROLFE 1988; Abb. 2). Bei *T. repens* gehören die aktivierenden Substanzen zu den Flavonen. Charakteristisch ist, dass sie am siebten C-Atom des A-Rings eine Hydroxygruppe tragen und der B-Ring am zweiten C-Atom des C-Rings sitzt. Die Inhibitoren besitzen ebenfalls eine Hydroxygruppe am A-Ring, allerdings ist der B-Ring am dritten C-Atom des C-Rings substituiert oder fehlt ganz. Diese Molekularstruktur

kennzeichnet alle Isoflavone: neben dem bei Weißklee antagonistisch wirkenden Formononetin, auch z.B. Daidzein und Genistein, die in den Wurzelexsudaten von *Glycine max* vorkommenden *nod*-Gen-Induzierer. Die Tatsache, dass sowohl die inhibitorischen als auch die stimulierenden Substanzen eine Hydroxygruppe am A-Ring besitzen, legt die Vermutung nahe, dass sie bei der Aktivierung der *nod*-Gene um die gleiche Bindungszone konkurrieren (DJORDJEVIC et al. 1987). Die induzierenden Moleküle sind schon bei sehr geringer Konzentration (10^{-7} bis 10^{-8} M) aktiv und es zeigte sich, dass sie bereits nach einer Exposition von wenigen Minuten die *nod*-Gen-Expression stimulierten (DJORDJEVIC et al. 1987, ZAAT et al. 1987).

Die Nodulationsgene sind in den Rhizobien extra-chromosomal auf einem großen eigenen Plasmid, dem Sym-Plasmid, lokalisiert (JOHNSTON & BERINGER 1977) und werden in zwei Gruppen, die gemeinsamen (bei allen Rhizobien vorkommende *nodABC*) und wirtsspezifischen Nodulationsgene, klassifiziert (KONDOROSI et al. 1984). Insgesamt konnten vierzehn *nod*-Gene auf dem Sym-Plasmid von *R. l. bv. trifolii* identifiziert werden, die in vier separaten Operonen, *nodABCDEFGHIJ*, *nodD*, *nodFERL* und *nodMNX*, arrangiert sind (INNES et al. 1985; SCHOFIELD & WATSON 1986; SPAINK et al. 1989a; SURIN et al. 1990; LEWIS-HENDERSON & DJORDJEVIC 1991a; MCIVER et al. 1993; Abb. 3).

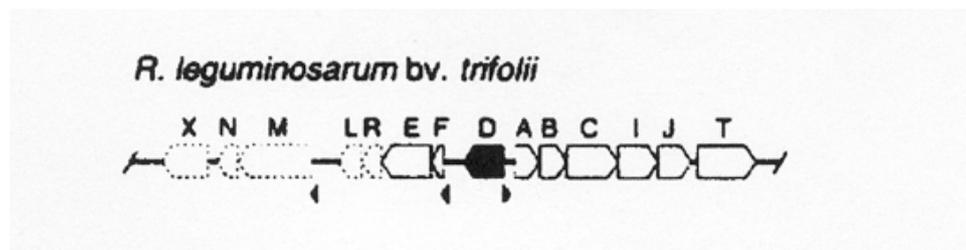


Abb. 3: Organisation der Nodulationsgene in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. Die Gene und die Richtung ihrer Transkription werden durch große Pfeile dargestellt. Die weißen Pfeile repräsentieren die *nod*-Gene; der schwarze Pfeil symbolisiert das *nodD*-Gen; die gepunkteten Pfeile kennzeichnen weitere, artspezifische Nodulationsgene und unbekannte „open reading frames“ (SCHLAMMAN et al. 1998).

In diesem Zusammenhang sind *nod ABCIJ* die gemeinsamen und *nod EF* die spezifischen *nod*-Gene in *R. l. bv. trifolii*. Die Vorgänge der transkriptionellen Aktivierung der *nod*-Gene konnten erstmals in den 1970er Jahren untersucht werden, als die Fusion des *E. coli lacZ* Reportergens mit den Nodulationsgenen der Rhizobien gelang. Untersuchungen, bei der die β -Galaktosidase-Aktivität die

Rate der Transkription reflektierten (MILLER 1972), zeigten, dass die transkriptionelle Aktivierung der Gene ein von den Rhizobien stammendes Aktivator-Protein, das NodD-Protein, und pflanzliche Flavonoide als Ko-Induzierer benötigt (FISHER et al. 1988; Abb. 4). Das *nodD*-Gen kodiert die genetische Information für das NodD-Protein und ist als einzelne Kopie in *R. l. bv. trifolii* präsent. In anderen Rhizobienstämmen können auch mehrere NodD-Kopien vorliegen (z.B. in *R. meliloti*: NodD1, NodD2, NodD3). Des Weiteren konnte eine DNS-Sequenz lokalisiert werden, die als Promotorregion vieler Nodulationsgene gilt. Hierbei handelt es sich um eine konservierte DNS-Sequenz, die sogenannte *nod*-Box, die die Regulation der *nod*-Gene koordiniert (ROSTAS et al. 1986). Nachdem die Bindung des wirtsspezifischen Flavonoids (bei *T. repens*: 7,4'-Dihydroxyflavon) an das NodD-Protein erfolgt ist, erfährt das Aktivatorprotein eine Konfirmationsänderung. Es wird vermutet, dass die Signal-Spezifität des NodD-Proteins durch chemische Veränderungen des C-Endes hervorgerufen wird (SPAINK et al. 1989b). Das C-Ende tastet während der Signalinduktion das aktivierende Molekül auf Kompatibilität ab, so dass die Rhizobien-Leguminosenspezifität gewährleistet wird. Die Interaktion der Flavonoide mit dem NodD-Protein findet mit großer Wahrscheinlichkeit auf der Innenseite der cytoplasmatischen Membran in der Bakterienzelle statt (SCHLAMMAN et al. 1992). Anschließend heftet sich der Flavonoid-NodD-Komplex an die, den *nod*-Operon vorgeschaltete, *nod*-Box. Die Nodulationsgene werden nun freigegeben und die Transkription derselben beginnt (Abb. 4).

1.4.2 Struktur und Funktion der Nod-Faktoren

In Rhizobien führt die Induktion der *nod*-Gene zur Produktion und Sekretion von wirtsspezifischen Signalsubstanzen, den Nod-Faktoren (Abb. 4). Hierbei handelt es sich um Lipo-Chito-Oligosaccharide (LCO), deren Grundstruktur von einem Chitin-Oligomer-Rückgrat aus β -1,4-verbundenden *N*-Acetyl-D-Glucosaminen gebildet wird (LONG 1996; SPAINK 2000). Zusätzlich befindet sich eine strukturell variierende Fettsäuregruppe am Stickstoffmolekül des nicht-reduzierenden Saccharids. Variationen im Chitin-Oligomer-Rückgrat (drei bis sechs *N*-Acetyl-D-Glucosamin-Einheiten) und der Struktur der Fettsäuregruppen sowie die An- bzw. Abwesenheit stamm-spezifischer Substituenten und ungesättigter Fettsäuregruppen, bewirken Unterschiede in der Struktur der LCOs und somit ihrer

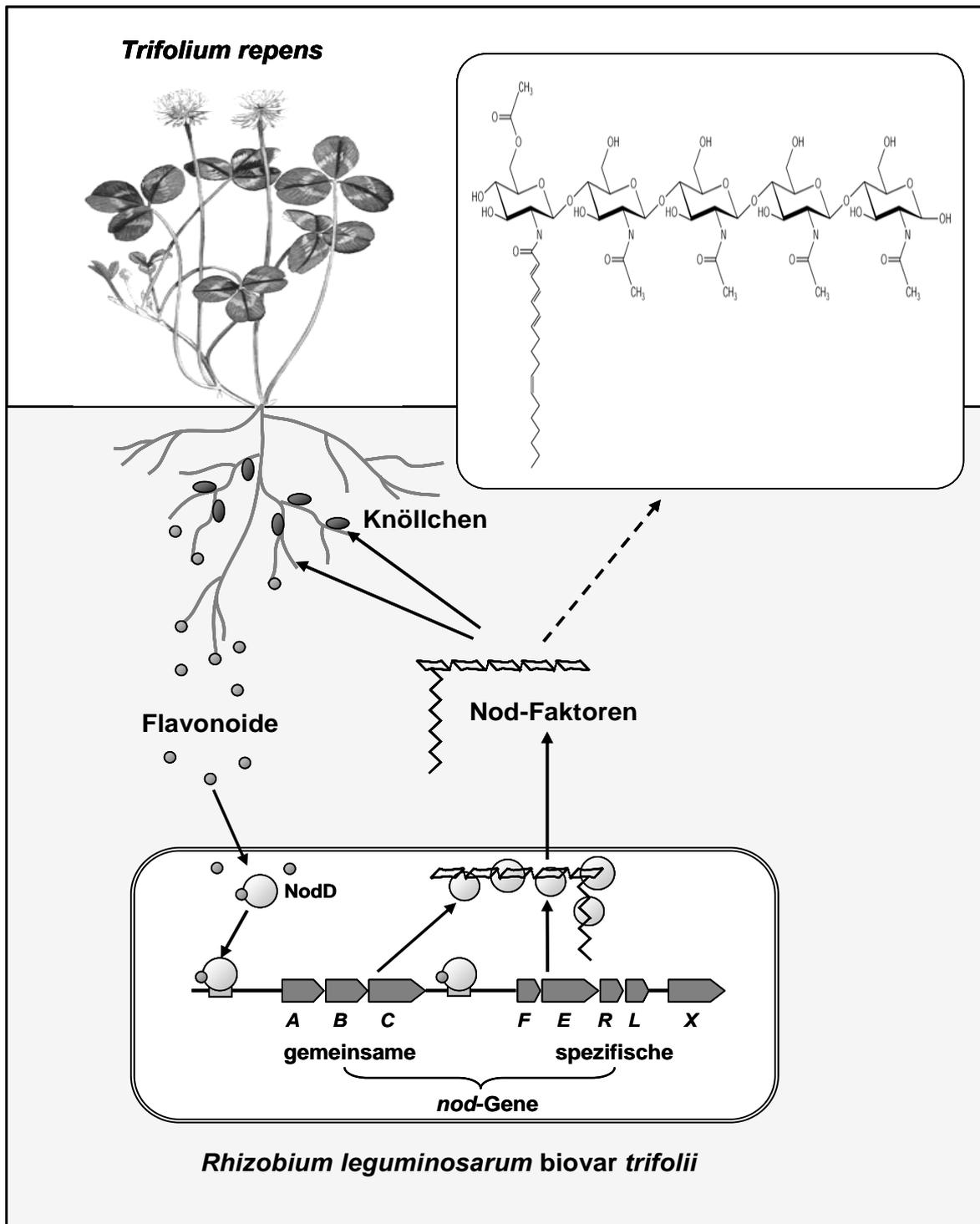


Abb. 4: Signalaustausch zwischen *Trifolium repens* und *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* während des Nodulationsprozesses. Die von der Wurzel exsudierten Flavonoide veranlassen die Expression der rhizobialen Nodulationsgene. Die Regulation dieser Gene wird durch das transkriptionelle Regulatorprotein NodD initiiert. Nach erfolgreicher Transkription erfolgt die Produktion und Sekretion der Nod-Faktoren. Hierbei sind die gemeinsamen nod-Gene (*nodA*, *B*, *C*) für die Synthese der Grundstruktur verantwortlich, während die spezifischen (*nodE*, *F*, *L*, *X*, *R*) die wirtsspezifischen Modifikationen der Basisstruktur bewirken (modifiziert nach BROUGHTON 2003).

Spezifität. Für die Synthese der Grundstruktur der Nod-Faktoren sind die gemeinsamen Nodulationsgene, *nodA*, *nodB* und *nodC*, verantwortlich. Die Seitengruppen (s.o.), die den Nod-Faktoren ihre Spezifität verleihen, werden durch die überwiegende Anzahl der wirtsspezifischen Nodulationsgene festgelegt (CARLSON et al. 1994). In *R. l. bv. trifolii* bewirken hauptsächlich NodE, NodF, NodL, NodX und NodR die wirtsspezifischen Modifikationen der Basisstruktur (SCHULTZE et al. 1994; SCHLAMMAN et al. 2006). Das *nodM*-Gen kodiert die Information für die Glucosamin-Synthetase, welche am Aufbau der Grundstruktur beteiligt ist (DOWNIE et al. 1991). Des Weiteren bewiesen MCKAY & DJORDJEVIC (1993) und SPAINK et al. (1995), dass *nodI* und *nodJ* die Exkretion der Nod-Faktoren steuern. Das *nodT*-Gen in *R. b. bv. trifolii* hingegen steht in Zusammenhang mit der sorten-spezifischen Nodulation bei *Trifolium subterraneum* (LEWIS-HENDERSON & DJORDJEVIC 1991b). Die Funktion von *nodN* ist bisher nicht bekannt.

Die Nod-Faktoren sind sehr aktive Signalmoleküle und in extrem niedriger Konzentration (10^{-12} - 10^{-13} M) wirksam (DÉNARIÉ et al. 1996; DOWNIE & WALKER 1999). Sie induzieren verschiedene molekulare, physiologische und morphologische Reaktionen der Wirtspflanze. So veranlassen die Nod-Faktoren u.a. die Krümmung der Wurzelhaare und die Induktion von ersten Zellteilungen im Wurzelcortex, lange bevor die Rhizobien in direkten Kontakt mit der Wirtspflanze kommen. Zudem aktivieren die Nod-Faktoren in den Zellen des Makrosymbionten mehr als 30 pflanzeneigene Nodulationsgene, die Nodulingene, und treten mit ihren Produkten (Nodulinen) in Wechselwirkung. Die „frühen“ Nodulingene beeinflussen frühe Stadien der Infektion und Knöllchenbildung, wie z.B. Wurzelhaarkrümmung, Teilung der Cortexzellen (s.o.) und die Bildung des Infektionsschlauches und des Knöllchenprimordiums (NAP & BISSELING 1990; VERMA 2000). Hingegen werden die „späten“ Nodulingene erst im Gewebe des fertigen Knöllchens exprimiert, kurz vor oder während der N_2 -Fixierung, und sind u.a. am Aufbau des Leghämoglobins, an der Stickstoffassimilation und an der Synthese von Transportern für Metabolite beteiligt (NAP & BISSELING 1990; VERMA 2000). Neben den Nod-Faktoren spielen auch noch andere rhizobiale Produkte an der Steuerung des Infektionsprozesses eine wichtige Rolle: spezielle Exopolysaccharide (EPS) und verwandte Komponenten (BROUGHTON et al. 2000), aber auch „nodulation outer proteins“ (NOPs), die vom „type three-secretion system“ (TTSS) exportiert werden (MARIE et al. 2001).

1.4.3 Der Prozess der Knöllchenbildung und die symbiotische N₂-Fixierung

Die Nod-Faktoren, die von speziellen Rezeptoren in der Plasmamembran der Wurzel erkannt werden (CULLIMORE et al. 2001), bewirken zunächst verschiedene zytologische Reaktionen in den Wurzelhaaren der Wirtspflanze:

- 1.) einen Ionen-Fluß (H^+ , Cl^- , K^+ und Ca^{2+}) und eine Membrandepolarisation (FELLE et al. 1998)
- 2.) eine Calcium-Akkumulation in der Wurzelhaarspitze (GEHRING et al. 1997)
- 3.) das Auftreten von Calcium-Spitzen (EHRHARDT et al. 1996)
- 4.) Änderungen im Actin-Zytoskelett, die die Morphogenese der Wurzelhaare beeinflussen (CÁRDENAS et al. 1998; MILLER et al. 1999)

Infolge dieser Veränderungen kann als äußeres sichtbares Zeichen die Krümmung der Wurzelhaare beobachtet werden, wobei die angelockten Rhizobien allmählich umschlossen werden. Die sich gleichzeitig stark vermehrenden Rhizobien heften sich an die Oberfläche der Wurzelhaare, indem ein spezielles, bakterielles Oberflächenprotein - das Ca^{2+} -bindende Rhicadhesin - an einen Rezeptor der Wurzelhaare bindet (SMIT et al. 1991). Enzyme lösen zudem die Zellwand der Wurzelhaare lokal auf. Des Weiteren wird durch Einstülpung der Plasmamembran der Infektionsschlauch gebildet und die Bakterien beginnen mit der Invasion der Wurzel (NEWCOMB 1976; KIJNI 1992). Im Rindengewebe der infizierten Pflanze entdifferenzieren sich die Zellen und fangen an sich zu teilen. Als Folge entsteht ein abgegrenzter veränderter Bereich, das Knöllchenprimordium, das sich später zum Knöllchen entwickelt und an das Leitgewebe des Zentralzylinders angeschlossen wird (FRANSEN 1992). Der Infektionsschlauch wächst auf das Knöllchenprimordium im Wurzelcortex zu, wobei sich gleichzeitig die Rhizobien weiter vermehren. Erreicht der Infektionsschlauch das Knöllchen, werden die Bakterien in einem endocytoseähnlichen Prozess in die Wirtszelle entlassen (BASSETT et al. 1977). Die Rhizobien teilen sich zunächst weiter und beginnen dann mit der Differenzierung in stickstoffbindende endosymbiotische Organellen, die als Bakterioide bezeichnet und von einer Membranhülle (Peribakteroidmembran) umschlossen werden (BREWIN 1991, TAIZ & Zeiger 2000). Das Knöllchen entwickelt abschließend ein Gefäßsystem und eine Zellschicht, die den Sauerstoff vom Innern des Wurzelknöllchens fernhält. Die Knöllchen von *T. repens* haben, wie die meisten Leguminosen der gemäßigten Breiten, eine zylindrische

Form und werden aufgrund des Vorhandenseins eines Knöllchenmeristems als indetermierte Knöllchen bezeichnet (HIRSCH 1992).

Erst mit Bildung des Bakteroids kann die biologische Stickstofffixierung im Knöllchen initiiert werden. Das Schlüsselmolekül ist hierbei die Nitrogenase, ein Enzymkomplex, welcher aus zwei Komponenten – der Dinitrogenase (Fe-Protein) und der Dinitrogenase-Reduktase (FeMo-Protein) – besteht (MORTENSON 1966; KIM & REES 1992). Die Synthese der Nitrogenase wird durch die bakteriellen *nif*-Gene gesteuert, die wie die *nod*-Gene auf dem Sym-Plasmid im *Rhizobium* liegen. Die durch die Nitrogenase katalysierte Reduktion $N_2 \rightarrow NH_3$ erfordert Elektronen und Energieäquivalente in Form von Adenosin-Triphosphat (ATP; BERGERSEN 1982; TAIZ & ZEIGER 2000). Hierbei dient Ferredoxin als Elektronendonator für das Fe-Protein, das seinerseits ATP spaltet und die Elektronen auf das FeMo-Protein überträgt. Das FeMo-Protein reduziert nun das Substrat N_2 . Die Elektronen und der Energielieferant ATP stammen letztlich aus dem in die Bakteroiden transportierten Malat (teilweise auch Succinat) und somit den Assimilaten der Wirtspflanze. Die Nitrogenase kann durch Sauerstoff irreversibel inaktiviert werden und ist somit extrem sauerstoffempfindlich. Im Knöllchen wird deshalb eine sehr niedrige O_2 -Konzentration aufrecht gehalten. Dies wird einerseits durch das suberinisierte äußere Knöllchengewebe, andererseits durch das Vorhandensein von großen Mengen an Leghämoglobin gewährleistet. Das Leghämoglobin ist, ein dem menschlichen Hämoglobin sehr ähnliches, O_2 -bindendes Protein, das zudem als O_2 -Puffer fungiert und den aeroben Stoffwechsel der Bakteroiden bei niedriger O_2 -Konzentration befriedigt (LAMBERS et al. 1998; SCHOPFER & BRENNECKE 2006). Sie verleiht zudem den Knöllchen ihre charakteristische rosarote Farbe. Das erste stabile Produkt in der Stickstofffixierung ist Ammoniak, das in das Cytoplasma der Pflanzenzelle transportiert und hier mittels dem Enzymsystem GS/GOGAT (GS=Glutaminsynthetase; GOGAT=Glutamatsynthase) in weniger toxische stickstoffhaltige Verbindungen überführt wird (LAMBERS et al. 1998). Die Hauptexportprodukte sind die Amide Asparagin und Glutamin, die in den Leguminosenarten der gemäßigten Breiten wie *T. repens* vorkommen (VANCE 2000). In Leguminosen tropischen Ursprungs, wie *Glycine max*, werden vorwiegend die zu den Ureiden zählenden Aminosäuren Allantoin, Allantoinsäure und Citrullin, synthetisiert (ATKINS & SMITH 2000). Der Transport der N-haltigen Verbindungen erfolgt über das Xylem in die Blätter oder in andere Organe, wo der Stickstoff z.B. für die Aminosäure- und Nukleosidsynthese benötigt wird. Die Menge an fixiertem Stickstoff ist u.a. abhängig von der Leguminosenart und der Bewirtschaftungsform. So kann z. B. Weißklee, als wichtigste Grünland-

Leguminose, in einem Mischbestand mit Gräsern 100 bis 300 kg N ha⁻¹ Jahr⁻¹ durch symbiotische N₂-Fixierung in ein intensiv genutztes Wiesenökosystem einbringen (PEETERS et al. 2006).

1.5 Zielsetzung

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von erhöhten atmosphärischen CO₂-Konzentrationen auf die Symbiose zwischen Weißklee und seinem zur Stickstofffixierung befähigten Symbionten *Rhizobium leguminosarum* biovar. *trifolii* zu untersuchen. Zur Erreichung dieses Zieles standen zwei Fragestellungen im Vordergrund.

Wie die Resultate aus dem Swiss FACE belegen, steigern erhöhte atmosphärische CO₂-Konzentrationen die symbiotische N₂-Fixierung infolge eines gesteigerten N-Bedarfs (ZANETTI et al. 1996). Dies ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine gesteigerte Nodulation als Konsequenz der erhöhten Anzahl von *R. l. bv. trifolii*-Stämmen in der Weißklee-Rhizosphäre (SCHORTEMAYER et al. 1996) und/oder einer veränderten Struktur bzw. genetischen Zusammensetzung der *Rhizobien*-Population zurückzuführen (MONTEALEGRE et al. 2000). In den letzten Jahren des Freilandexperiments wurde jedoch die symbiotische N₂-Fixierung durch erhöhtes atmosphärisches CO₂ deutlich weniger stark stimuliert. Diese ersten Ergebnisse führten zu der Frage, ob nach 10 Jahren der CO₂-Begasung im Swiss FACE eine Anpassung der Rhizobien an die veränderten CO₂-Bedingungen erfolgt ist. Vor diesem Hintergrund sollte in dieser Arbeit geklärt werden, ob ein Unterschied in der genetischen Zusammensetzung der Rhizobienpopulation immer noch nachweisbar ist.

Die erste zentrale Frage der vorliegenden Arbeit lautete somit:

1. *Können nach 10-jähriger Freiland-CO₂-Begasung im Swiss FACE weiterhin genetisch unterschiedliche Rhizobien-Stämme in den Wurzelknöllchen von T. repens nachgewiesen werden oder ist eine Anpassung der genetischen Zusammensetzung der Knöllchenbakterien an erhöhte CO₂-Konzentrationen erfolgt?*

Es ist weiterhin sehr wahrscheinlich, dass auch die Signalprozesse in der Rhizobien-Leguminosen-Symbiose von CO₂ beeinflusst werden.

SCHORTEMAYER et al. (1996), MARILLEY et al. (1999) und MONTEALEGRE et al. (2000, 2002) vermuteten, dass die im Swiss FACE beobachteten Veränderungen der Populationsstruktur der Rhizosphäre und die gesteigerte N₂-Fixierung infolge erhöhter CO₂-Konzentration auf qualitative und quantitative Veränderungen in der Wurzelexsudation zurückzuführen seien. In verschiedenen CO₂-Experimenten konnte bereits nachgewiesen werden, dass Pflanzen, die unter Einfluss von CO₂ kultiviert wurden, einen Anstieg in der Wurzelexsudation zeigten (RATTRAY et al. 1995; PATERSON et al. 1996; PENDALL et al. 2004; ALLARD et al. 2006). Unklar ist allerdings, ob die gesteigerte Exsudation ausschließlich die Folge höherer Wurzelbiomasse ist (BILLES et al. 1993; VAN GINKEL et al. 2000) oder ob CO₂ eine höhere Wurzelaktivität bewirkte und somit eine Steigerung in der Exsudation (z. B. pro Gram Wurzel) „provoziert“. Auch die Zusammensetzung der Wurzelexsudate scheinen dem CO₂-Einfluss zu unterliegen. So konnten HODGE et al. (1998) nachweisen, dass die Wurzelexsudate von *L. perenne*, die in Mikrokosmoseinheiten bei erhöhter CO₂-Konzentration kultiviert wurden, geringere Mengen an Phenolsäuren und Zuckern aufwiesen. Des Weiteren lassen Studien von GRAYSTON et al. (1998) auf ein höheres C/N-Verhältnis in den exsudierten Substanzen unter erhöhten CO₂-Konzentrationen schließen. Dementsprechend ist es möglich, dass auch *T. repens* unter erhöhtem CO₂ qualitativ veränderte Exsudate bzw. Exsudate mit veränderter Flavonoidstruktur abgibt und somit spezifisch die *nodD*-Gene von selektierten *Rhizobien*-Stämme aktiviert, mit der Folge einer effektiveren Nodulation und größeren Konkurrenzfähigkeit. Auch der Nährstoffstatus der Pflanze beeinflusst die Wurzelexsudation (CORONADO et al. 1995; MARSCHNER 1995; HODGE et al. 1996; NEUMANN & RÖMHELD 2001). Ausreichende Versorgung mit Stickstoff und hohe N-Konzentrationen im Boden unterdrücken – infolge verminderter Produktion und Exsudation an phenolischen Substanzen – die *Rhizobium*-Infektion, die Knöllchenbildung und letztendlich die N₂-Fixierung in Leguminosen (SCHLAMMAN et al. 1998; BROUGHTON et al. 2003). Unklar ist allerdings, ob die N-Versorgung in Verbindung mit erhöhten CO₂-Konzentrationen einen Einfluss auf die Exsudation der Signalsubstanzen hat.

Hieraus ergab sich die zweite zentrale Frage dieser Arbeit:

2. *Führen erhöhte atmosphärische CO₂-Konzentrationen und unterschiedliche N-Versorgung zu quantitativen und qualitativen Veränderungen in der Wurzelexsudation von T. repens, insbesondere im Hinblick auf die Abgabe von Substanzen mit Signalfunktion (Flavonoide) während der Nodulation?*

Die vorliegende Arbeit sollte grundlegende Erkenntnisse über die Funktionsmechanismen dieser Pflanzen-Mikroorganismen-Symbiose in einer CO₂-angereicherten Umwelt liefern und mögliche genetische Veränderungen und physiologische Prozesse identifizieren, die eine Anpassung der Weißklee-Rhizobien an erhöhte atmosphärische CO₂-Bedingungen erklären.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Beschreibung des Feldversuchs (Swiss FACE) und Probenentnahme

Im Swiss FACE-Experiment (Bild 1) wurde in den Jahren 1993 bis 2002 der Langzeiteffekt von erhöhten atmosphärischen CO₂-Konzentrationen auf ein Modellgraslandökosystem untersucht. Hauptziel des Projektes war es, die grundlegenden Prozesse zu verstehen, die für die CO₂-Reaktion eines Graslandökosystems verantwortlich sind. Die Flächen des Feldversuchs lagen in Eschikon, Schweiz, 20 km nordöstlich von Zürich, auf einer Höhe von 550 m über dem Meer. Der Versuch bestand aus drei Ringen (18 m Durchmesser), die mit CO₂ begast wurden (F1, F2, F3 mit 600 ppm) und drei Kontroll-Ringen mit ambienter CO₂-Konzentration (C1, C2, C3 mit 350 ppm). Um Begasungseffekte auf die Kontrollflächen zu verhindern, betrug die Distanz zwischen den begasteten Ringen und den Kontroll-Ringen 100 m. Die CO₂-Begasung, unter Verwendung der FACE-Technologie (HENDREY et al. 1992; LEWIN et al. 1994), erfolgte am Tage während der Vegetationsperiode von März bis November bei einer Lufttemperatur über 5 °C. Über den gesamten Zeitraum des Freilandexperiments betrug für alle drei mit CO₂-begasteten Ringe das einminütige Mittel 600 ppm ± 10% während 90 bis 94% der Begasungszeit (SUTER et al. 2002).

Im August 1992 wurden in jedem Ring auf einer Versuchsfläche von 2,8 x 1,9 m *Trifolium repens* L. cv Milkanova und *Lolium perenne* L. cv Bastion jeweils in Monokultur und Mischkultur ausgesät. Für den Versuch wurden verschiedene Schnitthäufigkeiten und zwei unterschiedliche N-Düngungsvarianten gewählt. In den ersten drei Jahren des Experiments wurden die Flächen unterschiedlich häufig geschnitten (1993: drei bzw. fünf Schnitte; 1994 und 1995: vier bzw. acht Schnitte). Ab 1996 erhielten alle Flächen fünf Schnitte pro Jahr. Die Stickstoffapplikation erfolgte in zwei verschiedenen Raten: 10 oder 42 g m⁻² a⁻¹ in 1993 und in den Folgejahren 14 oder 56 g m⁻² a⁻¹.

Der Stickstoff wurde in Form von NH₄NO₃ zu Beginn jeder Vegetationsperiode und nach jedem Schnitt zugeführt. Ein kleiner Teilbereich jedes Versuchfeldes (0,9 x 1,1 m) erhielt mit ¹⁵N angereichertes NH₄NO₃, um mittels der ¹⁵N-Isotopen Verdünnungsmethode den Effekt von erhöhtem CO₂ auf die symbiotische N₂-Fixierung messen zu können (MONTEALEGRE et al. 2000; RICHTER 2003).

Um Stämme von *R. l. bv. trifolii* für die weiteren Analysen aus den Wurzelknöllchen des Weißklees isolieren zu können, wurden im Juni 2002 Proben aus dem Swiss FACE entnommen. Hierbei wurden alle Monokulturbestände von *T. repens* mit niedriger N-Versorgung beider CO₂-Varianten beprobt. Die Weißkleepflanzen (vier Pflanzen pro Fläche) wurden zufällig ausgewählt und mit einem Spaten ausgegraben, indem zunächst die gesamte Pflanze kreisförmig bis in eine Bodentiefe von 20 cm ausgestochen wurde. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Wurzeln der entnommenen Pflanzen ausreichend aktive Wurzelknöllchen besaßen (ca. 30 Knöllchen pro Pflanze). Der Transport und die Aufbewahrung der Pflanzenproben für die spätere Isolation und Analyse der Rhizobien erfolgten bei 4 °C.

2.2 Isolation von N₂-fixierenden Mikroorganismen (Rhizobien) aus Wurzelknöllchen

Die Wurzeln wurden zunächst vorsichtig mit Wasser gewaschen, um anhaftende Bodenreste zu entfernen. Anschließend wurden 30 Knöllchen pro Weißkleepflanze mit einer Schere entfernt und aus diesen zufällig (Zufallszahlen mit SAS generiert) 15 Knöllchen ausgewählt. Da für jede Versuchsfläche im Swiss FACE vier Pflanzen entnommen wurden, konnten bei drei Wiederholungen pro CO₂-Variante insgesamt 360 Knöllchen für die Isolation der Rhizobien herangezogen werden.

Die Isolation der Rhizobien aus den Wurzelknöllchen von *T. repens* erfolgte, mit leichten Modifikationen, nach MONTEALEGRE et al. (2000) bzw. SOMASEGARAN & HOBEN (1994). Vor dem eigentlichen Isolierungsschritt mussten die Knöllchen einer Oberflächensterilisation unterzogen werden. Hierfür wurden sie unter sterilen Bedingungen mit 80% Ethanol² für 5-10 Sekunden sowie mit 3% Wasserstoffperoxid (H₂O₂) für drei Minuten behandelt und anschließend sechs Mal mit sterilem Wasser gewaschen, um Reste der Reagenzien zu entfernen. In 1,5 ml Reaktionsgefäßen wurden die sterilisierten Knöllchen in 0,85% Natriumchlorid (NaCl) mit einem Plastikstab zerdrückt und so die in den Knöllchen eingeschlossenen Rhizobien freigesetzt. Der Inhalt der Knöllchen konnte nun auf Petrischalen (94 x 16 mm) mit Yeast-Mannitol-Agar (YMA), versetzt mit 25 mg ml⁻¹ Congo Red (Sigma-Aldrich), ausgestrichen werden.

² Die in diesem Kapitel aufgeführten und verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht gesondert vermerkt, in p.A.-Qualität von folgenden Firmen bezogen: Merck, Sigma-Aldrich, AppliChem, Fluka-Roedel de Haën, BD Diagnostics.

Yeast-Mannitol-Agar (YMA) mit Congo Red:

Chemikalien	g/Liter
Yeast-Mannitol-Broth (Sigma-Aldrich)	12,8
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
Agar	15

Congo Red (Stock-Lösung)	10 ml

Einstellung des pH-Wert auf 6,8 mit 0,1 M NaOH

Da Congo Red nicht hitzestabil ist, wurde das YMA-Medium zunächst ohne den Farbstoff angesetzt und bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert. Für die Stock-Lösung des Congo Reds wurden 250 mg der Chemikalie in 100 ml destilliertem Wasser aufgelöst und durch einen 0,2 µm Filter (Whatman Schleicher & Schuell, FP 30/0,2 Ca-S) steril-filtriert. Nach kurzer Abkühlungsphase des sterilisierten YMA-Mediums wurde 10 ml der Stock-Lösung hinzugefügt. Congo Red dient als Selektionsfarbstoff, der Kolonien von Bodenmikroorganismen, die nicht rhizobialen Ursprungs sind, rot anfärbt. Die Inkubation der Bakterienplatten erfolgte für zwei bis drei Tage bei 28 °C im Dunklen, bis sich einzelne Kolonien gebildet hatten. Anschließend wurden die Isolate gereinigt, indem einzelne, sich nicht rot verfärbende Kolonien, zweimal auf Tryptone-Yeast-Agar (TYA) ausplattiert wurden (BERINGER 1974; Bild 2).

Tryptone-Yeast-Agar (TYA):

Chemikalien	g/Liter
Tryptone	5,0
Hefeextrakt	3,0
CaCl ₂ · H ₂ O	0,87
Agar	12

Einstellung des pH-Wert auf 6,8-7,2 mit 0,1 M NaOH



Bild 2: Repräsentatives Wachstum von *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*, kultiviert auf Trypton-Yeast-Agar, nach Isolation aus Wurzelknöllchen von *Trifolium repens*.

Die Aufbewahrung der Rhizobien erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 2 ml Kryogefäßen in 50% Glycerol, wobei jedes Isolat entsprechend seiner Herkunft beschriftet wurde. Bakterien-Stämme, isoliert aus Weißkleeplanzen, die auf den Kontroll-Ringen des Swiss FACE wuchsen, erhielten die Bezeichnung C1₁₋₆₀, C2₁₋₆₀, C3₁₋₆₀ (60 Isolate pro Ring). Hingegen trugen die Stämme, isoliert aus Pflanzen, die in den mit CO₂-begasten Ringen kultiviert waren, die Beschriftung F1₁₋₆₀, F2₁₋₆₀, F3₁₋₆₀.

2.3 Pflanzeninfektions-Test

Um zu testen, ob es sich bei den zuvor isolierten Bakterien-Stämmen tatsächlich um den für *T. repens* charakteristischen Mikrosymbionten *R. l. bv. trifolii* handelte, wurde ein Pflanzeninfektions-Test unter sterilen Bedingungen durchgeführt (SOMASEGARAN & HOBEN 1994). Dieser Test untersuchte die Fähigkeit der Bakterien zur Nodulation.

2.3.1 Sterilisation und Keimung der Weißkleesamen

Für den Infektionstest wurden *T. repens*-Samen der Sorte Milkanova in einem Erlenmeyerkolben für 10 Sekunden mit 95% Ethanol und für 3-5 Minuten mit 3% H₂O₂ oberflächensterilisiert. Mehrmaliges Spülen der Samen mit sterilem Wasser entfernte die überschüssigen Sterilisationsreagenzien. Anschließend wurden die sterilen Weißkleesamen auf große Petrischalen (150 x 20 mm) mit 0,75% Wasseragar ausgesät (ca. 50 Stück pro Platte). Die Inkubation und die Keimung der Samen erfolgten bei 28-30 °C im Dunkeln für eineinhalb Tage, bis die Wurzeln eine Länge von ca. 1 cm aufwiesen.

2.3.2 Präparation der Schrägagarröhrchen

Zur Herstellung der Schrägagarröhrchen für den Infektionstest wurden große Reagenzgläser (180 x 20 mm) sowie N-freie Nährlösung (nach BROUGHTON & DILLWORTH, zitiert von SOMASEGARAN & HOBEN 1994) verwendet,

N-freie Nährlösung:

Stock-Lösungen	Chemikalien	g/Liter
1	CaCl ₂ · 2H ₂ O	294,1
2	KH ₂ PO ₄	136,1
3	FeC ₆ H ₅ O ₇ · 3H ₂ O	6,7
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	123,3
	K ₂ SO ₄	87,0
	MnSO ₄ · H ₂ O	0,338
4	H ₃ BO ₃	0,247
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,228
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,100
	CoSO ₄ · 7H ₂ O	0,056
	Na ₂ MoO ₂ · 2H ₂ O	0,048

Für die N-freie Nährlösung wurden vier verschiedene Stock-Lösungen hergestellt und anschließend auf 1 Liter destilliertem Wasser 0,5 ml jeder Stocklösung sowie 12 g Agar hinzugefügt. Zur Einstellung des pHs auf 6,6 bis 6,8 diente 1 M NaOH. Das Nährmedium wurde vor dem Abfüllen in die Reagenzgläser kurz aufgeköcht, um eine homogene Verteilung des Agars zu ermöglichen. Die Reagenzgläser

wurden jeweils mit 15 ml N-freiem Nährmedium gefüllt und mit einem Metalldeckel, der eine spätere sterile Luftzirkulation ermöglichte, verschlossen. Nach der Sterilisation im Autoklaven erfolgte die Aushärtung des Agars in Schräglage auf einem Holzblock (SOMASEGARAN & HOBEN 1994), so dass sich die Oberfläche des Schrägagars schließlich über eine Länge 5-10 cm erstreckte.

Die Weißkleekeimlinge wurden anschließend mittels einer sterilen Pinzette in die Reagenzgläser überführt (zwei pro Reagenzglas), wobei die Platzierung der Keimlinge in die obere Hälfte des Schrägagars erfolgte, um eine ausreichende Luftversorgung derselben zu ermöglichen (Bild 3).

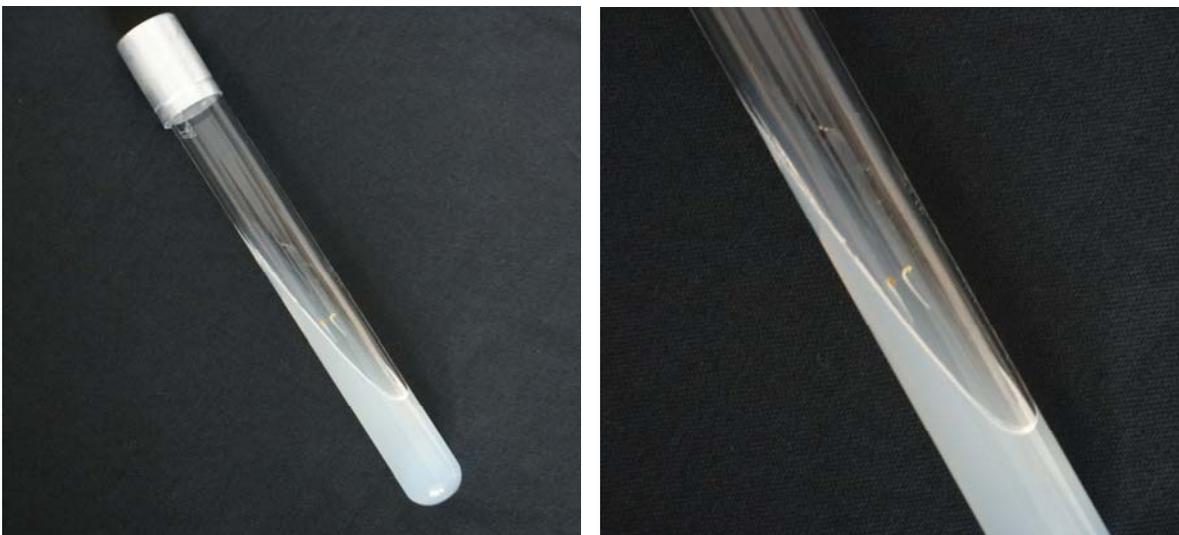


Bild 3: Keimlinge von *Trifolium repens* (2 Tage nach der Aussaat) in Schrägagarröhrchen mit N-freiem Medium.

2.3.3 Kultivierung der Bakterien und Inokulation der Pflanzen

Für die Pflanzeninfektion wurden die isolierten Rhizobien-Stämme, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, auf TYA-Platten ausgestrichen und inkubiert. Die weitere Kultivierung der Bakterien erfolgte in Reagenzgläsern (160 x 16 mm) mit Flüssigmedium, indem zwei bis fünf Kolonien in 10 ml sterilisiertem TY-Medium (Ansatz ohne Agar) überführt wurden. Anschließend wurden die Reagenzgläser in einem Rotationsinkubator bei 28 °C für ein bis zwei Tage inkubiert. Nach erfolgreichem Wachstum wurde die Bakteriensuspension mit TY-Flüssigmedium 1:10 verdünnt, um eine Schädigung der Pflanzenwurzeln durch zu hohe Bakterienkonzentrationen zu vermeiden.

Die Inokulation der Weißkleekeimlinge erfolgte unter Verwendung von 1 ml Bakteriensuspension, die mittels einer sterilen Pipette vorsichtig über die gesamte Wurzel der Keimlinge geträufelt wurde. Für jeden isolierten Bakterienstamm wurden zwei Reagenzgläser inokuliert.

Jeder Versuchsansatz enthielt sechs bis acht Negativkontrollen, bei denen die Pflanzenwurzeln mit sterilem, nicht inokuliertem TY-Medium behandelt wurden. Zudem wurden zwei Reagenzgläser mit dem *R. l. bv. trifolii*-Stamm DSM 30141 (zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. D. Werner, Universität Marburg) als Positivkontrollen angesetzt.

Um Lichtschädigungen der Wurzel zu vermeiden, wurde der untere Teil der Reagenzgläser mit Alufolie abgedeckt. Das Wachstum der Pflanzen erfolgte unter kontrollierten Bedingungen in Keimschränken (Ehret KB/LS 4600) für 4 Wochen, je nach Entwicklungsstatus der Knöllchen:

- Temperatur: 25 °C (tagsüber) bzw. 20 °C (nachts)
- Luftfeuchtigkeit: 90% (tagsüber) bzw. 60% (nachts)
- Langtagbedingungen (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkelheit)

Die Entwicklung der Knöllchen wurde wöchentlich kontrolliert und dokumentiert.

2.4 Rep-PCR DNA Fingerprinting isolierter Rhizobien-Stämme

Für das rep-PCR DNA Fingerprinting (Abb. 5) wurden die zuvor isolierten und verifizierten Rhizobien-Stämme zunächst auf TY-Agarplatten kultiviert. Die Isolierung der bakteriellen DNA erfolgte mit leichten Modifikationen nach der Methode von REDEMAKER et al. (1997). Bakterienzellen von frischen Rhizobien-Kolonien (1 Impföse) wurden in 100 µl 5 mM NaOH in eine 96er Mikrotiter-Platte überführt und bei 95 °C für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf 4 °C abgekühlt und bei 640 rpm für 10 Minuten in einer Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand (2 µl) diente als Quelle für die genomische DNA und wurde als Vorlage für die rep-PCR unter Verwendung von BOX A1R-Primern benutzt (LUPSKI et al. 1992; KOEUTH et al. 1995; SADOWSKY et al. 1996; SADOWSKY & HUR 1998). Die Primer wurden zusätzlich mit dem fluoreszierenden Farbstoff 6-FAM markiert (modifiziert nach DEL VECCHIO et al. 1995). Für die rep-PCR wurden folgende Reagenzien verwendet:

Reagenzien	µl/Reaktion
bi-dest. H ₂ O	12,65
5x Gitsch-Puffer*	5
DMSO	2,5
6 FAM-BOX A1R-Primer	1,0
dNTPs	1,25
BSA	0,2
TAQ-Polymerase	0,4
Total	23,0

* 5x Gitsch-Puffer (200 ml):

Reagenzien	ml/200ml
(NH ₄) ₂ SO ₄ (1M)	16,6
Tris-HCl (1M; pH 8)	67
MgCl ₂ (1M)	6,7
EDTA (0,5M; pH 8) (1:100 verdünnt)	1,3
β-Mercapto- ethanol (14,4 M)	2,08

Die eigentliche PCR erfolgte in einem MJ Research PTC 100 Thermocycler (Waltham, Mass., USA) unter Verwendung des „fast protocol“ (RADEMAKER et al. 1997; DOMBEK et al. 2000):

- 95 °C für 2 Minuten
- 30 Zyklen
 - 94 °C für 3 Sekunden
 - 92 °C für 30 Sekunden
 - 50 °C für 1 Minute
 - 65 °C für 8 Minuten
- 65 °C für 8 Minuten
- Abkühlung auf 4 °C

Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt. Aliquots der PCR-Produkte (12 µl) wurden anschließend in einem 1,5% LE-Agarose Gel (20 x 25 cm) mittels Elektrophorese bei 4 °C und 70 V für 17,5 Stunden getrennt. Jedes Gel beinhaltet einen internen Standard (Rhizobien-Stamm DSM 30141) sowie einen externen Standard (ROX-markierter MW-Marker; GeneScanTM 2500

[ROX]TM, Applied Biosystems). Die Dokumentation der Gele erfolgte mit einem Typhoon Multicolor Fluoreszenz-Scanner (Molecular Dynamics). Nach dem Scanvorgang wurden die Gel-Bilder normalisiert und zugewiesen. Die Position der Fragmente (Banden) in jedem Gel konnte mit dem ROX-markierten MW-Marker, der als externer Referenz-Standard diente, normalisiert werden. DNA-Fragmente, die kleiner waren als 300 bp, wurden in der Analyse nicht berücksichtigt, da sie zur Unschärfe neigten.

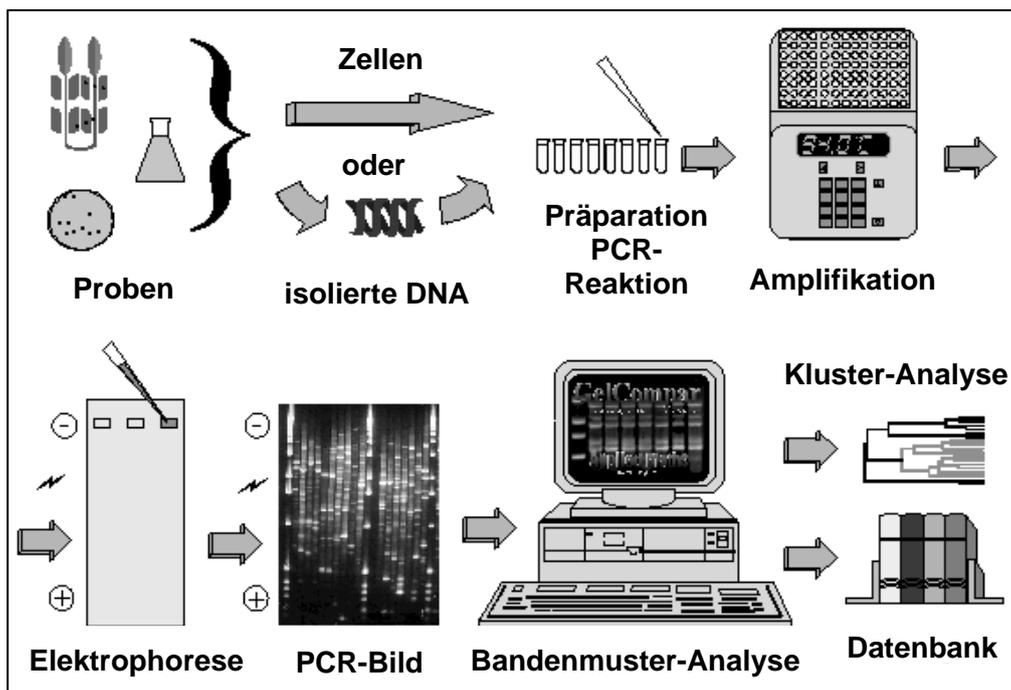


Abb. 5: Schematischer Ablauf der rep-PCR DNA Fingerprinting-Methode nach DE BRUIJN (Quelle: <http://www.msu.edu/user/debruijn/>)

2.5 Gewinnung von Wurzelexsudaten unter sterilen Versuchsbedingungen

2.5.1 Kultivierung von *Trifolium repens* in Magenta Boxen

Für die sterile Anzucht der Weißkleopflanzen in Magenta Boxen (Osmotek) wurde eine Pflanzennährlösung nach BROUGHTON & DILWORTH (Kapitel 2.3.2) hergestellt, die zusätzlich als Stickstoffquelle 4 mM KNO₃ enthielt (Bild 4). In jede Magenta Box wurden 150 ml der Nährlösung gefüllt und autoklaviert. Des Weiteren wurden die Membranen (800 µm, 5,5 x 5,5 cm; Draht Center Stuttgart)

der Magenta-Flößchen zur Sterilisation autoklaviert, über Nacht in 2% Bleiche (2% NaHClO_4 + 0,1 % SDS) eingeweicht und abschließend zwei bis drei Mal mit sterilisiertem Wasser ausgewaschen.

Die Oberflächensterilisation der Weißkleesamen der Sorte Milkanova erfolgte mit 70% Ethanol für 1-2 Minuten und mit 2% Bleiche (s.o.) für 15-20 Minuten in einem 15 ml Plastikröhrchen. Anschließendes Waschen der Samen mit sterilem H_2O entfernte die Überreste der Bleiche. Es wurde bewusst eine andere Art der Sterilisation als die in Kapitel 2.3.1 beschriebene Methode gewählt, da diese eine zu hohe Kontaminationsrate zur Folge hatte. Die sterilisierten Samen wurden nun mit einer sterilen Pinzette auf die Membranen in die Magenta Boxen transferiert (30 Samen pro Magenta Box). Um einen keimfreien Gasaustausch zu ermöglichen, wurden die Magenta Boxen mit speziellen Deckeln, die eine luftdurchlässige Membran mit einer Porengröße von $0,3 \mu\text{m}$ ($\varnothing 22 \text{ mm}$) enthielten, verschlossen und mit Leukopore-Tape (Duchefa) zusätzlich abgedichtet (Bild 4).



Bild 4: Links: 18 Tage alte Weißkleepflanzen auf Nährlösung in einer Magenta Box. Rechts: Deckel einer Magenta Box mit Membran, die einen keimfreien Gasaustausch ermöglicht.

Die sterile Kultivierung der Weißkleepflanzen erfolgte für zweieinhalb Wochen in zwei baugleichen Klimakammern unter folgenden Bedingungen (Bild 5):

- Temperatur: $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (tagsüber) bzw. $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (nachts)
- Luftfeuchtigkeit: 90% (tagsüber) bzw. 60% (nachts)
- Langtagbedingungen (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkelheit)
- Lichtintensität: $450 \mu\text{E m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$

Insgesamt beinhaltete der Versuchsansatz 60 Magenta Boxen. Um den Einfluss von CO₂ auf die Wurzelexsudation von *T. repens* analysieren zu können, wurden 30 Boxen mit CO₂-angereicherter Luft (800 ppm) begast (Siemens CO₂-Controller 7MB 1300 AA0), während die restlichen 30 Magenta Boxen als Kontrolle fungierten und unter in Hohenheim vorherrschender ambients CO₂-Konzentration (400 ppm) kultiviert wurden. Zusätzlich sollte ab dem ersten Termin der Exsudatgewinnung auch der Einfluss der Stickstoffversorgung auf die Exsudation untersucht werden. Von den 30 Magenta Boxen in jeder Klimakammer wurden ab der ersten Exsudatgewinnung 15 Boxen weiterhin mit Stickstoff in Form von KNO₃ versorgt, während die restlichen 15 Boxen eine Pflanzennährlösung ohne Stickstoff erhielten.

Die Nährlösung wurde in der ersten Woche alle drei Tage, in der Folgezeit alle zwei Tage unter sterilen Bedingungen gewechselt. Hierfür wurde die Pflanzennährlösung direkt in den Magenta Boxen – wie zuvor beschrieben – autoklaviert und anschließend die Weißkleepflanzen zusammen mit dem Flößchen mit Hilfe sterilisierter Pinzetten in Boxen mit frischer Nährlösung überführt.

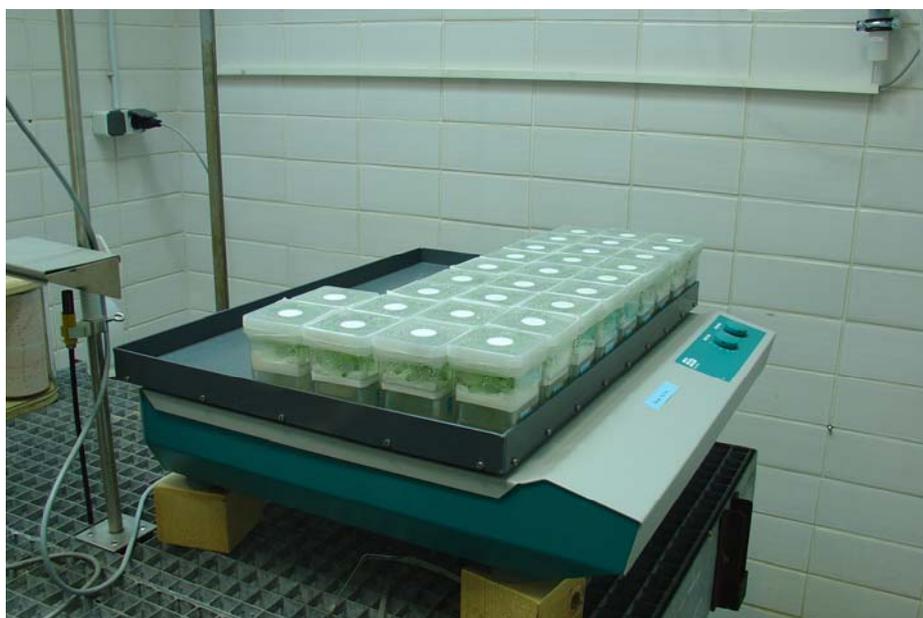


Bild 5: Sterile Anzucht von *T. repens* in Magenta Boxen in einer Klimakammer. Zur besseren Durchlüftung der Nährlösung wurden die Gefäße auf einem Schüttler platziert und bei 75 rpm geschüttelt.

2.5.2 Gewinnung der Wurzelexsudate

Die Gewinnung der Wurzelexsudate erfolgte nach zweiwöchigem Wachstum der Weißkleepflanzen an drei unterschiedlichen Terminen bei 15, 17 und 19 Tage alten Pflanzen unter sterilen Bedingungen. Am Morgen der jeweiligen Versuchstage wurde zunächst die Nährlösung in den Boxen ausgetauscht (s.o.), wobei ab dem ersten Termin der Exsudatgewinnung nur noch die Hälfte der Pflanzen in den Magenta Boxen eine stickstoffhaltige Nährlösung erhielten.

Die eigentliche Exsudatgewinnung erfolgte über einen Zeitraum von sieben Stunden in der Nährlösung. Im Anschluss wurden die Inhalte von jeweils fünf Boxen gepoolt und in sterile Plastikflaschen (1 Liter) abgefüllt und bei -20 °C bis zur weiteren Aufbereitung bzw. Analyse aufbewahrt. Für jede Behandlung (15 Magenta Boxen) ergaben sich somit drei Wiederholungen.

Die Weißkleepflanzen wurden mit den Flößchen vorsichtig in neue Magenta Boxen mit frischer, sterilisierter Nährlösung transferiert und für die Exsudatgewinnung an zwei weiteren Folgeterminen herangezogen.

2.5.3 Beprobung der Pflanzen und C/N-Analyse

Am letzten Termin der Exsudatgewinnung wurden zusätzlich die Weißkleepflanzen geerntet und die Frisch- und Trockenmasse von Spross und Wurzel bestimmt. Die Frischmasse diente vor allem als Bezugsgröße für die Exsudatbestimmung des letzten Untersuchungstermins. Die Trockenmasse sollte Aufschluss über den Einfluss der Behandlungsfaktoren CO₂ und Stickstoff liefern. Die Pflanzen in den Boxen der einzelnen Behandlungen wurden in Wurzel und Spross getrennt und zur Bestimmung der Frischmasse gewogen. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial getrocknet und die Trockenmasse durch Rückwaage ermittelt. Die Trocknung erfolgte für ein bis zwei Tage bei 60 °C, um der thermochemischen Degradation des in die Gewebe eingelagerten Stickstoffs vorzubeugen und somit eine spätere C/N-Analyse zu ermöglichen. Ferner wurde das Wurzel/Spross-Verhältnis anhand der Trockenmassedaten berechnet.

Für die C/N-Analyse von Spross und Wurzel musste das getrocknete Pflanzenmaterial zuvor in einer Kugelmühle (Retsch MM200) gemahlen und anschließend mit einer Ultra-Micro-Feinwaage (Mettler Toledo UMT 2) eingewogen werden. Bei der Einwaage in die dafür vorgesehenen Zinnkapseln wurde die unterschiedliche N-Versorgung der Pflanzen berücksichtigt. So wurde für Weißkleepflanzen, die

über den gesamten Zeitraum des Experiments eine ausreichende Stickstoffapplikation erhielten, 2-2,5 mg und für Pflanzen, die unter N-Mangel kultiviert wurden, 3-3,5 mg des Trockenmaterials eingewogen.

Die C/N-Analyse erfolgte nach der Dumas-Methode in einem NCS-Analysator (CE Instruments NCS 2500).

2.6 Gewinnung von Wurzelexsudaten unter unsterilen Versuchsbedingungen

2.6.1 Kultivierung von *Trifolium repens* im hydroponischen Gefäßversuch

In einem Vorversuch sollten die optimalen Anzucht- bzw. Keimungsbedingungen von *T. repens* L. cv. Milkanova ermittelt werden. Hierfür wurden drei unterschiedliche Anzuchtverfahren getestet:

1. Auf Filterpapier
2. In Quarzsand
3. Steril in Magenta Boxen

Für die Anzucht im Filterpapier wurde Cellulose-Filterpapier (Macherey-Nagel Typ 710, 58 x 58 cm) verwendet, das in 60 ml $\frac{1}{4}$ konzentrierter Nährlösung für Dikotyledonen (modifizierte Hoagland-Nährlösung; s.u.) getränkt wurde. Auf den oberen Rand des Filterpapiers wurden 30 Weißkleesamen platziert, das Papier gefaltet und in einer Plastikbox in die Klimakammer gestellt.

In dem zweiten Anzuchtverfahren wurden 30-50 Weißkleesamen in Quarzsand vorkultiviert und während der Keimung in der Klimakammer ebenfalls mit $\frac{1}{4}$ konzentrierter Dikotylen-Nährlösung versorgt. Als Quarzsand wurden zwei unterschiedliche Korngrößen (0,6-1,2 und 0,3-0,8) verwendet, in gleichen Gewichtsanteilen 1:1 gemischt und anschließend gewaschen sowie autoklaviert.

Des Weiteren erfolgte alternativ die sterile Anzucht auf Nähragar in Magenta Boxen. Als Nährmedium wurde $\frac{1}{2}$ konzentrierte Nährlösung nach BROUGHTON & DILLWORTH mit 2 mM KNO_3 als Stickstoffquelle benutzt (Kapitel 2.5.1). Nach Zugabe des Agars (6 g auf 1 Liter) wurde das Medium autoklaviert und anschließend unter sterilen Bedingungen 150 ml des Nähragars in die zuvor sterilisierten Magenta Boxen gefüllt. Die Oberflächensterilisation der Weißkleesamen wurde, wie in Kapitel 2.5.1 bereits beschrieben, durchgeführt. Etwa 30 Samen wurden auf dem Agar in den Boxen ausgesät.

Die Keimung erfolgte zunächst für ein bis zwei Tage in Dunkelheit, durch Abdeckung der Gefäße mit schwarzer Folie. Für das Keimungsexperiment, sowie für den sich anschließenden Hauptversuch, wurden die in Kapitel 2.5.1 angeführten Kultivierungsbedingungen gewählt. Allerdings wurde die Lichtintensität auf $350 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ reduziert, da die Blätter der Pflanzen im zuvor beschriebenen sterilen Exsudatexperiment leichte Licht- bzw. UV-Schädigungen aufwiesen.

Der Vorversuch ergab, dass die Keimungsrate im Vergleich zu den sonst üblichen Anzuchtverfahren, wie auf Filterpapier oder in Quarzsand, nur 30-40% betrug. In den Magenta Boxen hingegen keimten annähernd 80% der Weißklee samen. Deshalb erfolgte die Aussaat bzw. primäre Anzucht von *T. repens* für den hydroponischen Gefäßversuch zunächst unter keimfreien Bedingungen auf Nähragar in Magenta Boxen. Für den Versuch wurden von Beginn an 20 Boxen mit CO_2 begast (800 ppm) und 20 Boxen als Kontrolle ambienten CO_2 -Konzentrationen (400 ppm) ausgesetzt.

Nach Entwicklung der Folgeblätter 1. Ordnung (nach 10 Tagen) erfolgte das Umsetzen der gekeimten Weißkleepflanzen für die weitere hydroponische Anzucht in Pflanzentöpfe mit einem Fassungsvermögen von 2,8 Liter. Die Pflanzen wurden, zur Regeneration eventuell geschädigter Wurzeln, für einen Tag auf gesättigte CaSO_4 -Lösung gesetzt und anschließend für zwei Tage mit $\frac{1}{2}$ konzentrierter Dikotylen-Nährlösung versorgt. Über die restliche Versuchsdauer erhielten die Weißkleepflanzen vollkonzentrierte Nährlösung.

Nährlösung für Dykotyledonen (modifizierte Hoagland-Nährlösung):

Stocklösungen (Makronährstoffe)

Chemikalien	ml/10 Liter	Endkonzentration (100 ml / Liter)
K_2SO_4 (0,5 M)	140 ml	$0,70 \times 10^{-3} \text{ M}$
KCl (0,1 M)	100 ml	$0,10 \times 10^{-3} \text{ M}$
MgSO_4 (0,5 M)	100 ml	$0,50 \times 10^{-3} \text{ M}$
KH_2PO_4 (0,1 M)	100 ml	$0,10 \times 10^{-3} \text{ M}$
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (0,5 M)		$2,00 \times 10^{-3} \text{ M}$
FeEDTA (50 mM)		20 μM

Stocklösung (Mikronährstoffe)**:

Chemikalien	g/Liter
H ₃ BO ₃	6,183
MnSO ₄	0,845
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1,438
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,499
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0,124

**10 ml der Mikronährstoff-Stocklösung zu 10 Litern zwischenverdünnter Nährlösung (s.o.) hinzufügen.

Für die Dikotylen-Nährlösung wurden zunächst die einzelnen Stocklösungen der Makronährstoffe entsprechend ihrer Molaritäten und die Stocklösung der Mikronährstoffe angesetzt. In einem Zwischenverdünnungsschritt wurden zu 10 Liter destillierten Wassers alle Makronährstoff-Stocklösungen – bis auf Ca(NO₃)₂ und FeEDTA – wie oben angeführt sowie 10 ml der Mikronährstoff-Stocklösung hinzugefügt. Schließlich wurde in einem weiteren Verdünnungsschritt (hier: 60 Liter-Ansatz) die endgültige Nährstoffkonzentration der Dikotylen-Nährlösung erreicht und durch Zugabe FeEDTA sowie – je nach Versuchsansatz (s.u.) – mit Ca(NO₃)₂ vervollständigt.

Die Nährlösung wurde jeden zweiten Tag gewechselt, wobei alle Versuchspflanzen bis zum ersten Termin der Wurzelexsudatgewinnung Stickstoff erhielten. Zusätzlich wurden die Pflanzen bei jedem Nährlösungswechsel randomisiert, um Randeffekte ausschließen zu können. Über die gesamte Versuchsperiode erfolgte eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Pflanzenwurzeln über eine mit einem Schlauchsystem verbundene Pumpe. Da im Laufe des Versuchs die jüngsten Blätter Chlorosen aufwiesen, die auf Eisenmangel hindeuteten, wurde die Applikation von FeEDTA zunächst auf 50 µM und letztlich auf 100 µM erhöht.

Insgesamt beinhaltete der Versuchsansatz 36 Pflanzentöpfe mit jeweils 10 Weißkleepflanzen. Um den Einfluss von CO₂ auf die Wurzelexsudation von *T. repens* zu analysieren, wurden 18 Pflanzentöpfe mit CO₂-angereicherter Luft (800 ppm) begast, während weitere 18 Pflanzentöpfe als Kontrolle fungierten und unter ambianter CO₂-Konzentration (400 ppm) kultiviert wurden (Bild 6). Von 18 Töpfen pro Versuchsansatz dienten 10 für die spätere Gewinnung der Einzelexsudate, vier für die Gewinnung von Sammelexsudaten und zwei Töpfe als Ersatz bei Pflanzenverlusten.



Bild 6: 21 Tage alte Weißkleopflanzen in nicht-steriler hydroponischer Kultur.

Des Weiteren wurde – wie zuvor im sterilen Exsudatversuch – auch der Einfluss der Stickstoffversorgung auf die Exsudation untersucht. Hierfür wurde ab dem ersten Termin der Exsudatgewinnung nur noch die Hälfte der Pflanzentöpfe mit Stickstoff in Form von $2 \text{ mM Ca(NO}_3)_2$ versorgt, während die restlichen Pflanzentöpfe die Dikotylen-Nährlösung ohne Stickstoffapplikation erhielten. Der Versuch beinhaltete pro Behandlungsvariante jeweils fünf Wiederholungen.

2.6.2 Gewinnung der Wurzelexsudate

Die Gewinnung der Wurzelexsudate wurde an vier unterschiedlichen Terminen – nach 24, 26, 28 und 30 Tagen der hydroponischen Kultivierung der Weißkleopflanzen – durchgeführt. Sie erfolgte über einen Zeitraum von sieben Stunden in $0,5 \text{ mM CaSO}_4$ -Lösung. In Abhängigkeit von der Masse und Struktur der Wurzeln wurden für diesen Zweck 50 bis 100 ml CaSO_4 -Lösung verwendet.



Bild 7: Gewinnung von Wurzelexsudaten von *T. repens* (24 Tage alt). Vorne: Sammlung von Wurzelexsudaten mehrerer Pflanzen. Hinten: Sammlung von Exsudaten von Einzelpflanzen.

Für die Einzelexsudatgewinnung wurden jeweils zwei Pflanzen pro Pflanzentopf und Wiederholung in ein mit Alufolie umwickeltes Becherglas überführt (Bild 7).

Zusätzlich erfolgte an jedem Versuchstermin die Gewinnung von Wurzelexsudaten mehrerer Pflanzen. Die Pflanzen eines Topfs (10 Stück) wurden hierbei mit dem Deckel auf ein flaches Gefäß gesetzt und die Exsudate über einen Zeitraum von sieben Stunden in 350 bis 425 ml CaSO_4 -Lösung (je nach Wurzelmasse) gesammelt. Diese Sammelexsudate wurden später für die Isolierung phenolischer HPLC-Fractionen (Kapitel 2.7.2) herangezogen. Die verwendeten Pflanzen wurden im Anschluss nicht beprobt, sondern dienten an den folgenden Versuchsterminen der weiteren Gewinnung der Sammelexsudate.

Über ein Schlauchsystem wurde während der Gewinnung der Einzel- sowie der Sammelexsudate eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Weißkleepflanzen gewährleistet. Ferner erfolgte bei jedem Beprobungstermin ein Austausch der Nährlösung unter Berücksichtigung der jeweiligen Behandlungsvariante (mit und ohne N-Applikation). Im Anschluss an die Exsudatgewinnung wurde der Inhalt der Bechergläser in Plastikflaschen gefüllt und bei -20 °C bis zur weiteren Aufbereitung bzw. Analyse der Exsudate aufbewahrt.

2.6.3 Beprobung der Pflanzen und C/N-Analyse

An jedem Versuchstermin wurden die Weißkleepflanzen, von denen zuvor die Einzelexsudate gewonnen wurden, geerntet. Die Pflanzen wurden in Spross und Wurzeln separiert und die Frischmasse ermittelt. Das Pflanzenmaterial wurde, wie zuvor beschrieben (Kapitel 2.5.3), für ein bis zwei Tage bei 60 °C getrocknet und anschließend durch Rückwaage die Trockenmasse berechnet. Abschließend konnte wiederum das Wurzel/Spross-Verhältnis berechnet werden.

Die C/N-Analyse erfolgte nach der in Kapitel 2.5.3 angeführten Dumas-Methode in einem NCS-Analysator, indem zunächst das getrocknete Pflanzenmaterial gemahlen und eingewogen wurde. Bei der Einwaage wurde wiederum die unterschiedliche Stickstoffapplikation der Versuchspflanzen berücksichtigt. Im Gegensatz zur sterilen Kultivierungsmethode wurden für Pflanzen, die über die gesamte Versuchsperiode genügend Stickstoff erhielten, 1-1,5 mg und für Pflanzen mit unzureichender Stickstoffversorgung, 2-2,5 mg bzw. am letzten Beprobungstermin – aufgrund starker N-Mangel-Symptome – 2,5-3 mg Trockensubstanz eingewogen.

2.7 Analyse der Wurzelexsudate

2.7.1 Aufbereitung der Wurzelexsudate

Die Präparation der steril und unsteril gewonnenen Wurzelexsudate (Einzel- wie Sammelexsudate) für die anschließende HPLC-Analyse erfolgte nach dem gleichen methodischen Ansatz. Zunächst wurden die Exsudate im Wasserbad bei 35 °C aufgetaut und anschließend mittels Fiberglas-Vorfilter (Porengröße 0,5-1,0 µm, Schleicher Schuell) gefiltert, um vorhandene Pflanzenpartikel zu entfernen. Von den Exsudaten der steril kultivierten Weißkleepflanzen wurden 100 ml für die Aufbereitung verwendet, von den unsteril gewonnenen Wurzelexsudaten 50 ml (vergl. Versuchsansatz).

Da in der HPLC-Analyse ausschließlich die phenolischen Signalsubstanzen untersucht werden sollten, wurden die hydrophoben Phenole bzw. Flavonoide mit Hilfe einer Festphasenextraktion von den übrigen Bestandteilen der Wurzelexsudate separiert. Die Festphasenextraktion erfolgte unter Verwendung von Sep-Pack Plus C18 Kartuschen (Waters), die zu Beginn mit 10 ml Methanol (für Flüssigkeitschromatographie LiChrosolv, Merck) und 10 ml bi-distilliertem Wasser

konditioniert werden mussten. Um eventuelle CaSO_4 -Rückstände aus der Exsudatlösung restlos zu entfernen, wurde die Kartusche zusätzlich mit 5 ml bidestilliertem Wasser gespült. Die eigentliche Extraktion der Phenole aus der C18-Kartusche erfolgte mit 5 ml Methanol und 5 ml Ethylacetat. Die mit dieser Methode gewonnenen phenolischen Exsudatextrakte wurden in kleinen Glassgefäßen (20 ml) bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ bis weiteren Verarbeitung eingefroren.

Vor der eigentlichen HPLC-Analyse mussten die Extrakte für zwei bis vier Stunden unter Vakuum konzentriert (Speed Vac Concentrator SVC-200H, Savant) werden. Anschließend wurden die so aufkonzentrierten Exsudatextrakte in 500 μl Methanol aufgenommen und für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand konnte nun für die HPLC-Analyse verwendet werden.

Ein Aliquot der steril gewonnen Exsudate wurde zusätzlich einer Hydrolyse unterzogen. Diese Behandlung sollte bei der anschließenden HPLC-Analyse zur Klärung beitragen, ob es sich bei den exsudierten Fraktionen um aglycosidische oder glycosidische Phenole handelt. Für die Hydrolyse wurden 1 ml einer 2 M Trifluoressigsäure und 1 ml Exsudatprobe eineinhalb Stunden gekocht. Nach Abkühlung wurde die Probe mit 500 μl Ethylacetat versetzt, gevortext und schließlich zentrifugiert. Die obere Phase des Hydrolysats wurde vorsichtig abgenommen und die Behandlung mit Ethylacetat wiederholt. Nach der abschließenden Zentrifugation konnte der Überstand, wie oben beschrieben, in der Speed-Vac vakuumkonzentriert, das Konzentrat in 500 μl Methanol aufgenommen und für die Analyse an der HPLC benützt werden.

2.7.2 HPLC-Analyse der Wurzelexsudate

Die zuvor gewonnenen und aufbereiteten Wurzelexsudate von *T. repens* wurden mittels der „High-Pressure-Liquid-Chromatographie“ (HPLC) entsprechend der Polarität der einzelnen Exsudatbestandteile getrennt.

Die für die HPLC-Analyse verwendete Anlage stammte von unterschiedlichen Firmen, bestehend aus:

- HPLC-Pumpe (Sykam S1100)
- Niederdruck-Gradientenmischer (Sykam S8110)
- Autosampler (Jasco 851-AS)
- Säulenofen (Shimadzu CTO-10AS)
- UV-Detektor (Linear UV/Vis 205)
- Daten-System (Axxiom Chromatographie)

Die Trennbedingungen während der Analyse waren wie folgt:

<i>Säule:</i>	250 x 4 mm Hypersil ODS (Grom) Partikelgröße 5 μ , mit Vorsäulenkartusche identischer Packung.
<i>Gradientensystem:</i>	Methanol/Essigsäure-Gemisch A = Methanol; B = 5% Essigsäure
<i>Gradient:</i>	0-10 min: 30% A, 70% B 10-45 min: 40% A, 60% B 45-55 min: 50% A, 50% B 55-57 min: 30% A, 70% B 57-60 min: 30% A, 70% B
<i>Injektionsvolumen:</i>	20 μ l
<i>Volumenstrom der mobilen Phase:</i>	0,5 ml/min
<i>Temperatur:</i>	35 °C
<i>Detektion:</i>	bei 308 nm

Die Identifizierung der unbekannt Phenole erfolgte zunächst mit entsprechenden Standardsubstanzen durch Vergleich der Retentionszeiten. Als synthetische Standardsubstanzen wurden die von REDMOND (1986) und DJORDJEVIC (1987) beschriebenen aktivierenden und inhibitorischen Substanzen der Weißkleeexsudate in einer Konzentration von 2,5 μ mol/Liter und in HPLC-Qualität verwendet (Kapitel 1.4.1): 7,4'-Dihydroxyflavon (Indofine Chemicals), 4'-Hydroxy-7-Methoxyflavon (Indofine Chemicals), Formononetin (Indofine Chemicals) sowie Umbelliferon (Roth). Die Signalsubstanz Geraldon war kommerziell nicht erhältlich. Darüber hinaus wurden folgende synthetische Flavonoide in HPLC-Qualität für die HPLC-Identifikation herangezogen: Liquiritigenin (Indofine Chemicals), Daidzein (Roth), Naringinin (Roth), Genistein (Roth), Isoliquiritigenin (Sigma) und Coumestrol (Sigma).

Durch Integration der Elutionsprofile (Peaks) nach erfolgreicher HPLC-Trennung konnten die Phenole quantifiziert werden. Eine weitere Möglichkeit der Identifizierung war die Anwendung der Co-Chromatographie in Form einer Standardaddition. Hierfür wurde eine Mischung aus einer definierten Menge an Standardsubstanz und Extraktprobe in die HPLC eingespritzt und anschließend die Höhe der einzelnen Peaks verglichen, um Additionen der Substanzen feststellen zu können. Zudem wurde von den einzelnen phenolischen Exsudat- sowie der Standardsubstanzen Wellenlängenscans durchgeführt und verglichen.

Zusätzlich wurde für eine eindeutigere Identifikation der Fraktion C eine Vergleichsanalyse mit ausgewählten synthetischen Flavonoidsubstanzen an der HPLC durchgeführt. Hierbei wurden die Retentionszeiten sowie das Absorptionsverhalten von Apigenin (HPLC-Qualität Roth), 4,4'-Dihydroxy-2'-methoxychalcon (HPLC-Qualität, Apin Chemicals, Abingdon, Großbritannien) und 7,3',4'-Trihydroxyflavon (HPLC-Qualität, Apin Chemicals, Abingdon, Großbritannien) ermittelt.

Für die Massenspektrometrie (MS-Analyse) und den *nod*-Gen-Induktionstest wurden aus den aufbereiteten Sammelexsudaten die phenolischen Einzelfraktionen durch wiederholtes Sammeln an der HPLC gewonnen und vor den weiteren Analysen vakuumkonzentriert.

2.7.3 Massenspektrometrie aufgereinigter HPLC-Fractionen

Die LC-MS-Analyse diente der weiteren Identifizierung der HPLC-Fractionen. Die Analyse erfolgte an einer Hewlett Packard HPLC Model 1100 unter Verwendung eines Dioden-Array-Detektors (220-400 nm) und einem Lösungsgradienten bestehend aus 0,01 M Ammoniumformiat-Puffer (pH 4.0) [A] und 100% Methanol [B]. Die Probe (10 µl) wurde mit einer Flußrate von 0,5 ml /Minute injiziert und nach folgenden Gradienten getrennt:

0-20 min: 20% A, 80% B

20-24 min: 0% A, 100% B

24-30 min: 80% A, 20% B

Als Säule kam eine Phenomex Luna C18:1 (250 x 3 mm, 5 µm; Phenomex Inc.) zum Einsatz. Die MS-Analyse wurde mit VG Platform II Quadropol Elektrospray Massenspektrometer (Micromass) ausgeführt, der mit einem Elektrospray Interface (ESI) ausgestattet war. Die eigentliche Messung erfolgte im ESI-Modus (ESI-Kathoden Temperatur 120 °C). Als weitere wichtige Messparameter wurden die Kapillarensparnung auf 3,5 kV, die Mündungssparnung auf 40 V und die Linsensparnung auf 0,5 kV eingestellt.

2.7.4 *Nod*-Gen-Induktionstest

Im *nod*-Gen-Induktionstest wurde die Signalfunktion der aufgereinigten HPLC-Fractionen auf die Aktivierung der Nodulationsgene von *R. I. bv. trifolii* untersucht. Für diesen Test, durchgeführt mit leichten Modifikationen nach der Methode von MILLER (1972), ist ein spezieller Reporterstamm – *R. trifolii* nod218 – notwendig (DJORDJEVIC et al. 1987), der das *nodA-lacZ*-Gen auf dem Sym-Plasmid enthält und eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin aufweist. Das *nodA-lacZ*-Gen ist eine durch Transformation (Konjugation) entstandene Fusion des *nodA*-Gens, isoliert aus einem Wildstamm von *R. I. bv. trifolii*, und des aus *E. coli* stammenden *lacZ*-Gens. Das *lacZ*-Gen kodiert das Enzym β -Galactosidase, welches für die Hydrolyse des Substrats β -Galactopyranosid verantwortlich ist.

In dem Induktionstest nach MILLER (1972) wird die Enzymaktivität der β -Galactosidase mittels eines farblosen Substrats – *o*-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG) – ermittelt. Im Urzustand ist dieses Substrat farblos, aber in Anwesenheit von β -Galactosidase wird es in die Bestandteile Galactose und *o*-Nitrophenyl gespalten. Das Spaltprodukt *o*-Nitrophenyl ist gelb und seine Absorption kann bei 420 nm gemessen werden. Die Menge an produziertem *o*-Nitrophenyl ist proportional zu der Menge an vorhandenem Enzym und zu der Zeit, die das Enzym benötigt, um mit ONPG zu reagieren. Die gemessene β -Galactosidase-Aktivität steht somit im direkten Verhältnis zu dem Aktivierungspotential der Nodulationsgene.

Für den Induktionstest wurden ausschließlich Zellen in der frühen Log-Phase verwendet, da nur hier eine *nod*-Gen-Induktion zu beobachten ist. Die Kultivierung von *R. trifolii* nod218 (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. M. Djordjevic, The Australian National University) erfolgte zunächst in Petrischalen mit modifiziertem Bergersen Medium (BMM; BERGERSEN 1961), das 100 μ g/ml Kanamycin enthielt, für zwei Tage bei 28 °C. Anschließend wurden frische Zellen in 5 ml sterilisiertes flüssiges BMM mit 50 μ g/ml Kanamycin in kleine Reagenzgläser (130 x 16 mm) transferiert und wiederum bei 28 °C inkubiert. Nach 12 Stunden wurde die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) im Spektralphotometer (Zeiss PM 7) bestimmt, die Bakteriensuspension auf $OD_{600} = 0,03$ mit BMM verdünnt und das Wachstum bis zur frühen Log-Phase des Reporterstamms ($OD_{600} = 0,3$) für 10-11 Stunden fortgesetzt. Die frischen Bakterienzellen konnten nun für den Induktionstest verwendet werden.

Modifiziertes Bergersen Medium (BMM):

Stocklösungen/Chemikalien	Menge/1 Liter
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O (9%ige Stocklsg.)	4 ml
MgSO ₄ · 7H ₂ O (8%ige)	1 ml
FeCl ₃ · 6H ₂ O (0,3%ige)	1 ml
CaCl · 2H ₂ O (4%ige)	1 ml
Gamborgs Spurenelemente***	1 ml
Vitamin-Lösung****	1 ml
Mononatriumglutamat	0,5 g
Hefe-Extrakt	0,5 g
Mannitol	3 g (für Agar-Medium) 10 g (für Flüssigmedium)
Agar	12 g

Einstellung des pH-Werts auf 6,8.

*** Gamborgs Spurenelemente:

Chemikalien	g/1Liter
MnSO ₄ · 2H ₂ O	10 g
H ₃ BO ₃	3 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	3 g
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0,25 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,25 g
CoCl · 6H ₂ O	0,35 g

**** Vitamin-Lösung:

Chemikalien	mg/100 ml
Biotin	20 mg
Thiamin HCl	200 mg

Die Induktion der Nodulationsgene erfolgte durch Zugabe einzelner HPLC-Fractionen zu den Zellkulturen und anschließender Inkubation für drei Stunden bei 28 °C. Da die Konzentration der Fractionen nicht bekannt war, wurde für jeden Versuchsansatz 10 µl der jeweiligen Fraction verwendet. Für die spätere Berechnung der β -Galactosidase-Units wurde vor der eigentlichen Messung der β -

Galactosidase-Aktivität die OD_{600} der Bakteriensuspension bestimmt. Anschließend wurden 0,5 ml der induzierten Zellkultur und 0,5 ml Z-Puffer zur pH-Stabilisierung in ein Reaktionsgefäß (2 ml) gegeben.

Z-Puffer:

Chemikalien	g/Liter
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	16,1
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	5,5
KCl	0,75
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,246
β -Mercaptoethanol	2,7 ml

Einstellung des pH-Werts auf 7,0.

Die nachfolgende Lyse der Zellmembran erfolgte mit 40 μ l Chloroform und 20 μ l SDS (0,1%). Nach Erwärmung der Reaktionsgefäße für fünf Minuten bei 28 °C im Wasserbad, wurde die Reaktion durch das Hinzufügen von 0,2 ml ONPG (4 mg/ml) gestartet und die Zeit bis zur intensiven Gelbfärbung der Lösung ermittelt. Sobald sich eine ausreichende Gelbfärbung entwickelt hatte, wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml Na_2CO_3 (1 M) gestoppt. Die Proben wurden eine Minute lang zentrifugiert und anschließend für jedes Reaktionsgefäß die Absorption bei 420 nm gemessen. Lag der Absorptionswert bei der Messung übereins, wurde die Messung der β -*Galactosidase*-Aktivität wiederholt, indem die zu testende Fraktion vor der Zugabe zu der Zellkultur entsprechend verdünnt wurde.

Jeder Versuchsansatz bestand aus drei Wiederholungen, d.h., jede HPLC-Fraktion wurde dreimal auf seine Fähigkeit, die Nodulationsgene zu aktivieren, getestet und der Mittelwert bestimmt. Der Induktionstest beinhaltete zudem zwei Kontrollen:

- *Kontrolle A*: nicht inokuliertes Medium (Blindprobe)
- *Kontrolle B*: inokuliertes Medium ohne Zugabe/Inkubation der HPLC-Fraktionen

Da die endogene β -*Galactosidase*-Aktivität weder thermisch (Erhitzen auf 42 °C) noch chemisch (durch Zugabe von Glucose) inaktiviert werden konnte, diente die Kontrolle B der Bestimmung der endogenen β -*Galactosidase*-Aktivität und wurde in der Berechnung der β -*Galactosidase*-Units berücksichtigt. Die Bestimmung der β -*Galactosidase*-Aktivität erfolgte letztendlich durch Kalkulation der β -

Galactosidase-Units modifiziert nach MILLER (1972) unter Verwendung nachstehender Formel:

$$Units = 1000 \times \frac{(OD_{420} Probe - OD_{420} Kontr.B)}{t \times v \times OD_{600}}$$

$OD_{420}Probe$ = optische Dichte der Reaktionslösung

$OD_{420}Kontr.B$ = optische Dichte der Kontrolle B (reflektiert die endogene β -*Galactosidase*-Aktivität)

OD_{600} = Zelldichte kurz vor der Reaktion

t = Reaktionszeit in Minuten

v = Volumen in ml der Bakterienkultur, das für den Test verwendet wurde

2.8 Statistische Auswertung

Der Vergleich und die statistische Auswertung der rep-PCR-DNA Fingerprints erfolgten nach der Methode von DOMBEK (2000) mit der Software BioNumerics (Version 3.00, Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Ähnlichkeitskoeffizienten wurden anhand der Kurven-basierten Methode mittels des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten generiert. Des Weiteren wurden die rep-PCR-DNA Fingerprint-Daten in eine binäre Tabelle überführt, die das Vorhandensein oder Fehlen der einzelnen Banden zeigte. Diese binären Daten wurden anschließend in einer Hauptkomponenten Analyse („Principal Component Analysis“) analysiert und eine Kovarianzstruktur berechnet (DOMBEK et al. 2000).

Die Biomassedaten von *T. repens*, der pflanzliche C- und N-Konzentrationen sowie die Mengen an exsudierten Phenolen wurden unter Verwendung derselben statistischen Methode ausgewertet. Für die unter sterilen Bedingungen gewonnenen Wurzelexsudate wurde die Berechnung auf die Anzahl von Pflanzen pro Magenta Box bezogen. Ausschließlich am letzten Termin der Exsudatgewinnung konnte die Wurzel-Frischmasse als Bezugsgröße herangezogen werden. Für die Auswertung der unter unsterilen Versuchsbedingungen gewonnenen Exsudate wurde ebenfalls die Wurzel-Frischmasse als Bezugsgröße gewählt. Die Versuchsanordnung war ein vollfaktorielles Design mit CO₂ und N-Versorgung als Untersuchungsfaktoren. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Kolomogorov-Smirnov-Goodness-of-fit-Test getestet. Des Weiteren erfolgte eine Überprüfung auf Homogenität der Varianzen mittels des Levene's-Test. Der Einfluss von CO₂ und N-Versorgung auf die Parameter wurde unter Verwendung

der zwei-faktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) quantifiziert und hierbei jeder Termin einzeln ausgewertet. Für den Vergleich der Mittelwerte wurde der Tukey's HSD-Test oder HSD-Test für ungleiche Stichprobenumfänge verwendet und die Unterschiede mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet, wobei die Behandlung mit dem höchsten Mittelwert mit „a“ gekennzeichnet wurde. Die gesamten Berechnungen erfolgten mit der Software STATISTICA (Version 6.0, StatSoft). Betrug die Irrtumswahrscheinlichkeit weniger als 5% ($P < 0,05$), wurden die Unterschiede als signifikant betrachtet.

Da der Tukey's HSD-Test ein stärker konservativer bzw. versuchsbezogener Test ist, der Mittelwerte miteinander vergleicht, werden seltener signifikante Unterschiede gefunden. Deshalb können sich die Angaben über das Signifikanzverhalten der Versuchsfaktoren im Mittelwertvergleich und in der Varianzanalyse, die den gesamten Stichprobenumfang berücksichtigt, unterscheiden.

3 ERGEBNISSE

3.1 Auswirkung von erhöhter atmosphärischer CO₂-Konzentration auf die genetische Diversität der Rhizobien-Population im Swiss FACE

3.1.1 Nodulationsfähigkeit der isolierten Bakterien-Stämme

Im Pflanzeninfektionstest konnte zwei bis drei Wochen nach der Inokulation mit potentiellen Rhizobien-Bakterien bei etwa 1/3 der Weißkleepflanzen eine Nodulation beobachtet werden (Bild 8). Die nodulierten Pflanzen zeigten aufgrund der Fähigkeit zur symbiotischen N₂-Fixierung einen deutlich besseren Wuchs und keinen Stickstoffmangel.

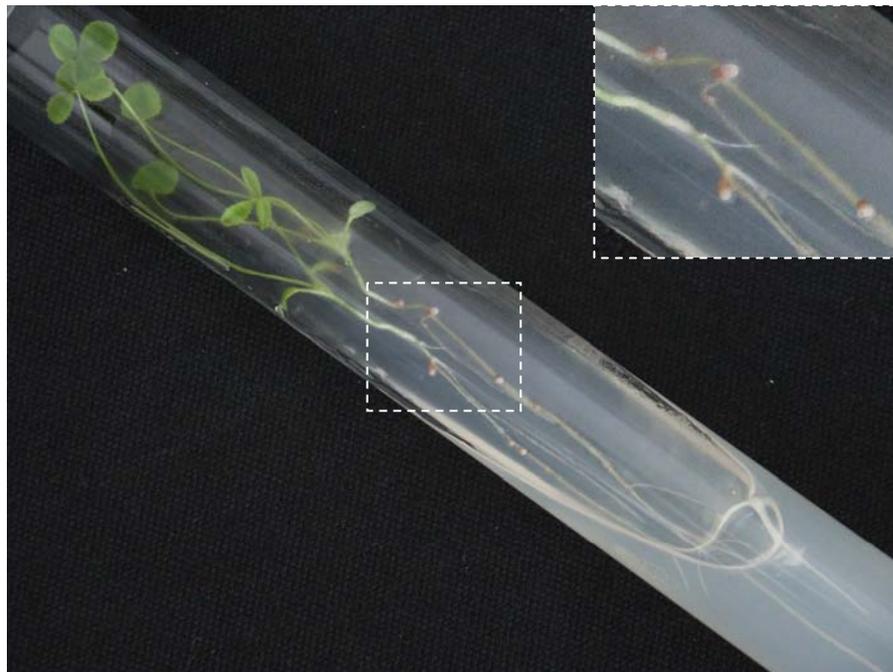


Bild 8: Weißkleepflanzen mit Wurzelknöllchen nach 2,5 Wochen Wachstum nach der Inokulation. Vergrößert dargestellt sind die durch Leghämoglobin rosa gefärbten Knöllchen.

Weißkleepflanzen, bei denen sich keine Knöllchen entwickelten, wiesen nach zweiwöchigem Wachstum auf N-freiem Schrägagar infolge des N-Mangels charakteristische Chlorosen auf (Bild 9). Zudem waren die Wurzeln dieser Pflanzen deutlich länger und stärker verzweigt. Von den ursprünglich 360 aus den Wurzelknöllchen von *T. repens* isolierten Bakterien zeigten 130 Stämme die Fähigkeit zur Nodulation und konnten demzufolge als *R. I. bv. trifolii*-Stämme identifiziert werden. 72 Isolate stammten aus den Wurzelknöllchen von Pflanzen, die auf den Kontrollflächen des Swiss FACEs kultiviert wurden, und 58 von Versuchsfeldern, die der CO₂-Begasung unterlagen.

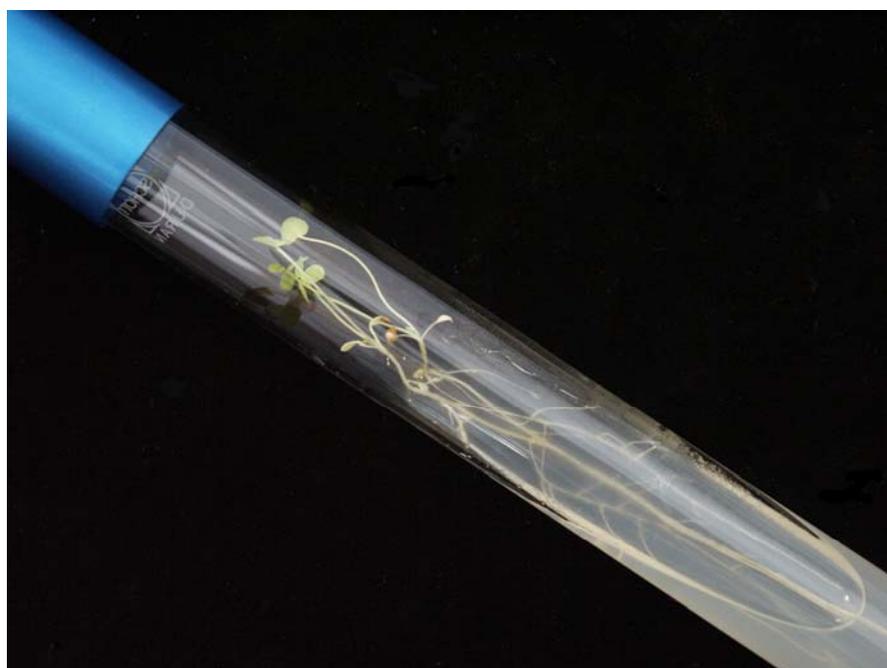


Bild 9: Chlorotische Weißkleepflanze ohne Knöllchen nach 2,5 Wochen Wachstum auf N-freiem Schrägagar.

3.1.2 Genetische Diversität von *R. I. bv. trifolii* nach 10-jähriger CO₂-Begasung im Swiss FACE

Die rep-PCR-DNA Fingerprinting-Analyse (Bild 10) und die anschließende statistische Auswertung der Fingerprints durch die Hauptkomponentenanalyse („Principal Component Analysis“) ergaben, dass sich die aus dem Swiss FACE stammenden *R. I. bv. trifolii*-Stämme in zwei Gruppen, auch Cluster genannt, auftrennten (Abb. 6).

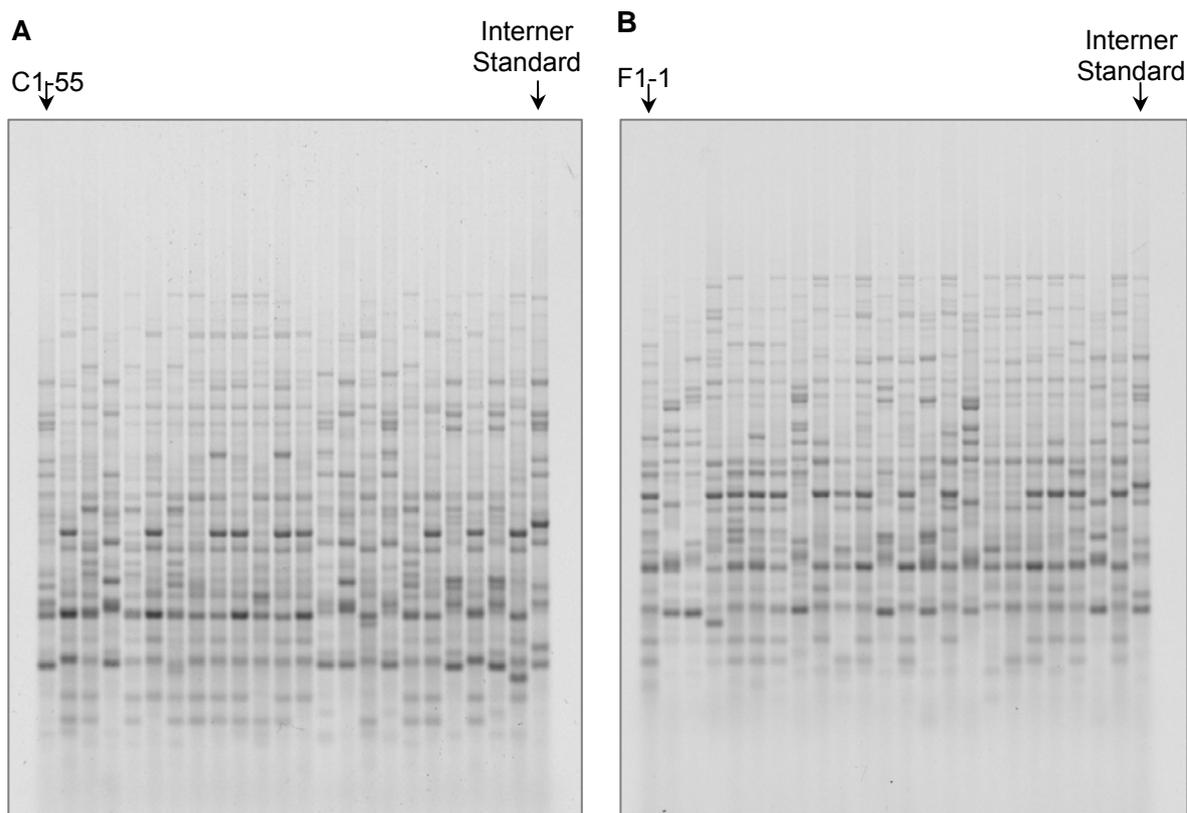


Bild 10: Ausgewählte rep-PCR-Fingerprints der genomischen DNA von *R. l. bv. trifolii*-Isolaten. Stämme in Bild A (u.a. C1-55) wurden aus Knöllchen von Weißkleeplanzen isoliert, die unter ambienten CO₂-Konzentration (350 ppm) wuchsen. Stämme im Bild B (u.a. F1-1) stammen aus Knöllchen von Pflanzen, die unter erhöhter CO₂-Konzentration (600 ppm) kultiviert wurden. Als interner Standard diente der *R. l. bv. trifolii*-Stamm DSM 30141.

Der Gruppe I konnten 100% und 83% der Rhizobien-Stämme aus dem Kontrollring 3 (C3) und aus dem CO₂-begasten Ring 3 (F3) zugeordnet werden. Diese Gruppe enthielt zudem eine annähernd gleiche Anzahl von Isolaten, die zu 48% von Versuchsflächen mit erhöhter CO₂-Konzentration und zu 43% von den Kontrollflächen stammten (Abb. 6). Ähnlich verhielt es sich bei der Gruppe II: obwohl in dieser Gruppe 72% und 87% der Rhizobien-Isolate von den mit CO₂-begasten Ringen 1 und 2 entfielen, beinhaltete die Gruppe II zu fast gleichen Anteilen Rhizobien-Stämme von beiden CO₂-Behandlungsvarianten. 52% der Isolate in Gruppe II stammten von den CO₂-Begasungsflächen, während 57% ursprünglich von den Kontrollringen kamen (Abb. 6). Die rep-PCR-Fingerprints zeigten keinen nennenswerten Einfluss von erhöhtem CO₂ auf das Muster der PCR-Amplifikate und somit auf die Populationsstruktur von *R. l. bv. trifolii* in Abhängigkeit der Behandlungsvarianten. Die *R. l. bv. trifolii*-Stämme, isoliert aus Wurzelknöllchen von Weißkleeplanzen, die unter erhöhter CO₂-Konzentration kultiviert wurden, unterschieden sich genetisch nicht von den Stämmen, die aus Knöllchen von Pflanzen unter ambienter CO₂-Konzentration isoliert wurden.

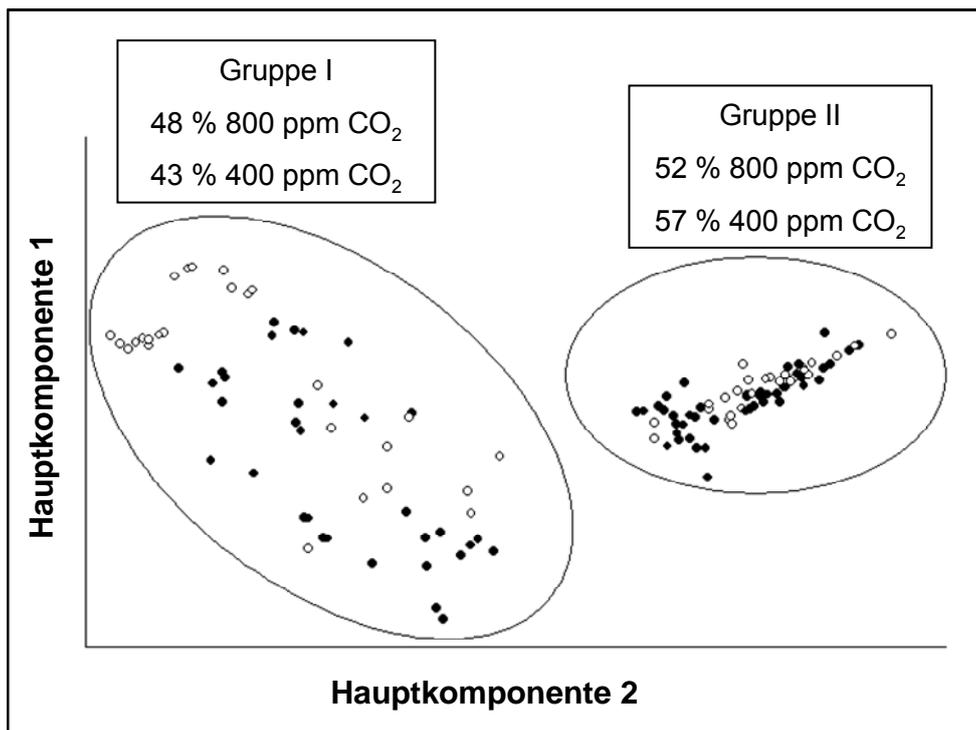


Abb. 6: Darstellung der Beziehung isolierter *R. l. bv. trifolii*-Stämme aus dem Swiss FACE. Nach Auswertung der rep-PCR-DNA Fingerprints mittels Hauptkomponentenanalyse können die Isolate in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die schwarzen (●) und weißen (○) Punkte repräsentieren einzelne isolierte Stämme von Weißkleeplätzen, die unter ambienten (350 ppm) und erhöhten CO₂-Konzentrationen (600 ppm) kultiviert wurden.

3.2 Auswirkung von erhöhtem atmosphärischem CO₂ und N-Versorgung auf die Wurzelexsudation von *T. repens*

3.2.1 Analyse von Pflanzen und Wurzelexsudaten aus steriler Kultur

3.2.1.1 Einfluss von CO₂-Konzentration und N-Versorgung auf das Spross- und Wurzelwachstum von *T. repens*

Für die steril kultivierten Weißkleeplätzen wurde zunächst der Einfluss von erhöhter CO₂-Konzentration und der N-Versorgung auf die Biomasseproduktion von *T. repens* betrachtet. In diesem Zusammenhang konnten frühzeitig visuelle Wachstumsunterschiede infolge der beiden Behandlungsvarianten beobachtet werden. Weißkleeplätzen, die unter erhöhten CO₂-Konzentrationen (800 ppm) aufwuchsen, zeigten bereits nach 7-10 Tagen ein deutlich höheres Spross- und Wurzelwachstum, verglichen mit denen aus ambienter CO₂-Konzentration

(400 ppm). Allerdings waren die sichtbaren Unterschiede zum Ende des Experiments weniger deutlich ausgeprägt (Bild 11). Auch die unterschiedliche N-Applikation wirkte sich erwartungsgemäß auf die Biomasseproduktion von *T. repens* aus. So ließen die Pflanzen, die ab dem fünfzehnten Versuchstag keine zusätzliche Versorgung an Stickstoff erhielten, bereits nach vier Tagen leichte N-Mangel-Symptome in Form charakteristisch ausgeprägter Chlorosen erkennen (Bild 11). Zudem wurde bei diesen Weißkleepflanzen aufgrund der unzureichenden N-Versorgung ein erhöhtes Wurzelwachstum detektiert.



Bild 11: Einfluss von erhöhter atmosphärischer CO₂-Konzentration und N-Versorgung auf das Wachstum von 19 Tage alten Weißkleepflanzen. *Links:* Weißkleepflanzen, kultiviert unter 400 und 800 ppm CO₂ bei ausreichender N-Versorgung. *Rechts:* Weißkleepflanzen mit unterschiedlicher N-Versorgung, kultiviert bei ambienter CO₂-Konzentration.

Die visuell beobachteten CO₂- und N-Einflüsse wurden anhand von Trockenmassedaten der 19 Tage alten Weißkleepflanzen bestätigt. Für den Behandlungsfaktor CO₂ wurde ein signifikanter Wachstumseinfluss in beiden N-Behandlungsvarianten für Spross und Wurzel beobachtet (Abb. 7). Die Erhöhung der CO₂-Konzentration führte bei mit Stickstoff gedüngten Pflanzen zu einer Steigerung der Spross-Trockenmasse um 93% und der Wurzel-Trockenmasse um 133%, verglichen mit den Kontrollpflanzen unter ambienter CO₂-Konzentration. Hingegen wiesen Weißkleepflanzen, die unzureichend mit Stickstoff versorgt wurden, eine weniger signifikante Beeinflussung durch CO₂ auf, bei der das Trockengewicht des Sprosses um 64% und das der Wurzel um 100% zunahm.

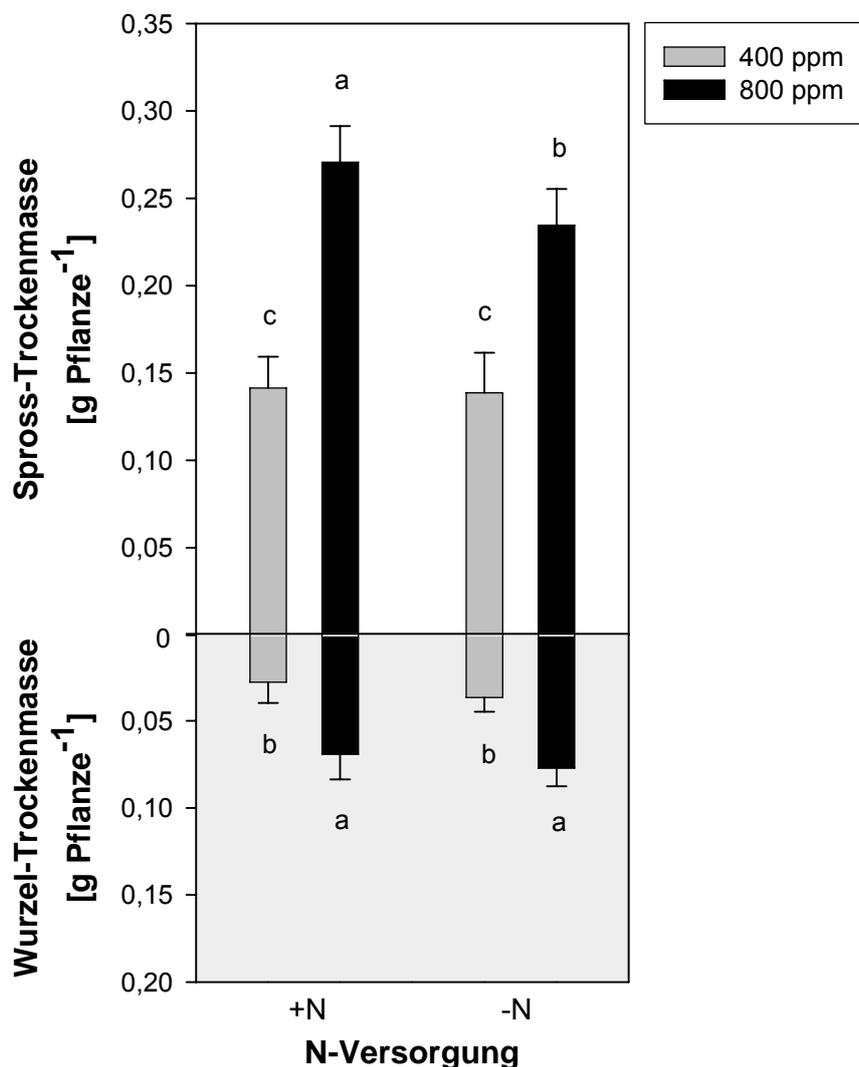


Abb. 7: Spross- und Wurzel-trockenmasse von steril kultivierten *T. repens*-Pflanzen in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration und der N-Versorgung. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 15$, $P < 0,05$).

Die unzureichende N-Versorgung bewirkte bei 400 ppm CO₂ keine Veränderung in der Biomasse von *T. repens*. Demgegenüber hatte ein Mangel an Stickstoff bei gleichzeitig erhöhter CO₂-Konzentration eine unterschiedliche Wachstumsreaktion von Spross und Wurzel zur Folge. Die Spross-Trockenmasse zeigte unter N-Mangel einen geringeren (14%), aber trotzdem signifikanten CO₂-Düngungseffekt gegenüber den Vergleichspflanzen bei ausreichender N-Applikation. Für das Sprosswachstum wies nur die ANOVA, die den gesamten Stichprobenumfang berücksichtigt, eine signifikante Wechselwirkung von CO₂ und Stickstoff nach

($P=0,003$; Tab. A 1). Darüber hinaus bewirkte N-Mangel tendenziell ein erhöhtes Wurzelwachstum der Weißkleepflanzen. Die CO_2 -Reaktion der Weißkleepflanzen war somit an die N-Versorgung gekoppelt (Interaktionseffekt).

Der zuvor nachgewiesene CO_2 - und N-Einfluss auf die Biomasseproduktion von *T. repens* spiegelte sich auch im Wurzel/Spross-Verhältnis wieder. So konnte in beiden Behandlungsvarianten ein tendenzieller, teilweise signifikanter Anstieg gegenüber den Kontrollbehandlungen beobachtet werden (Tab. 1). Die Erhöhung der CO_2 -Konzentration bewirkte einen Anstieg des Wurzel/Spross-Verhältnisses in beiden N-Behandlungsvarianten verglichen mit Weißkleepflanzen, die unter ambienter CO_2 -Konzentration kultiviert wurden. Allerdings war dieser CO_2 -Effekt laut Mittelwertsvergleich (Tab. 1) nicht signifikant. Hingegen zeigte die ANOVA, dass CO_2 das Wurzel/Spross-Verhältnis signifikant beeinflusste ($P=0,004$). Dieser Anstieg im Wurzel/Spross-Verhältniss ist mit der höheren CO_2 -Stimulation der unterirdischen Biomasseproduktion der Weißkleepflanzen zu erklären. Darüber hinaus bewirkte N-Mangel sowohl unter ambienten als auch unter erhöhten CO_2 -Bedingungen eine signifikante Steigerung des Wurzel/Spross-Verhältnisses von 40% bzw. 32%.

Die Resultate belegen, dass sowohl eine erhöhte CO_2 -Versorgung als auch ein erhöhtes N-Angebot das Spross- und Wurzelwachstum von *T. repens* beeinflussten, wobei das Ausmaß des CO_2 -Einflusses wiederum von der jeweiligen N-Versorgung abhängig war (Interaktionseffekt).

Tab. 1: Wurzel/Spross-Verhältnis [TM] von steril kultivierten Weißkleepflanzen (19 Tage alt) in Abhängigkeit der atmosphärischen CO_2 -Konzentration und der N-Versorgung. Angegeben sind die Mittelwerte ($n = 15$, $P < 0,05$).

Pflanzenalter [Tage]	CO_2 -Konzentration	N-Versorgung	Wurzel/Spross-Verhältnis
19	400 ppm	+N	0,20 ^c
		-N	0,28 ^{ab}
	800 ppm	+N	0,25 ^{bc}
		-N	0,33 ^a

3.2.1.2 Veränderung der C- und N-Konzentration durch CO₂ und N-Versorgung

CO₂-Konzentration und N-Versorgung beeinflussten die C- und N-Konzentrationen der Weißkleepflanzen sowohl im Einzel- als auch im Interaktionseffekt signifikant (Abb. 8). Allerdings ist der Einfluss der N-Versorgung auf den Nährstoffgehalt von *T. repens* stärker ausgeprägt als die Beeinflussung durch CO₂.

Unter unzureichender N-Versorgung kultivierte Weißkleepflanzen zeigten im Spross eine minimale, aber signifikante Steigerung der C-Konzentration infolge von erhöhtem CO₂ (Abb. 8). Gegensätzlich verhielt es sich in der Wurzel: nur unter ausreichender N-Applikation hatte CO₂ eine signifikante Wirkung, bei der eine geringfügige Verminderung der C-Konzentration gegenüber der Kontrollbehandlung beobachtet werden konnte. Allerdings wurde der absolute C-Gehalt in Spross und Wurzel (Daten nicht aufgeführt) deutlich durch CO₂ erhöht (Abb. 7 und Abb. 8). Darüber hinaus wurde unabhängig von der CO₂-Behandlungsvariante eine signifikante, aber geringe Erhöhung der C-Konzentration in Spross und Wurzel von *T. repens*-Pflanzen unter N-Mangel nachgewiesen, die mit dem Rückgang der N-Konzentration infolge der N-Limitierung korrelierte.

Die N-Konzentration von *T. repens* wurde erwartungsgemäß maßgeblich durch die unterschiedliche N-Versorgung beeinflusst (Abb. 8). Dagegen war der CO₂-Einfluss auf die N-Konzentration in der Biomasse von *T. repens* unvergleichlich gering. Nur bei unzureichender N-Düngung konnte ein signifikanter Effekt von CO₂ auf die Spross-N-Konzentration detektiert werden, der sich in einer Reduzierung desselben um 10% äußerte (Interaktionseffekt). Des Weiteren wiesen Pflanzen, die während des Versuchs keine zusätzliche N-Applikation erhielten, einen starken Rückgang der N-Konzentration in beiden CO₂-Behandlungsvarianten, sowohl im Spross (22% bei 400 ppm und 29% bei 800 ppm) als auch in der Wurzel (38% bei 400 und 800 ppm) auf. Die durchschnittliche Konzentration an Stickstoff lag für Pflanzen mit ungenügender N-Versorgung in Spross und Wurzel unter 4,4%. Weißkleepflanzen in der vegetativen Phase sollten laut REUTER & ROBINSON (1997) einen Mindestgehalt an Stickstoff von 4,4% aufweisen. Folglich waren die Pflanzen in diesem Versuch ungenügend mit Stickstoff versorgt und litten unter N-Mangel. Diese Ergebnisse stehen im engen Zusammenhang mit den visuellen Beobachtungen, die zuvor einen N-Mangel der Weißkleepflanzen andeuteten. Dagegen hatten Pflanzen, die zu jedem Zeitpunkt des Versuchs zusätzlich mit Stickstoff gedüngt wurden, eine N-Konzentration von bis zu 5,6% und waren, wie Vergleichswerte in der Literatur belegen (REUTER & ROBINSON 1997), somit ausreichend mit Stickstoff versorgt.

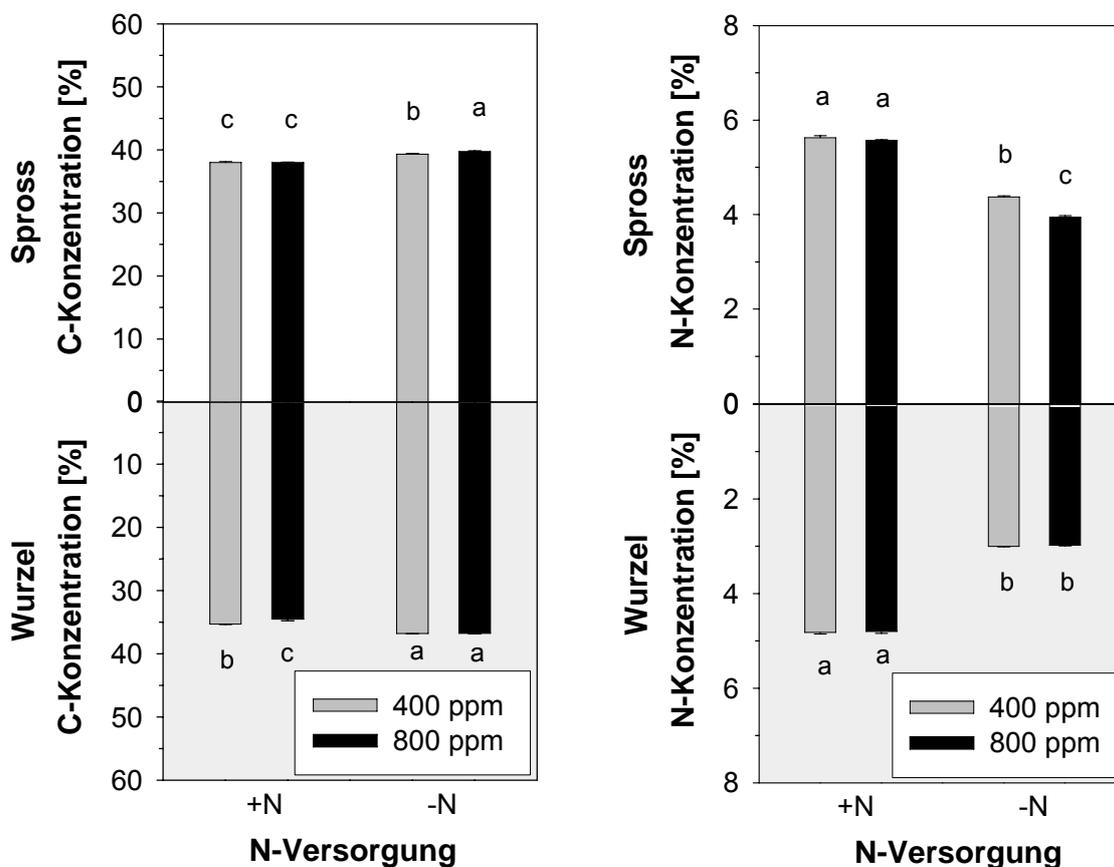


Abb. 8: Prozentuale C- und N-Konzentration (bezogen auf die Trockenmasse) in Spross und Wurzel von 19 Tage alten *T. repens*-Pflanzen in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration und der N-Versorgung. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 15$, $P < 0,05$).

Die unterschiedlichen CO₂- und N-Einflüsse auf die C- und N-Konzentrationen von *T. repens* spiegeln sich folglich auch im C/N-Verhältnis von Spross und Wurzel wieder. Lediglich bei unzureichender N-Applikation konnte ein signifikanter Effekt von CO₂ auf das C/N-Verhältnis im Spross (Tab. 2) beobachtet werden, der sich in einer Erhöhung um 12% äußerte (Interaktionseffekt). Dagegen war der Einfluss der N-Versorgung auf das C/N-Verhältnis sowohl im Spross als auch in der Wurzel deutlich signifikant ausgeprägt. Für den Spross wurde unter ambienter CO₂-Konzentration infolge unzureichender N-Versorgung eine prozentuale Steigerung des C/N-Verhältnisses um 34% und unter erhöhten CO₂-Bedingungen um 48% festgestellt. Wie die Daten belegen, wirkte sich die unterschiedliche N-Versorgung auf das Wurzel C/N-Verhältnis stärker aus. So wurde bei 400 ppm CO₂ ein Anstieg von 67% und bei 800 ppm CO₂ eine Steigerung von 72% aufgrund der N-Mangel-Situation verzeichnet.

Der Einfluss der CO₂-Konzentration auf den Nährstoffstatus von *T. repens* war in dem angeführten Versuch minimal und nur teilweise signifikant. Hingegen konnte ein deutlicher und signifikanter Einfluss der N-Versorgung auf die C- und N-Konzentration sowie das C/N-Verhältnis beobachtet werden.

Tab. 2: C/N-Verhältnis in Spross und Wurzel von steril kultivierten Weißkleepflanzen (19 Tage alt) in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration und der N-Versorgung. Angegeben sind die Mittelwerte ($n = 15$, $P < 0,05$).

Pflanzenalter [Tage]	CO ₂ -Konzentration	N-Versorgung	Spross C/N-Verhältnis	Wurzel C/N-Verhältnis
19	400 ppm	+N	6,76 ^c	7,33 ^b
		-N	9,03 ^b	12,25 ^a
	800 ppm	+N	6,83 ^c	7,20 ^b
		-N	10,12 ^a	12,38 ^a

3.2.1.3 Identifikation phenolischer Wurzelexsudate mittels HPLC-Analyse

Mittels der HPLC-Analyse sollten die einzelnen phenolischen Komponenten der steril gewonnenen Wurzelexsudate von *T. repens* einerseits identifiziert und darüber hinaus der Einfluss der verschiedenen Behandlungsvarianten auf die Exsudation untersucht werden.

Bei der HPLC-Analyse betrug die Zeitspanne für die Trennung einer Probe 60 Minuten. Die Auftrennung des Exsudatgemischs erfolgte entsprechend der Polarität der einzelnen Komponenten. Substanzen mit höherer Polarität wurden demnach in der Anfangsphase der Analyse detektiert, während unpolare Substanzen erst im späteren Verlauf erfasst wurden. Insgesamt wurden bei der HPLC-Analyse der steril gewonnenen Weißkleexsudate sieben Einzelsubstanzen nachgewiesen (Abb. 10). Ein Vergleich der Retentionszeiten der detektierten Substanzen mit den bekannten Standardsubstanzen zeigte, dass neben der für die *nod*-Gen-Induktion wichtigen Signalsubstanz 7,4'-DHF auch das antagonistisch wirkende Umbelliferon in dem Exsudatgemisch vorkam (Abb. 9, Abb. 10). Eine zusätzlich durchgeführte Standardaddition bestätigte dieses Ergebnis. Umbelliferon erschien im HPLC-Chromatogramm zusammen mit zwei weiteren unbekanntem Fraktionen – A und B – bei einer Retentionszeit von acht bis zehn Minuten nach Einspritzung der Exsudatprobe.

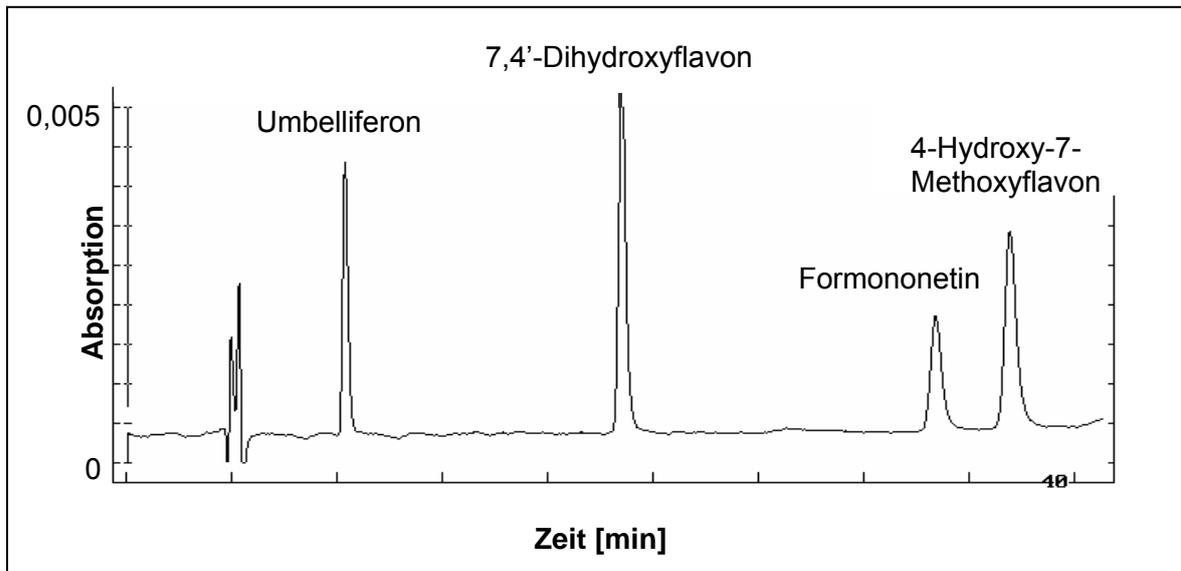


Abb. 9: Chromatogramm eines Standards mit 7,4'- Dihydroxyflavon, 4-Hydroxy-7-Methoxyflavon, Umbelliferon und Formononetin.

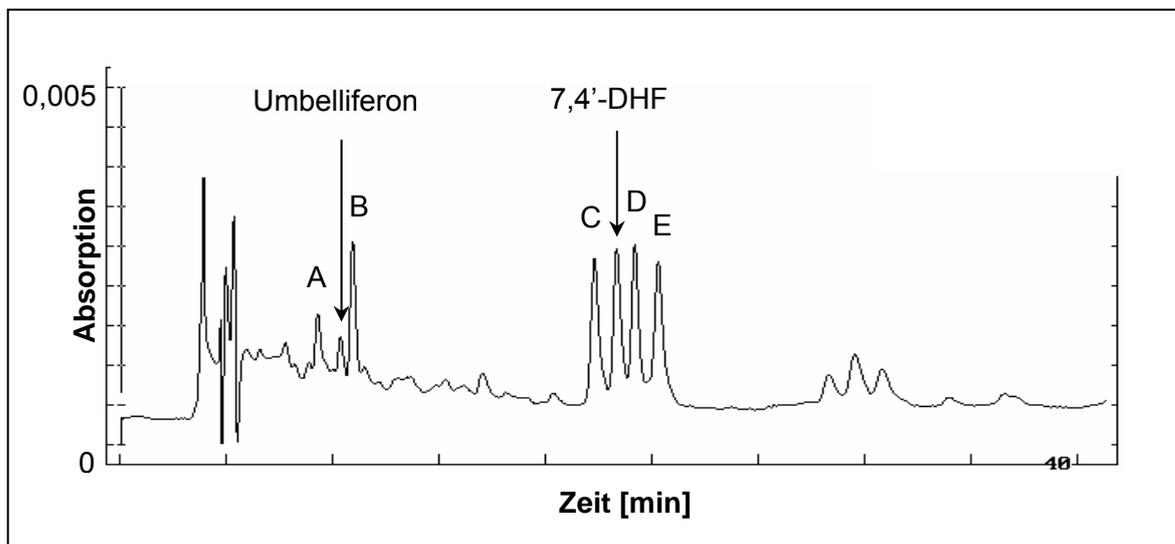


Abb. 10: Chromatogramm einer steril gewonnenen Exsudatprobe (800 ppm CO₂ und +N). Neben Umbelliferon und 7,4'-Dihydroxyflavon (7,4'-DHF) konnten die unbekannt Fraktionen A, B, C, D und E detektiert werden.

Eine zweite Gruppe von vier Einzelsubstanzen wurde nach 20 bis 25 Minuten detektiert, zu der neben 7,4'-DHF auch die unbekannt Substanzen C, D und E zählten. Formononetin und 4-Hydroxy-/Methoxyflavon waren nur in nicht auswertbaren Spuren vorhanden. Darüber hinaus zeigte die HPLC-Analyse der hydrolysierten Exsudatprobe keinen Unterschied zum Chromatogramm der unbehandelten Probe.

Der anschließende Wellenlängenscan sowohl der Standardsubstanzen (Abb. 11) als auch der detektierten Einzelaktionen (Abb. 12) sollte Informationen über deren Absorptionsverhalten liefern und somit eine exaktere Identifikation der Exsudatkomponenten ermöglichen. Anhand der Verteilung der Maxima und Minima im Absorptionsspektrum der jeweiligen Substanzen, konnten zwei Gruppen unterschieden werden. Fraktionen wie Umbelliferon, A und B hatten ihr Hauptmaximum im unteren Wellenlängenbereich bei 230 bzw. 235 nm, gefolgt von einem Minimum zwischen 250 und 265 nm. Das zweite Maximum wurde, ausgenommen für Umbelliferon (320 nm), ebenfalls im unteren Wellenlängenbereich detektiert (265 und 270 nm). Das Absorptionsspektrum für 7,4'-DHF verhielt sich hingegen anders: das Hauptmaximum dieser Signalsubstanz lag mit 330 nm im oberen Wellenlängenbereich, das zweite Maximum (255 nm) sowie das Minimum (270 nm) hingegen im unteren Absorptionsbereich. Auch die HPLC-Faktionen C, D und E wiesen – mit einem Hauptmaximum zwischen 330 und 350 nm – ein vergleichbares Absorptionsspektrum auf.

Die HPLC-Vergleichsanalyse sowie der Wellenlängenscan weiterer synthetischer Standardsubstanzen (Kapitel 2.7.2) lieferten keine zusätzlich verwertbaren Informationen und trugen somit nicht zur Identifikation der unbekannt HPLC-Faktionen bei.

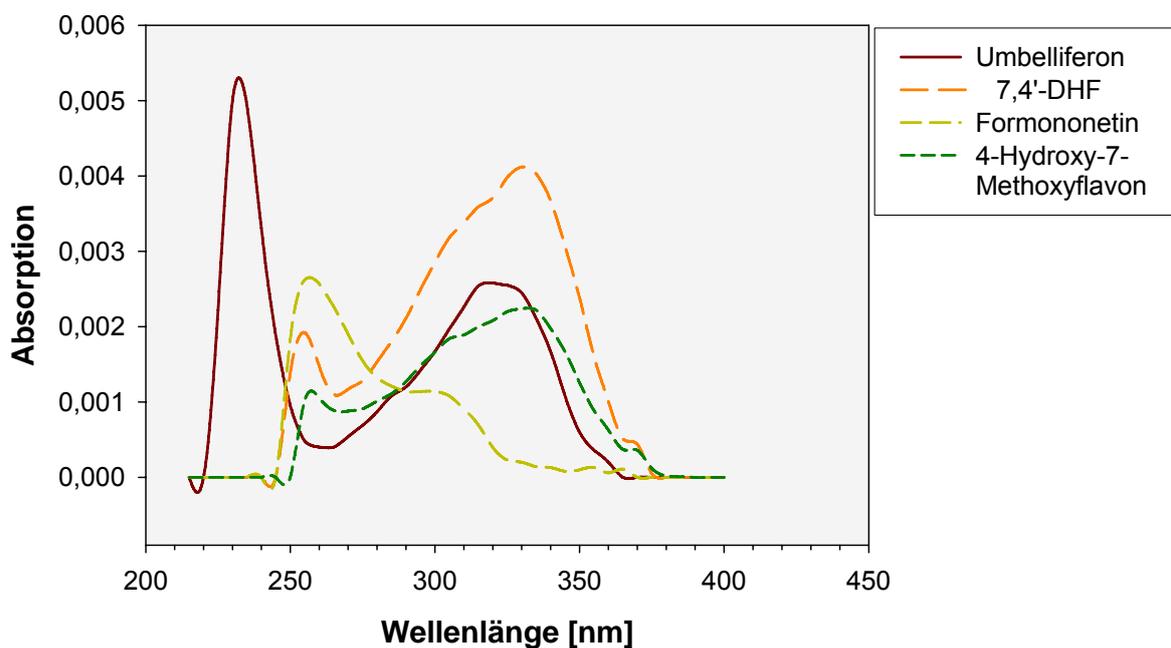


Abb. 11: Wellenlängenscan (200-400 nm) zur Bestimmung der phenolischen Standardsubstanzen.

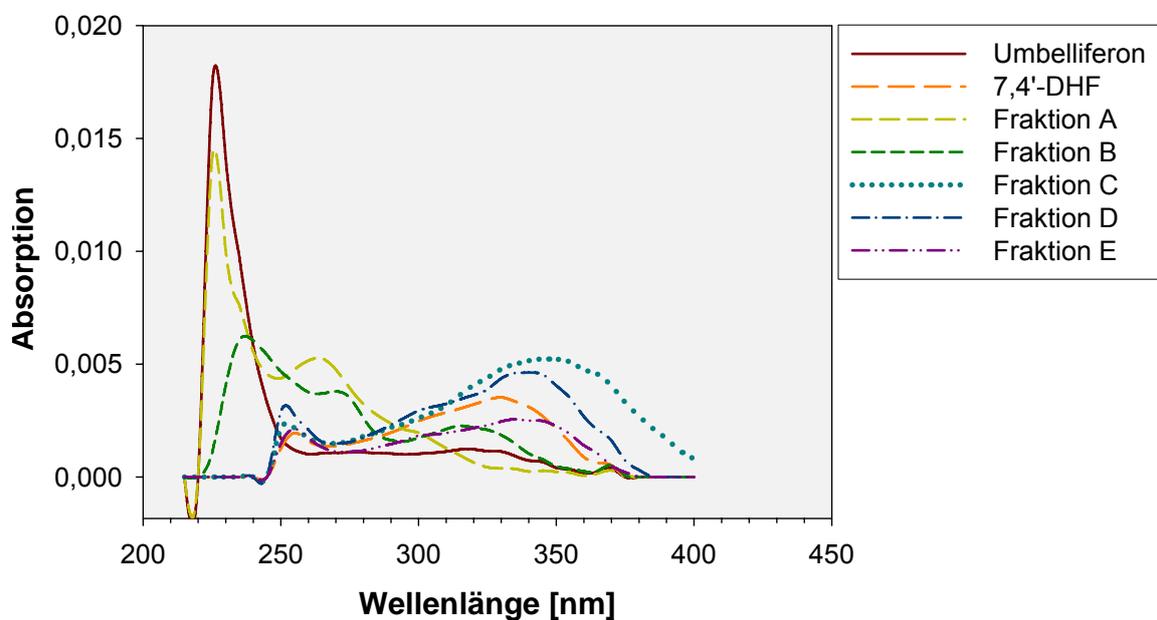


Abb. 12: Wellenlängenscan (200-400 nm) zur Bestimmung der phenolischen Verbindungen in den Wurzelexsudaten von *T. repens*.

Darüber hinaus wurde das Exsudationsverhalten aller detektierten Fraktionen in Abhängigkeit der beiden Behandlungsfaktoren CO₂ und N-Versorgung sowie des Pflanzenalters genauer analysiert.

Für Umbelliferon konnte an allen drei Versuchsterminen ein signifikanter CO₂-Einfluss sowie, ausgenommen für den ersten Exsudatgewinnungstermin, ein signifikanter Effekt der N-Versorgung auf die Abgaberate nachgewiesen werden (Abb. 13). Erhöhte CO₂-Konzentration führte bei 15 Tage alten Weißkleeplanken, verglichen mit den Pflanzen unter ambienter CO₂-Konzentration, zu einer Erhöhung der Umbelliferonabgabe in beiden N-Behandlungsvarianten. Allerdings war der CO₂-Einfluss nur bei ausreichender N-Versorgung signifikant und bewirkte einen Anstieg der Abgaberate von 591%. Der Einfluss der N-Versorgung auf die Exsudation war hier geringer und nicht signifikant, wahrscheinlich weil die Pflanzen erst über einen Zeitraum von sieben Stunden keinen zusätzlichen

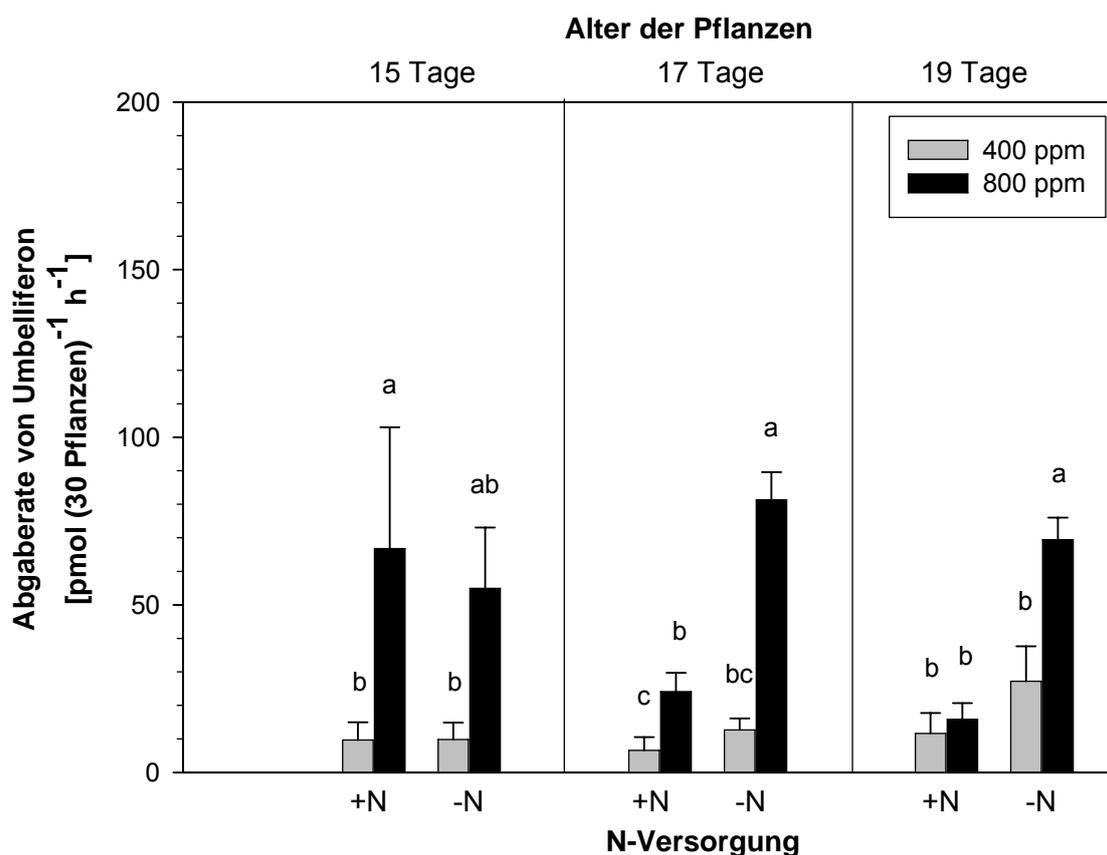


Abb. 13: Abgaberate von Umbelliferon in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 3$, $P < 0,05$).

Stickstoff mehr erhalten hatten. An den beiden folgenden Versuchsterminen bewirkte erhöhtes CO₂ ebenfalls einen signifikanten Anstieg der Abgaberate des Umbelliferons in beiden N-Behandlungsvarianten, wobei unzureichende N-Versorgung den CO₂-Effekt verstärkte (Interaktionseffekt). Bei den 17 Tage alten Weißkleeplanzen stieg die Abgaberate bei ausreichender N-Versorgung um 266% und für Pflanzen, die keine zusätzliche N-Applikation erhielten um 541%. Der verstärkte CO₂-Effekt durch mangelnde N-Versorgung äußerte sich zudem in einer mehr als dreifach höheren Exsudation des Umbelliferons und somit einem signifikanten Anstieg um 237% gegenüber mit Stickstoff gedüngten Vergleichspflanzen bei gleicher CO₂-Konzentration. Für die 19 Tage alten Weißkleeplanzen konnte ein signifikanter CO₂-Effekt lediglich unter N-Limitierung nachgewiesen werden, der – wenn auch in geringerem Ausmaß als zuvor beobachtet – eine erhöhte Exsudation des auf die Nodulation antagonistisch wirkenden Phenols um 155% zur Folge hatte.

Die Exsudation des Signalmoleküls 7,4'-DHF wurde zu jedem Zeitpunkt des Versuchs signifikant durch die CO₂-Konzentration und die N-Versorgung beeinflusst (Abb. 14), wobei die unzureichende N-Versorgung den CO₂-Effekt auf die Abgabe verstärkte. Zudem konnte generell für das 7,4'-DHF mit steigendem Pflanzenalter eine Abnahme der Exsudation beobachtet werden. Die höchste Abgaberate wurde bei 15 Tage alten Weißkleeplanzen nachgewiesen: bei ausreichender N-Versorgung stieg infolge der erhöhten CO₂-Konzentration die Abgaberate des 7,4'-DHF signifikant um 276% und bei Pflanzen mit mangelnder N-Applikation sogar um 362% an, verglichen mit dem Kontrollansatz. Bereits nach sieben Stunden ohne zusätzliche N-Applikation konnte ein signifikanter N-Einfluss auf die Abgaberate unter erhöhtem CO₂ beobachtet werden (Interaktionseffekt). Verglichen mit den CO₂-begasten Pflanzen unter ausreichender N-Applikation erhöhte sich die Abgaberate des 7,4'-DHF signifikant um 48%. Auch an den folgenden Versuchsterminen führte die Erhöhung der CO₂-Konzentration bei N-limitierten Weißkleeplanzen zu einer signifikant gesteigerten Exsudation des Signalmoleküls. Die 7,4'-DHF-Exsudation stieg gegenüber den Vergleichspflanzen unter ambienter CO₂-Konzentration um 181% bei 17 Tage alten und um 210% bei 19 Tage alten Pflanzen. Der CO₂-Einfluss auf die Abgaberate des 7,4'-DHF bei ausreichender N-Versorgung war an den letzten beiden Untersuchungsterminen nicht signifikant, aber tendenziell zu erkennen.

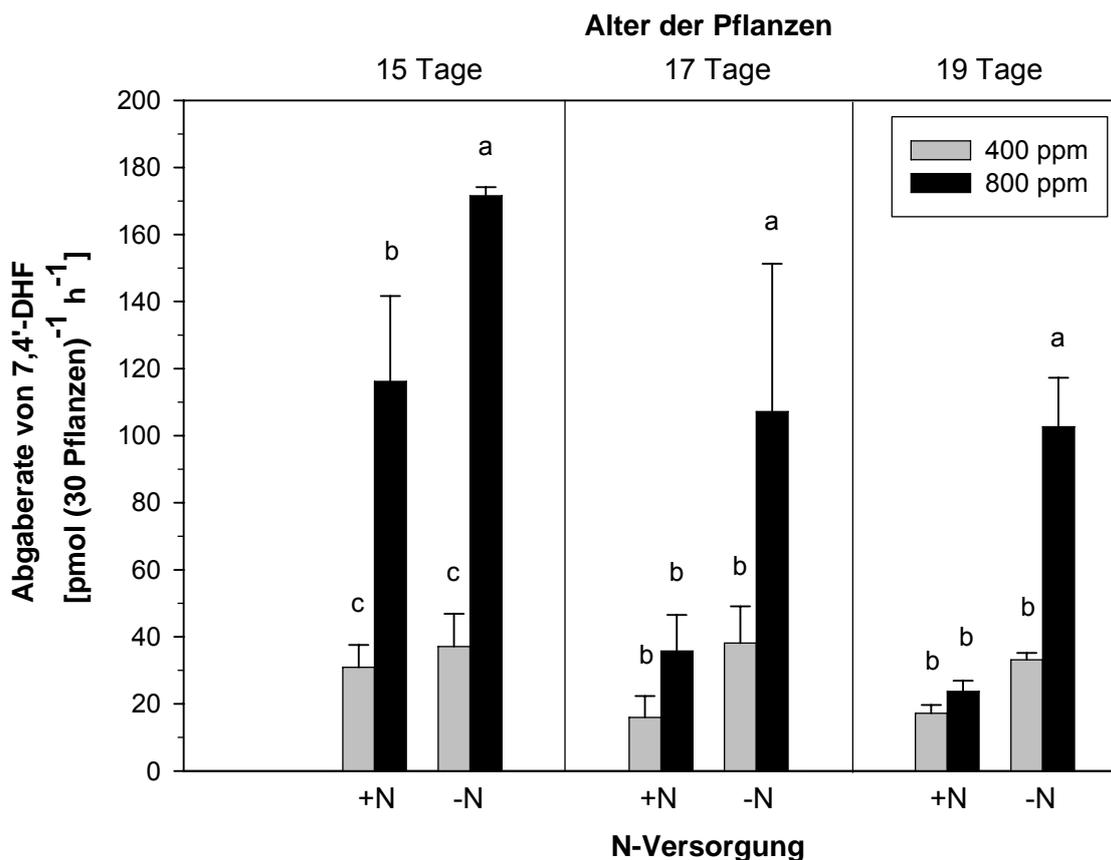


Abb. 14: Abgaberate von 7,4'-Dihydroxyflavon (7,4'-DHF) in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 3$, $P < 0,05$).

Für den letzten Versuchstermin wurde zusätzlich das Verhältnis des exsudierten Umbelliferons und 7,4'-DHF relativ zur Wurzel-Frischmasse angegeben (Abb. 15). Die gewonnenen Erkenntnisse sollten zur Klärung der Frage beitragen, ob die erhöhte Exsudation infolge gesteigerter CO₂-Konzentration, das Resultat erhöhter Biomasseproduktion war oder auf eine höhere physiologische Wurzelaktivität zurückgeführt werden konnte. Für die Exsudation des Umbelliferons relativ zur Wurzel-Frischmasse wurde kein signifikanter CO₂-Einfluss beobachtet. Tendenziell konnte als Folge erhöhter CO₂-Konzentration sogar ein Rückgang in der Abgaberate des Inhibitors unter ausreichender N-Versorgung festgestellt werden. Dagegen zeigte der Behandlungsfaktor Stickstoff einen signifikanten Effekt auf die relative Abgaberate, allerdings nur bei mit CO₂-begasten Weißkleeplflanzen. Verglichen mit der Umbelliferonabgabe unter ausreichender N-Applikation stieg die Exsudation infolge mangelnder N-Versorgung um 301% an. Die statistische Auswertung der 7,4'-DHF-Exsudation relativ zur Wurzelfrischmasse ergab, dass sowohl CO₂ als auch die unterschiedliche N-Versorgung einen

signifikanten Einfluss auf die Abgaberate des Signalmoleküls hatte. Allerdings konnte nur unter unzureichender N-Versorgung ein signifikanter Einfluss von CO_2 nachgewiesen werden, der in einer Erhöhung der Abgaberate um 38% resultierte. Wie schon zuvor beobachtet, beeinflusste auch hier N-Mangel den CO_2 -Einfluss (Interaktionseffekt). Eine Limitierung an Stickstoff führte zu einer signifikant gesteigerten Abgabe des 7,4'-DHF sowohl unter ambienter als auch unter erhöhter CO_2 -Konzentration (73% bzw. 295%) verglichen mit den Weißkleepflanzen, die eine ausreichende N-Versorgung erhielten.

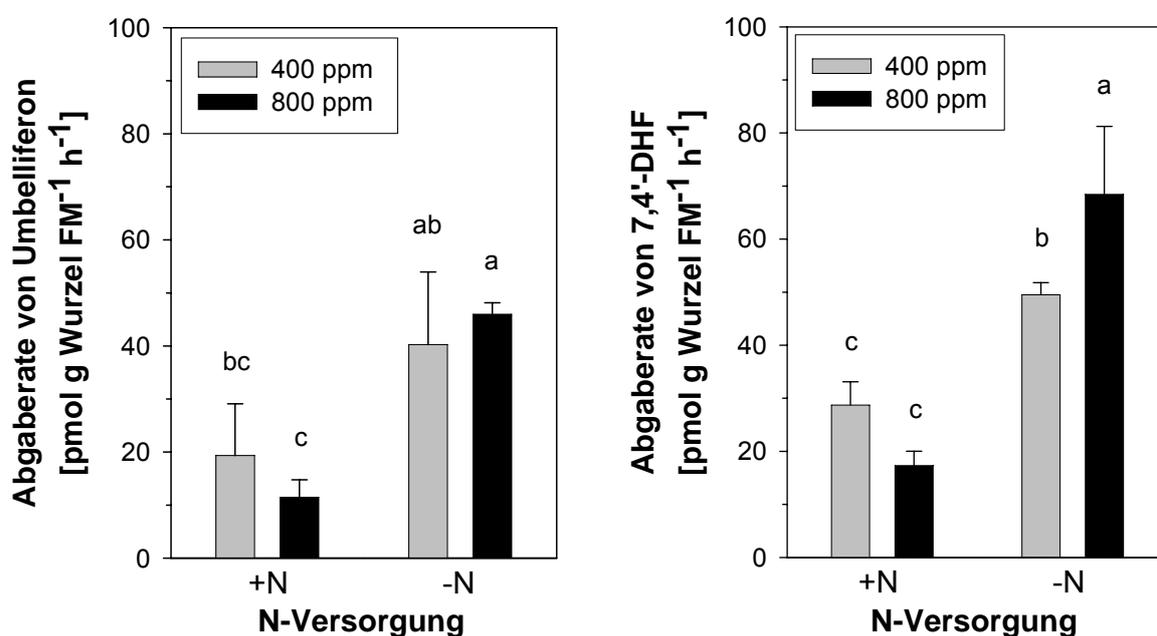


Abb. 15: Abgaberate von Umbelliferon (links) und 7,4'-Dihydroxyflavon (rechts) relativ zur Wurzelfrischmasse von 19 Tage alten Weißkleepflanzen in Abhängigkeit der atmosphärischen CO_2 -Konzentration und der N-Versorgung. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 3$, $P < 0,05$).

Auch die unbekannt, phenolischen Fraktionen (A, B, C, D und E) wurden durch die Faktoren CO_2 und N-Versorgung beeinflusst (Abb. 16, Abb. 17, Abb. 18, Abb. 19, Abb. 20). Die Exsudation dieser Fraktionen nahm im Allgemeinen mit zunehmendem Pflanzenalter ab. Eine Ausnahme bildete hierbei die Fraktion C, deren Abgabe im Laufe des Versuchs mit zunehmender N-Limitierung anstieg (Abb. 18).

Für die Fraktion A konnte über die gesamte Versuchsdauer kein signifikanter CO_2 - und N-Einfluss im Mittelwertsvergleich nachgewiesen werden (Abb. 16). In der Varianzanalyse (ANOVA) zeigte sich jedoch bei 17 Tage alten Weißkleepflanzen ein signifikanter Effekt der N-Versorgung ($P=0,04$) auf die Abgaberate dieses unbekanntes Phenols, der sich in einem geringfügigen Rückgang unter N-Mangel widerspiegelte (Tab. A 2).

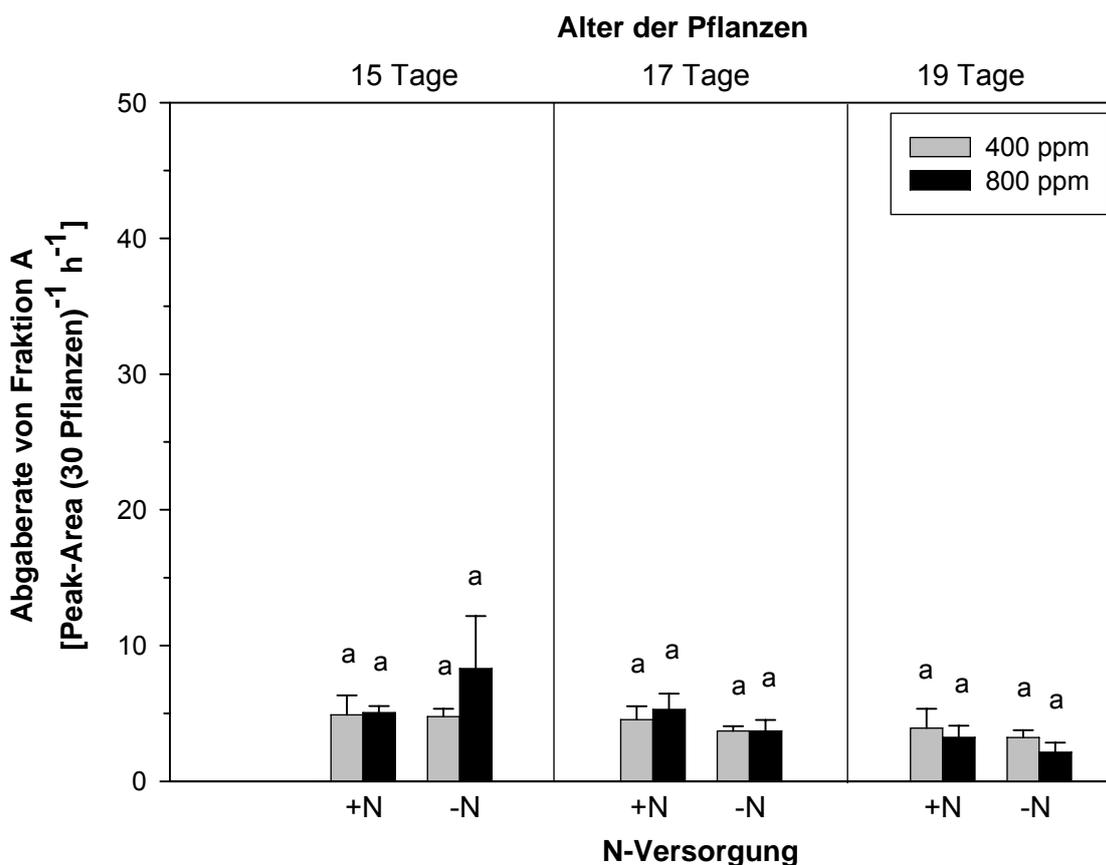


Abb. 16: Abgaberate der unbekanntes, phenolischen Fraktion A in Abhängigkeit der atmosphärischen CO_2 -Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 3$, $P < 0,05$).

Die Exsudation der unbekanntes Fraktion B wurde nur an den ersten beiden Versuchsterminen signifikant durch erhöhte CO_2 -Konzentrationen beeinflusst (Abb. 17). Während bei 15 Tage alten Weißkleepflanzen unter unzureichender N-Applikation, CO_2 die Exsudation der Fraktion B stimulierte und eine Steigerung um 70% bewirkte, zeigten die 17 Tage alten Weißkleepflanzen nur unter adäquater N-Versorgung eine signifikante erhöhte Abgabe um 168%. Die Abgaberate der Fraktion B bei 19 Tage alten Pflanzen war durch einen Rückgang unter

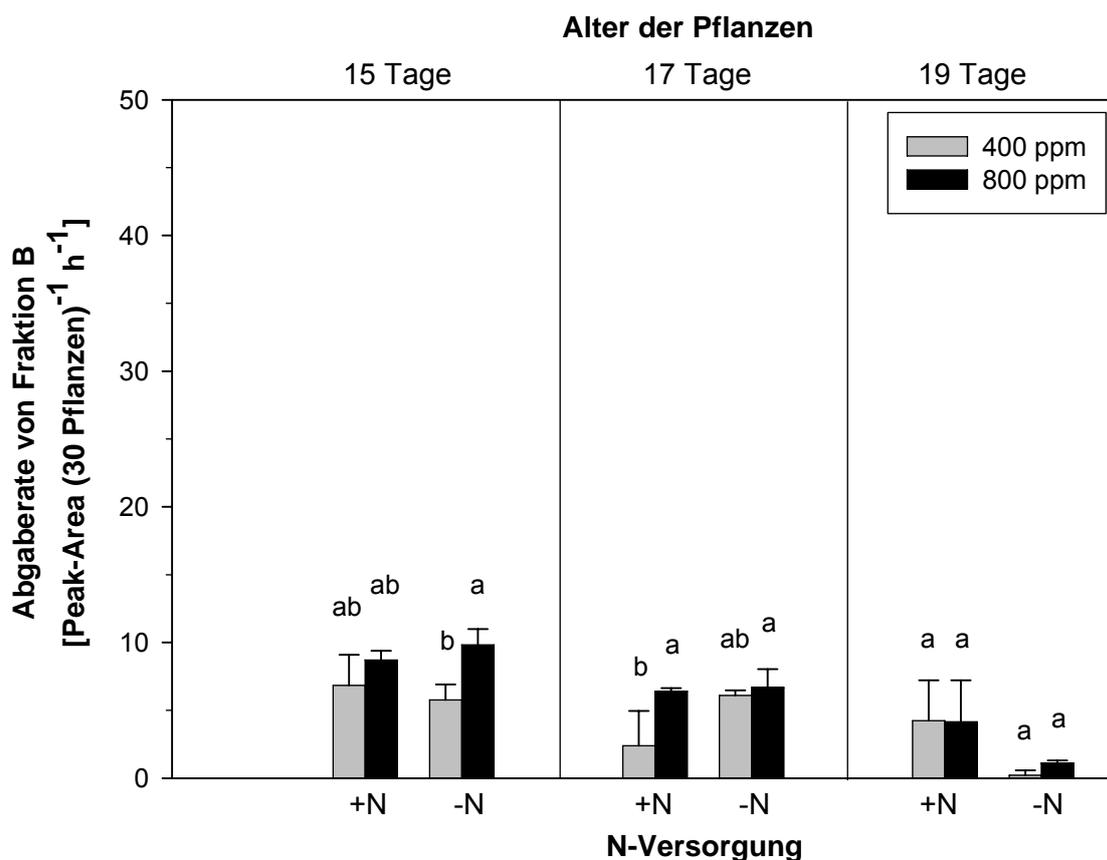


Abb. 17: Abgaberate der unbekanntes, phenolischen Fraktion B in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 3$, $P < 0,05$).

unzureichender N-Versorgung gekennzeichnet, der laut Mittelwertsvergleich nicht signifikant war. Die Varianzanalyse über den gesamten Stichprobenumfang zeigte indes, dass der beobachtete N-Effekt signifikant die Abgaberate beeinflusste ($P=0,02$; Tab. A 2).

Als einziges unbekanntes Phenol wies die Fraktion C einen Anstieg in der Exsudation mit höherem Pflanzenalter unter unzureichender N-Versorgung auf (Abb. 18). Nur am ersten Versuchstermin hatte erhöhtes CO₂ einen signifikanten Einfluss auf die Abgaberate. Als Folge konnte sowohl bei adäquater als auch bei unzureichender N-Versorgung eine erhöhte Abgaberate nachgewiesen werden (108% bzw. 151%). An den darauf folgenden Untersuchungsterminen bewirkte ausschließlich die unzureichende N-Versorgung eine signifikante Erhöhung in der Exsudation der Fraktion C. So hatte der zunehmende N-Mangel bei den 17 und 19 Tage alten Pflanzen eine Stimulation in der Abgaberate um 425% bzw. 1473%

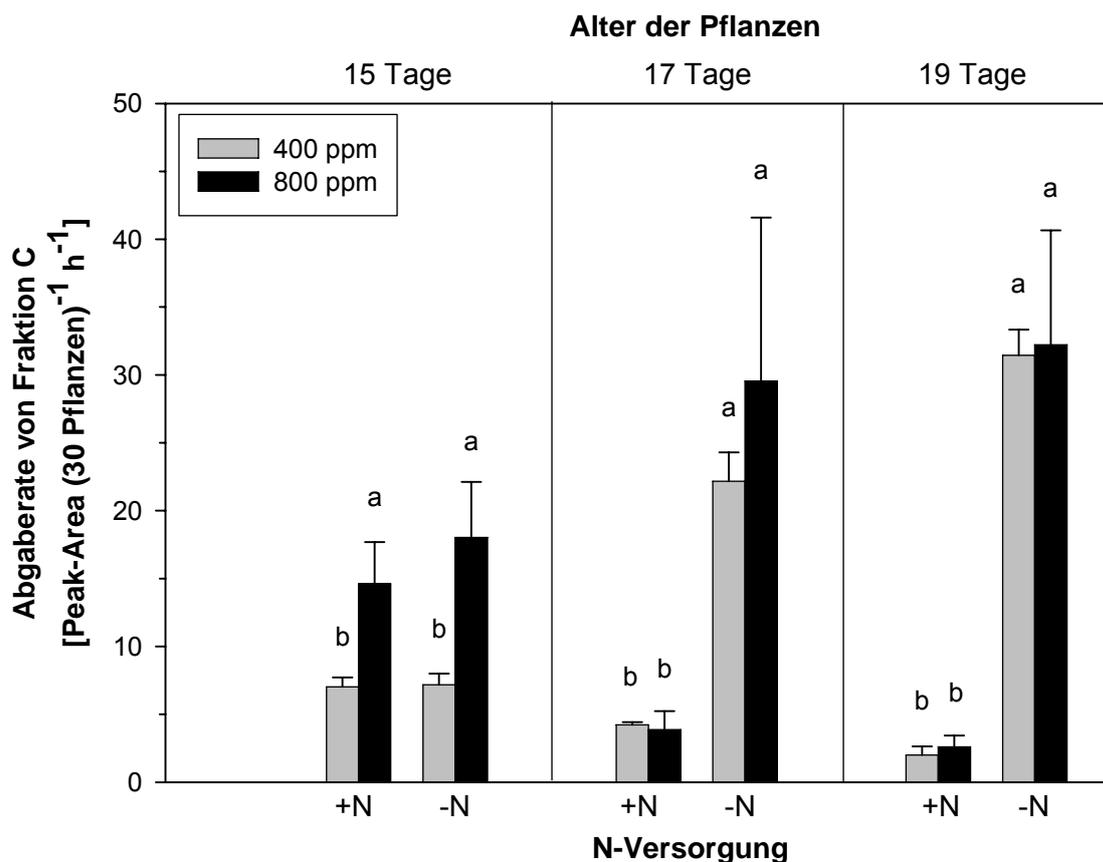


Abb. 18: Abgaberate der unbekannt, phenolischen Fraktion C in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 3$, $P < 0,05$).

unter ambierter CO₂- und um 664% bzw. 1139% unter erhöhter CO₂-Konzentration zur Folge.

Die statistische Auswertung der exsudierten unbekannt Fraktion D (Abb. 19) ergab, dass die erhöhte CO₂-Konzentration und die N-Versorgung vor allem bei jüngeren Weißkleeplanzen einen deutlichen und signifikanten Einfluss auf das Exsudationsverhalten hatten. Erhöhtes CO₂ bewirkte bei 15 Tage alten Weißkleeplanzen einen Anstieg der Abgaberate sowohl unter ausreichender (384%) als auch unter mangelnder N-Applikation (323%). N-Mangel verstärkte zudem signifikant den CO₂-Effekt ($P=0,02$; Tab. A 2). Darüber hinaus konnte ein deutlicher Rückgang der Exsudation an den letzten beiden Versuchsterminen detektiert werden. Für die 17 Tage alten Weißkleeplanzen war nur unter unzureichender N-Applikation ein signifikanter CO₂-Einfluss nachweisbar, der sich in einer erhöhten Abgabe der Fraktion D (191%) äußerte. Vergleichbare Ergebnisse ließen sich tendenziell auch für 19 Tage alte Pflanzen beobachten.

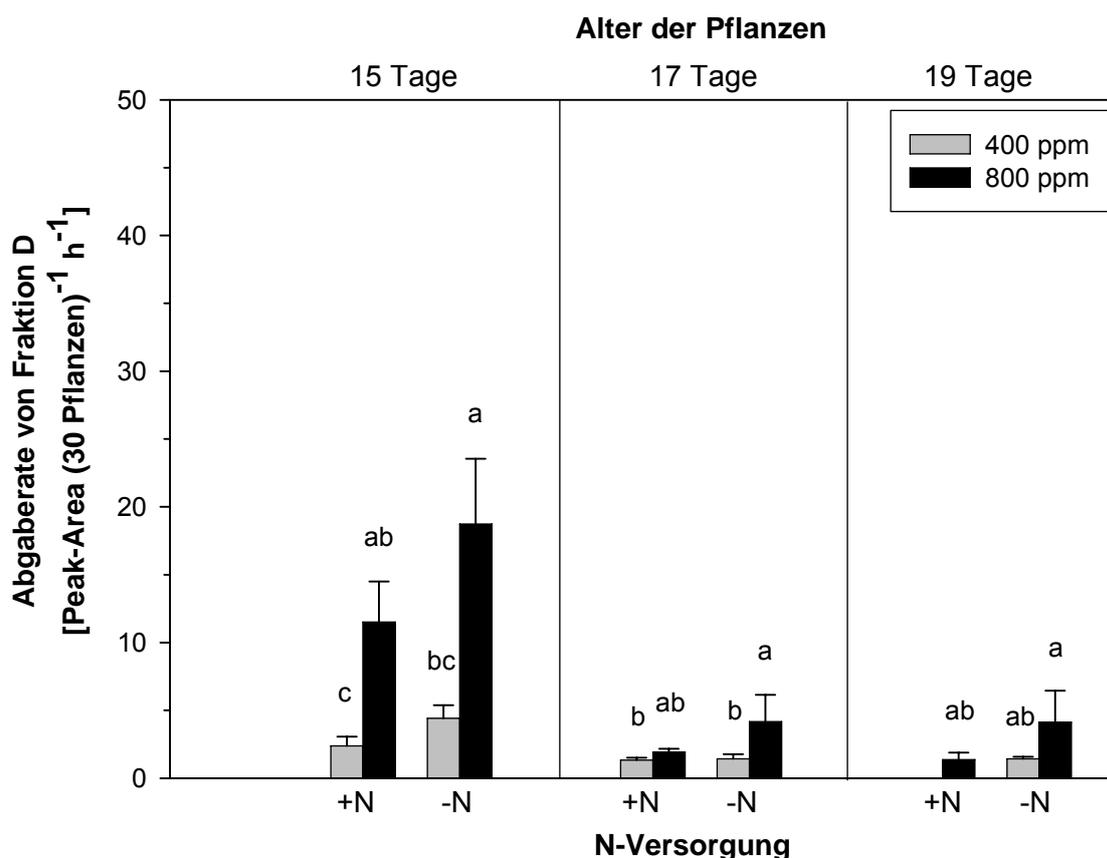


Abb. 19: Abgaberate der unbekannt, phenolischen Fraktion D in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 3$, $P < 0,05$).

Allerdings wurde nur anhand der ANOVA eine signifikante Beeinflussung der Exsudation der Fraktion D durch erhöhte CO₂-Konzentration ($P=0,018$) und mangelnde N-Versorgung ($P=0,016$) festgestellt (Tab. A 2).

Die unbekannt Fraktion E wies ein ähnliches Exsudationsmuster wie die Fraktion D auf (Abb. 20). Im jüngeren Entwicklungsstatus der Weißkleepflanzen hatte die Erhöhung der CO₂-Konzentration – unabhängig von der N-Versorgung – ebenfalls einen signifikanten Anstieg der Abgaberate zur Folge (um 205% bzw. 289%). Des Weiteren nahm die Exsudation mit zunehmendem Pflanzenalter ab und der CO₂-Einfluss war an den letzten beiden Versuchsterminen nur unter N-Mangel zu beobachten. Für die 17 und 19 Tage alten Weißkleepflanzen konnte somit eine gesteigerte, signifikante Abgaberate der Fraktion E von 130% bzw. 108% unter 800 ppm CO₂ detektiert werden. Daneben zeigte sich an diesen beiden Versuchsterminen auch ein signifikanter Effekt der N-Versorgung unter

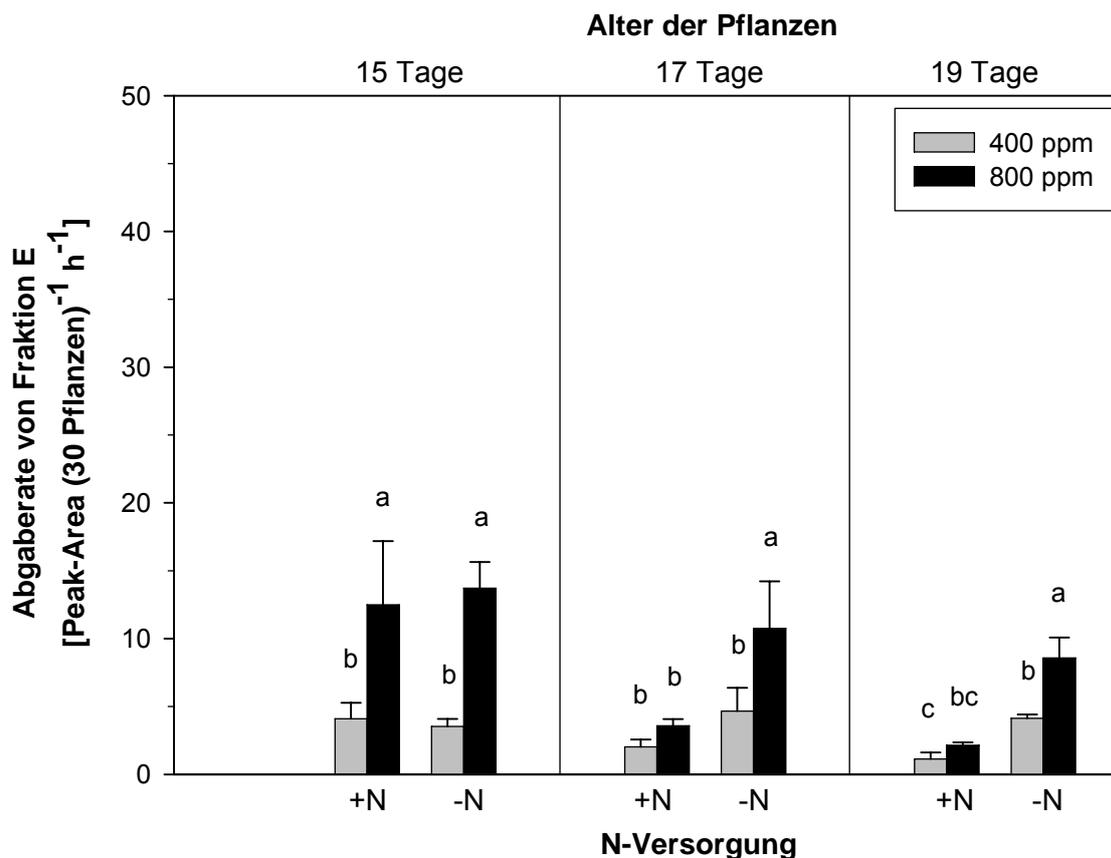


Abb. 20: Abgaberate der unbekanntes, phenolischen Fraktion E in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 3$, $P < 0,05$).

erhöhter CO₂-Konzentration. Für Weißkleepflanzen, die unzureichender mit Stickstoff versorgt wurden, wurde – gegenüber Pflanzen mit ausreichender N-Versorgung – eine Erhöhung in der Abgaberate um 108% bei 17 und 303% bei 19 Tage alten Pflanzen nachgewiesen.

Die Abgaberate der beschriebenen Phenole wurde in den meisten Fällen nachweislich signifikant durch die unterschiedlichen CO₂-Konzentrationen und/oder durch die unterschiedliche N-Versorgung beeinflusst. Allerdings war das Ausmaß der Reaktion (Anstieg bzw. Verminderung der Exsudation) der einzelnen Fraktionen verschieden und abhängig vom Pflanzenalter. Für einen Großteil der exsudierten Substanzen konnte mit zunehmenden Pflanzenalter nur unter unzureichender N-Versorgung ein CO₂-Einfluss beobachtet werden.

3.2.1.4 Identifikation phenolischer Wurzelexsudate mittels Massenspektroskopie

Die weitere Identifizierung bzw. Angabe über die Masse der unbekannt HPLC-Fractionen erfolgte mittels der LC-MS-Analyse. Die Analyse zeigte, dass sowohl der synthetische 7,4'-DHF-Standard als auch das aus den Wurzelexsudaten isolierte 7,4'-DHF das gleiche Molekulargewicht von 254,1 aufwiesen (Abb. 21, Abb. 22). Dieses Ergebnis ließ darauf schließen, dass es sich bei dem isolierten 7,4'-DHF um das für die *Trifolium-Rhizobium*-Symbiose wichtige Signalmolekül handelte. Für die unbekannte Fraktion C wurde eine Masse von 270,2 ermittelt (Abb. 23). Schließlich ergab die Massenspektroskopie der Fraktionen D und E ergab ein Molekulargewicht von 284,2 bzw. 284,3.

Die Masse des Umbelliferons, der Fraktionen A und B konnten nicht ermittelt werden, da die an der HPLC isolierte Menge nicht zur LC-MS-Analyse ausreichte. Darüber hinaus beweisen die LC-MS-Daten des synthetischen Umbelliferonstandards für das antagonistisch wirkende Phenol erwartungsgemäß ein Molekulargewicht von 162,1.

Standard DHF

(300 nm; 19.206 min)

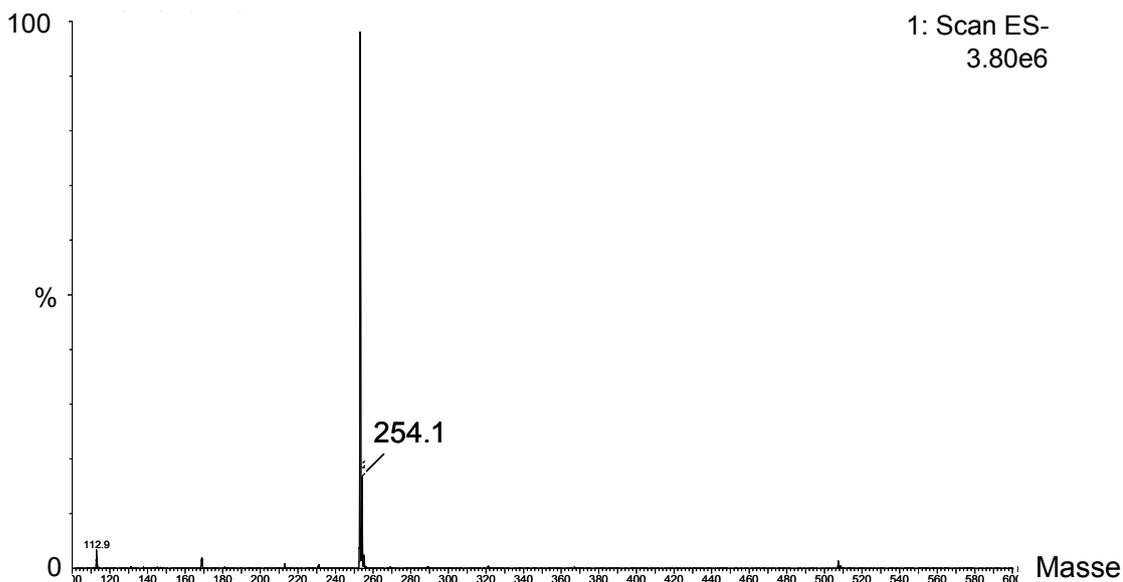
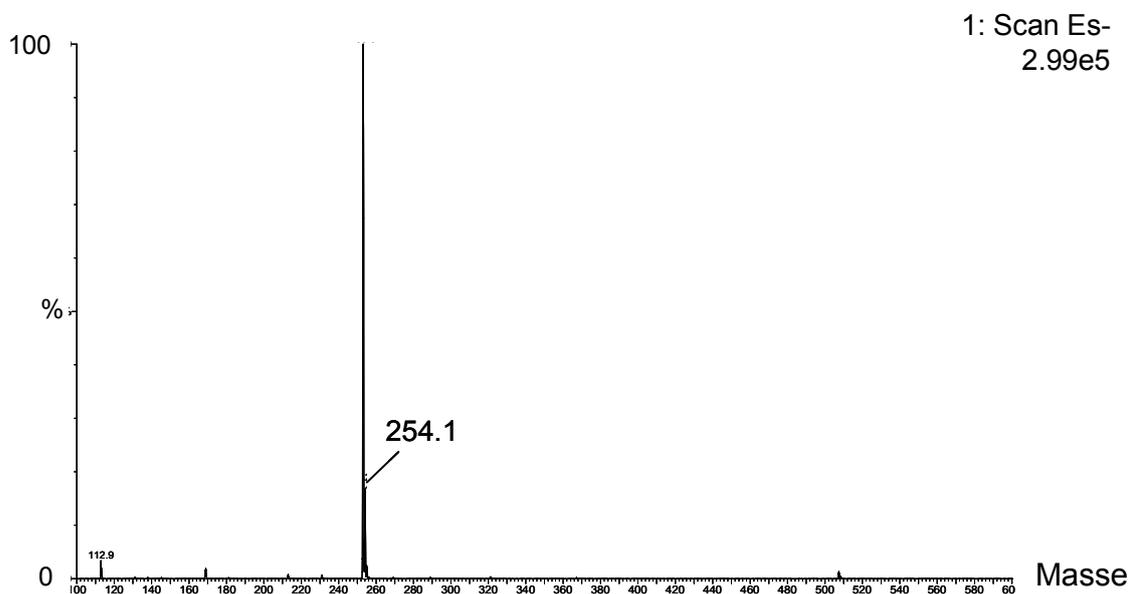
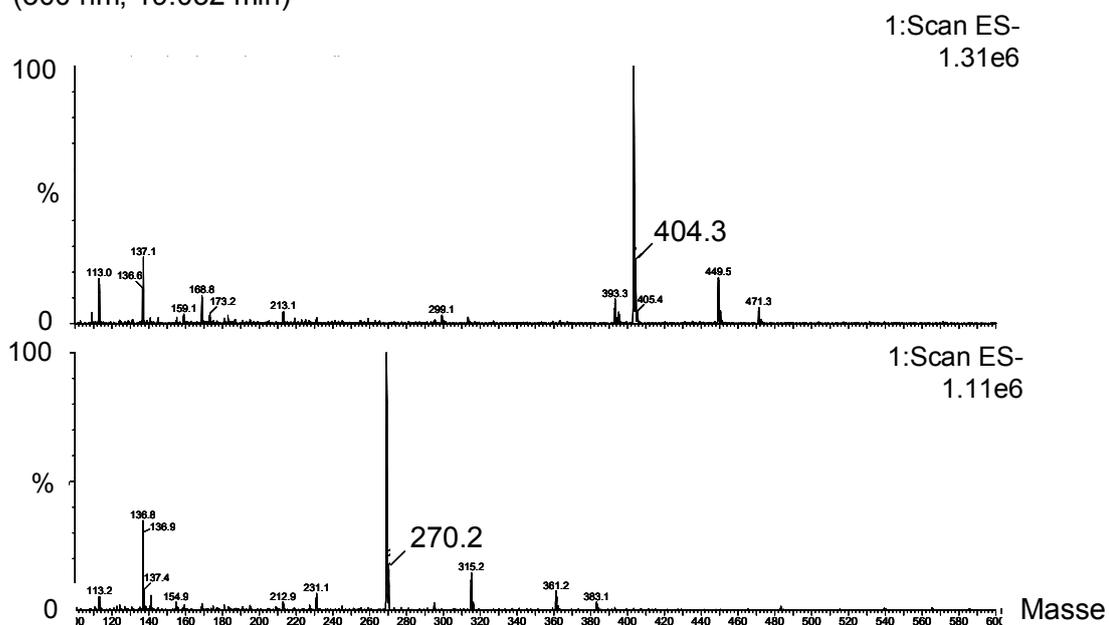


Abb. 21: Massenspektrum des synthetischen 7,4'-Dihydroxyflavone-Standards.

7,4'-DHF aus Wurzelexsudaten
(300 nm; 19.067 min)**Abb. 22:** Massenspektrum der aus den Wurzelexsudaten isolierten 7,4'-Dihydroxyflavon-Fraktion**Fraktion C**(256 nm; 20.082 min)
(300 nm; 19.032 min)**Abb. 23:** Massenspektrum der aus Wurzelexsudaten isolierten Fraktion C. *Oben:* bei 256 nm. *Unten:* bei 300 nm.

3.2.1.5 *Biologische Aktivität der isolierten HPLC-Fractionen*

Der *nod*-Gen-Induktionstest sollte klären, ob die an der HPLC isolierten Fraktionen C, D, E und das 7,4'-DHF die Fähigkeit zur Aktivierung der Nodulationene besitzen und ihnen somit eine Bedeutung während des Signalaustausches zukommt. Alle purifizierten Fraktionen bewirkten während des Induktionstests eine Gelbfärbung der Reaktionslösung, die auf eine erhöhte β -Galactosidase-Aktivität schließen ließ. Diese β -Galactosidase-Aktivität konnte quantitativ mit dem Spektralphotometer gemessen werden.

Die anschließende Berechnung der β -Galactosidase-Units nach Miller (1972) ergab für die einzelnen Fraktionen folgende Werte:

Fraktion	β-Galactosidase-Einheit
C	169,79
7,4'-DHF	110,89
D	159,61
E	119,00

Die Höhe der β -Galactosidase-Units ließ hier keinen direkten Schluss auf die Stärke der Aktivität der jeweiligen Fraktion zu, da die Konzentrationen der Fraktionen nicht bekannt war und die Fraktionen zudem für den Induktionstest unterschiedlich stark verdünnt wurden (Kapitel 2.7.4).

Die Ergebnisse des Induktionstest belegten eindeutig, dass alle isolierten Fraktionen der steril gewonnenen Weißkleeexsudate die Nodulationsgene des Reporterstamms (*R. trifolii* nod218) aktivieren konnten.

3.2.1.6 *Identifizierung der durch N-Mangel induzierten Fraktion C*

Die Ergebnisse der HPLC-Analyse und des *nod*-Gen-Induktionstests zeigten, dass die Fraktion C eine wichtige Rolle während des Signalaustausches bei der Initialisierung der Knöllchenbildung unter N-Limitierung zu haben schien. Eine weitere HPLC-Analyse, mit ausgewählten synthetischen Flavonoiden als Vergleichssubstanzen, sollte zur exakteren Identifikation der Signalsubstanz beitragen. Aufgrund der geringen Menge der Fraktion C (unter 1 mg) war eine Kernresonanzspektroskopie (NMR) nicht möglich.

Als Vergleichsubstanzen wurden Apigenin, 4,4'-Dihydroxy-2'-Methoxychalcon und 7,3',4'-Trihydroxyflavon gewählt, da sie das gleiche Molekulargewicht wie die Fraktion C besitzen und aufgrund ihrer chemischen Struktur potentielle Aktivatoren der *nod*-Gene von *R. l. bv. trifolii* sein könnten. Apigenin (4',5,7-Trihydroxyflavon) und 4,4'-Dihydroxy-2'-Methoxychalcon wirken nachweislich aktivierend auf die Nodulationsgene von *R. l. bv. trifolii* (ROLFE 1988; GÖTTFERT 1993). Zudem konnte 7,3',4'-Trihydroxyflavon als Bestandteil in der Wurzel von *T. repens* nachgewiesen werden (HARBORNE & BAXTER 1999) und ist aufgrund seiner chemischen Struktur (Kapitel 1.4.1) ein potentielles Signalmolekül.

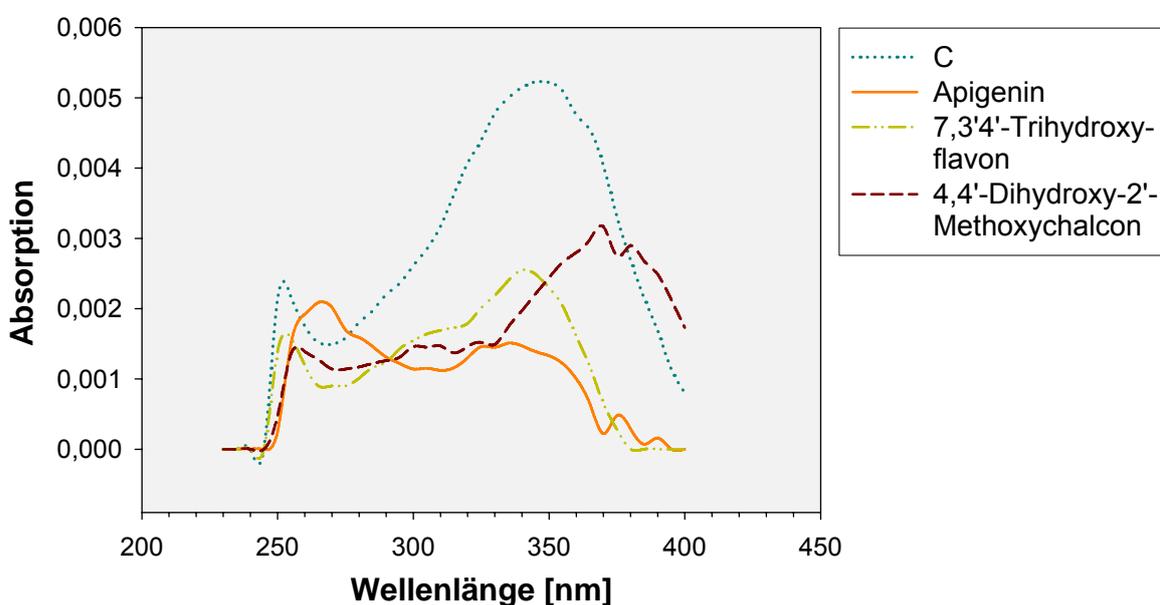


Abb. 24: Wellenlängenscan (200-400 nm) ausgewählter synthetischer Standardsubstanzen zur Identifizierung der Fraktion C.

Die Ergebnisse der HPLC-Analyse zeigten keine Übereinstimmung der Retentionszeit der synthetischen Phenole mit derjenigen der Fraktion C (Abb. 24). Für die Wellenlängenscans konnte nur in Bezug auf 7,3',4'-Trihydroxyflavon eine Ähnlichkeit im Absorptionsverhalten mit der Fraktion C beobachtet werden. Allerdings unterschieden sich die Retentionszeiten der beiden Phenole deutlich (um mehr als 5 Minuten).

3.2.2 Analyse von Pflanzen und Wurzelexsudaten aus nicht-steriler Kultur

3.2.2.1 Einfluss von CO₂ und N-Versorgung auf das Spross- und Wurzelwachstum von *T. repens*

Ebenso wie unter sterilen Bedingungen konnte auch im nicht-sterilen Versuchsansatz frühzeitig visuell eine Wachstumsstimulation der Weißkleepflanzen infolge der CO₂-Erhöhung beobachtet werden. Die Weißkleepflanzen zeigten ein deutlich höheres Spross- und Wurzelwachstum verglichen mit unter ambienter CO₂-Konzentration kultivierten Pflanzen (Bild 12). Allerdings ließ der CO₂-Düngungseffekt mit zunehmendem Pflanzenalter nach, so dass am letzten Versuchstermin nur geringfügige Unterschiede gegenüber den Kontrollpflanzen ersichtlich waren.



Bild 12: Einfluss von erhöhten atmosphärischen CO₂-Konzentrationen auf das Wachstum von 24 Tage alten Weißkleepflanzen. *Links:* Weißkleepflanzen, die bei 400 ppm CO₂ kultiviert wurden. *Rechts:* Pflanzen, die bei 800 ppm CO₂ aufwuchsen.

Die unzureichende N-Versorgung bewirkte eine deutlich verminderte Biomasseproduktion in Spross und Wurzel der Versuchspflanzen. Bereits nach drei bis vier Tagen ohne zusätzliche N-Applikation zeigten die Pflanzen typische N-Mangel-Symptome in Form von Chlorosen, die sich im weiteren Verlauf des Experiments noch verstärkten (Bild 13). Allerdings konnte als Folge des N-Mangels kein erhöhtes Wurzelwachstum beobachtet werden.



Bild 13: Einfluss der N-Versorgung auf das Wachstum von 30 Tage alten Weißkleepflanzen. *Links:* Weißkleepflanzen mit N-Düngung [2mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$]. *Rechts:* Pflanzen 6 Tage ohne N-Düngung.

Für die Spross- und Wurzeltrockenmasse konnte allgemein eine veränderte Biomasseproduktion von *T. repens* mit zunehmendem Pflanzenalter beobachtet werden. Zudem bestätigen die Trockenmassedaten, dass die Erhöhung der CO_2 -Konzentration und der Grad der N-Versorgung einen unterschiedlichen Einfluss auf das Wachstum von Spross und Wurzel hatten (Abb. 25). Ein Vergleich der Biomassedaten des ersten und des letzten Beprobungstermins zeigte, dass bei ausreichender N-Versorgung die Spross- und Wurzelbiomasse um 270% bzw. 225% bei ambienter und 285% bzw. 260% bei erhöhter CO_2 -Konzentration zunahm. Bei mangelnder N-Versorgung wurde eine geringere Wachstumsstimulation von 170% bzw. 100% unter 400 ppm und 138% bzw. 100% unter 800 ppm CO_2 für Spross und Wurzel nachgewiesen.

Die Erhöhung der CO₂-Konzentration führte tendenziell an jedem Beprobungstermin in beiden N-Behandlungsvarianten zu einem Anstieg in der Sprossbiomasse. Signifikant war der CO₂-Einfluss allerdings nur bei 26 und 30 Tage alten Pflanzen. Während sich das Wachstum der 30 Tage alten Weißkleepflanzen infolge gesteigerter CO₂-Konzentration um 35% unter ausreichender N-Versorgung erhöhte, wurde für die 26 Tage alten Pflanzen eine Steigerung in der Sprossbiomasse um 73% bei adäquater und um 31% bei mangelnder N-Versorgung gegenüber den Kontrollpflanzen unter ambienter CO₂-Konzentration nachgewiesen. Die ANOVA über den gesamten Strichprobenumfang belegt indes auch für die 24 und 28 Tage alten Weißkleepflanzen einen signifikanten CO₂-Düngungseffekt ($P=0,002$ bzw. $P=0,032$; Tab. A 4). Für die Wurzeltrockenmasse wurde ein deutlich geringerer CO₂-Effekt festgestellt, der – wie der Mittelwertvergleich zeigte – zu keinem Untersuchungstermin signifikant war. Die ANOVA bewies auch für 26 Tage alte Weißkleepflanzen eine signifikante CO₂-Beeinflussung ($P=0,02$; Tab. A 4).

Mangelnde N-Versorgung hatte am zweiten und letzten Beprobungstermin einen signifikanten Einfluss auf die Biomasseproduktion im Spross. Bei 30 Tage alten Weißkleepflanzen war der N-Effekt allerdings lediglich bei 800 ppm CO₂ signifikant und äußerte sich in einer verminderten Wachstumsstimulation (38%) verglichen mit Kontrollpflanzen unter adäquater N-Versorgung. Demgegenüber bewirkte die N-Limitierung bei 26 Tage alten Weißkleepflanzen überraschend einen Anstieg der Sprossbiomasse in beiden CO₂-Behandlungsvarianten. Die Wurzelbiomasse dagegen zeigte an den ersten drei Beprobungsterminen keine signifikante Beeinflussung durch die Behandlungsvarianten CO₂ und N-Versorgung. Erst bei 30 Tage alten Weißkleepflanzen wurde eine signifikante Wachstumsdepression von 44% unter N-Mangel bei 800 ppm CO₂ beobachtet. Die CO₂-Reaktion der 30 Tage alten Weißkleepflanzen war somit an die N-Versorgung gekoppelt. Die Unterversorgung an Stickstoff bewirkte zudem generell eine Wachstumsstagnation der Wurzel.

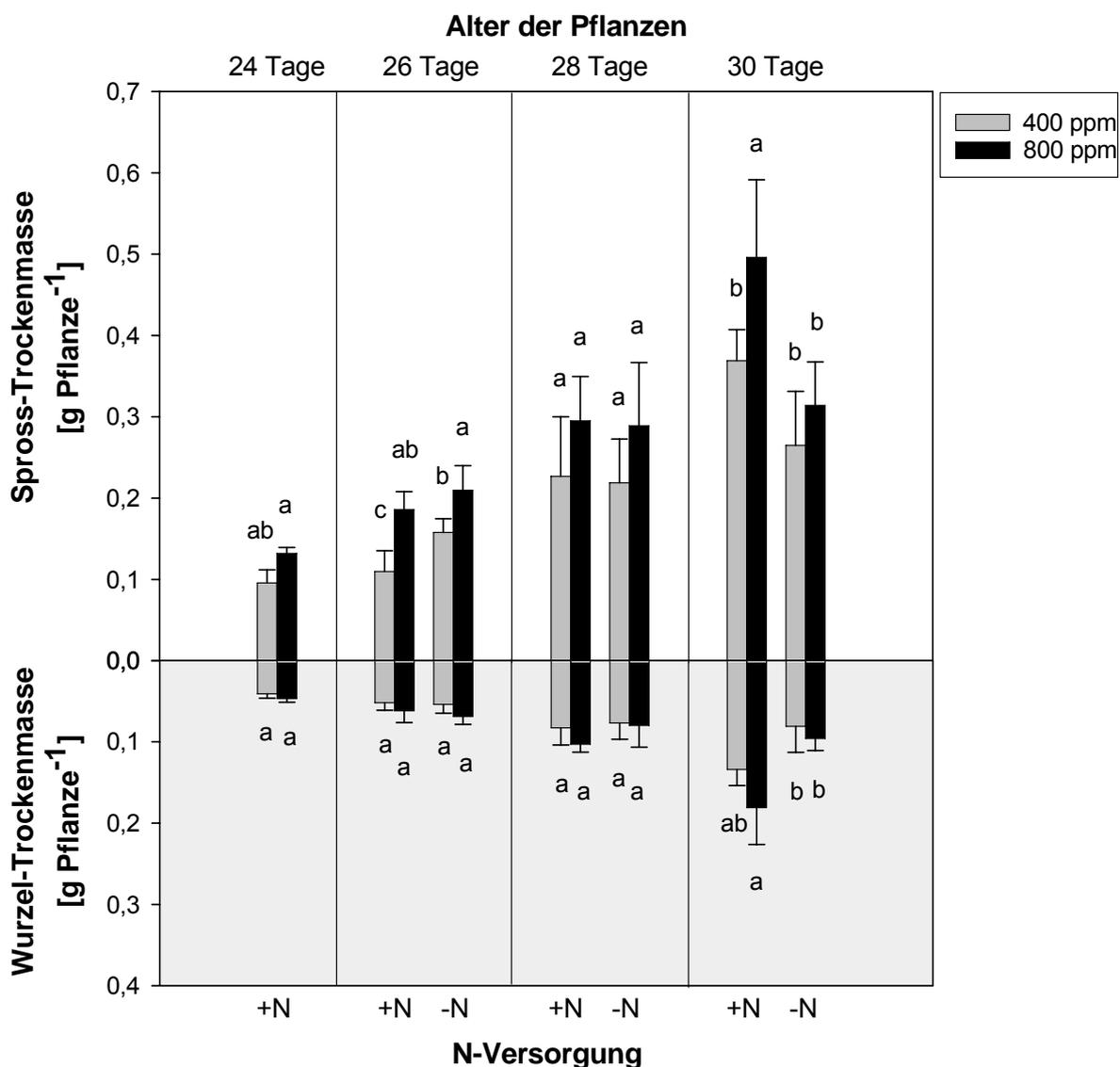


Abb. 25: Spross- und Wurzel-Trockenmasse von nicht-steril kultivierten *T. repens*-Pflanzen in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 5$, $P < 0,05$).

Der Einfluss erhöhter CO₂-Konzentration und mangelnder N-Versorgung auf das Wurzel/Spross-Verhältnis war minimal. Das Wurzel/Spross-Verhältnis zeigte mit zunehmendem Pflanzenalter kaum Veränderungen infolge gesteigerter CO₂-Konzentrationen. Allerdings bewirkte N-Mangel tendenziell eine Abnahme des Wurzel/Spross-Verhältnisses mit zunehmendem Alter der Weißkleepflanzen (30% bei 400 ppm und 14% bei 800 ppm CO₂), wobei unter erhöhter CO₂-Konzentration der Rückgang im Wurzel/Spross-Verhältnis weniger stark stimuliert wurde. Nur anhand der ANOVA über den gesamten Stichprobenumfang konnte für den Faktor

CO₂ ein signifikanter Einfluss auf das Wurzel/Spross-Verhältnis nachgewiesen werden, allerdings nur für 24 und für 28 Tage alte Weißkleepflanzen ($P=0,008$ bzw. $P=0,04$; Tab. A 4). Auch für den Behandlungsfaktor Stickstoff zeigte Varianzanalyse eine signifikante Beeinflussung des Wurzel/Spross-Verhältnisses der 28 und 30 Tage alten Pflanzen ($P=0,04$ bzw. $P=0,01$; Tab. A 4). Darüber hinaus bewirkte die unzureichende N-Versorgung eine Verringerung des Wurzel/Spross-Verhältnis, sowohl unter ambienter als auch unter erhöhter CO₂-Konzentration.

Tab. 3: Wurzel/Spross-Verhältnis von nicht-steril kultivierten Weißkleepflanzen in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration und der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Angegeben sind die Mittelwerte ($n = 5, P < 0,05$).

Pflanzenalter [Tage]	CO ₂ -Konzentration	N-Düngung	Wurzel/Spross-Verhältnis
24	400 ppm	+N	0,43 ^a
	800 ppm		0,36 ^{ab}
26	400 ppm	+N	0,50 ^a
		-N	0,34 ^a
	800 ppm	+N	0,33 ^a
		-N	0,33 ^a
28	400 ppm	+N	0,37 ^a
		-N	0,35 ^{ab}
	800 ppm	+N	0,35 ^{ab}
		-N	0,28 ^b
30	400 ppm	+N	0,36 ^a
		-N	0,30 ^a
	800 ppm	+N	0,36 ^a
		-N	0,31 ^a

Wie die Ergebnisse belegen, bewirkte erhöhtes CO₂ über den gesamten Versuchszeitraum einen tendenziellen und zum Teil signifikanten Biomassezuwachs von Spross und Wurzel. Dieser CO₂-Einfluss nahm mit zunehmendem Pflanzenalter ab und war unter mangelnder N-Versorgung schwächer ausgeprägt. Darüber hinaus war der Einfluss der erhöhten CO₂-Konzentration auf die Biomasseproduktion des Sprosses größer als auf die der Wurzel. Demgegenüber stand ein stärker ausgeprägter und früher nachzuweisender Effekt der unzureichenden N-Versorgung auf das Wurzelwachstum, verglichen mit dem Sprosswachstum. Des Weiteren konnte nur am letzten Beprobungstermin anhand des Mittelwertvergleich ein Interaktionseffekt der CO₂-Konzentration und N-Versorgung (CO₂×N) festgestellt werden.

3.2.2.2 *Veränderung der C- und N-Konzentrationen durch CO₂ und N-Versorgung*

Die Spross- und Wurzel-C-Konzentration wurde nur gering und zumeist nicht signifikant durch erhöhte CO₂-Konzentrationen beeinflusst. Auch der CO₂-Einfluss auf den absoluten C-Gehalt von Spross und Wurzel war minimal (Daten nicht aufgeführt; Abb. 25 und Abb. 26). Dagegen bewirkte die N-Limitierung an jedem Untersuchungstermin einen signifikanten Anstieg in der prozentualen C-Konzentration (Abb. 26), die auch hier mit dem Rückgang der N-Konzentration infolge mangelnder N-Versorgung zu erklären ist. Allgemein war die C-Konzentration im Spross höher als in der Wurzel. Zudem wurde bei einem Vergleich des ersten und letzten Untersuchungstermins bei adäquater N-Versorgung keine Veränderung in der C-Konzentration in Spross und Wurzel festgestellt. Der Einfluss erhöhter CO₂-Konzentration auf die Spross C-Konzentration war nur, wie die ANOVA über den gesamten Stichprobenumfang bewies, bei 30 Tage alten Pflanzen signifikant (Tab. A 4) und bewirkte einen minimalen Anstieg der Spross-C-Konzentration. Die Wurzel-C-Konzentration wurde nicht signifikant durch erhöhtes CO₂ beeinflusst. Demgegenüber konnte sowohl für den Spross als auch für die Wurzel an allen Untersuchungsterminen eine signifikante Erhöhung der C-Konzentration infolge unzureichender N-Versorgung nachgewiesen werden. Die Spross-C-Konzentration stieg bei 26 Tage alten Weißkleepflanzen nur bei erhöhter CO₂-Konzentration geringfügig um 2% an verglichen mit den Kontrollpflanzen, die ausreichend Stickstoff erhielten.

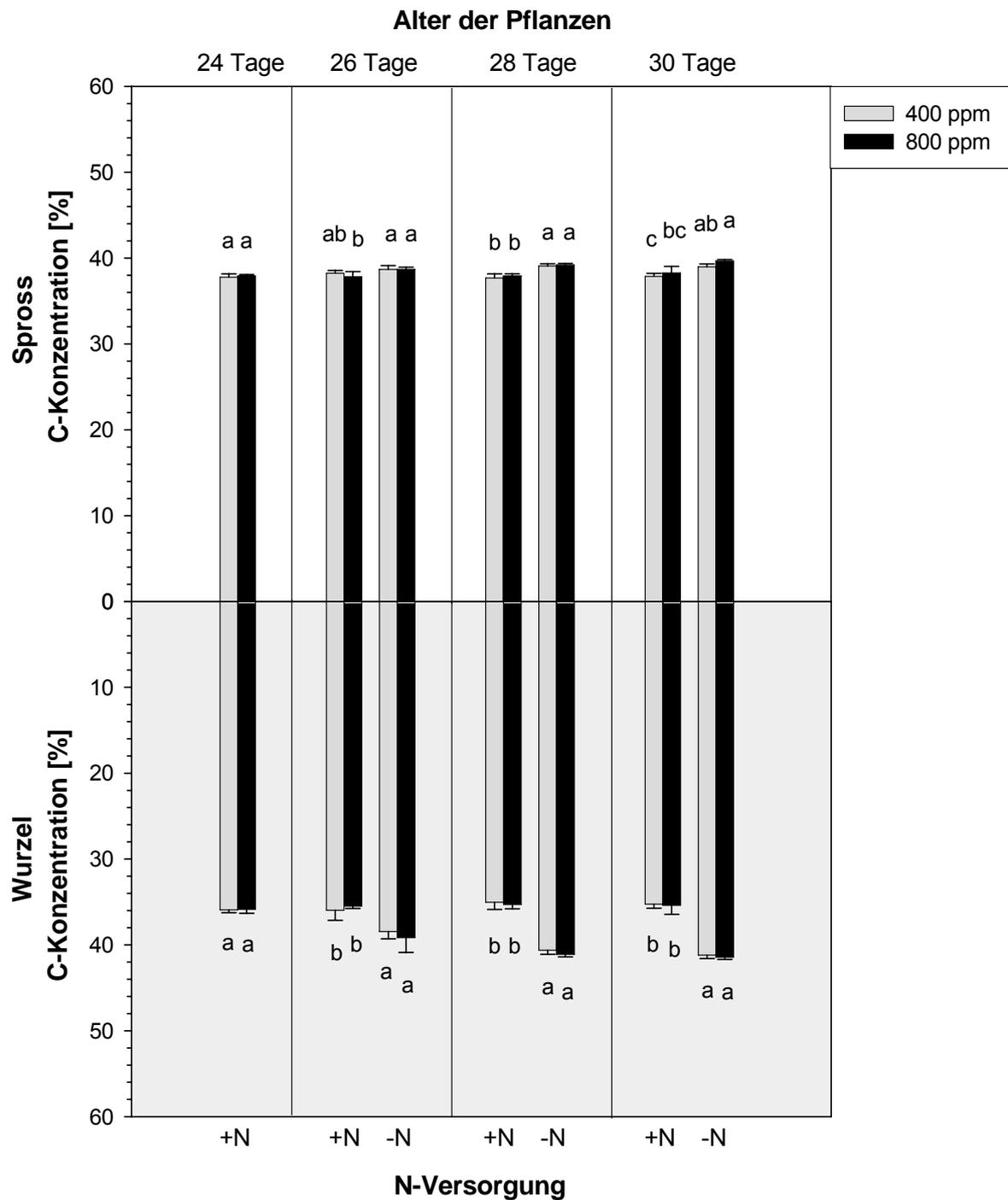


Abb. 26: Prozentuale C-Konzentration (bezogen auf die Trockenmasse) in Spross und Wurzel von *T. repens*-Pflanzen in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 5$, $P < 0,05$).

In der Weißkleewurzel führte der Mangel an Stickstoff zu einer deutlichen Erhöhung der C-Konzentration. Während bei 26 Tage alten Pflanzen ein Anstieg von 7% unter ambienter und 10% unter erhöhter CO₂-Konzentration verzeichnet wurde, zeigten die 28 und 30 Tage alten Weißkleepflanzen in beiden CO₂-Behandlungsvarianten eine prozentuale Erhöhung von 16% bzw. 17%.

Auch die N-Konzentration wurde nur minimal durch die erhöhte CO₂-Konzentration beeinflusst. Hingegen führte N-Mangel an jedem Untersuchungstermin zu einer signifikanten Reduktion der prozentualen N-Konzentration (Abb. 27). Allgemein betrug die N-Konzentration bei zusätzlicher N-Applikation in Spross und Wurzel zwischen 5 und 6%. Die Weißkleepflanzen waren somit an jedem Untersuchungstermin ausreichend mit Stickstoff versorgt (Kapitel 3.2.1.2). Ferner waren die N-Konzentrationen bei an N-limitierten Weißkleepflanzen in der Wurzel höher als im Spross. Ohne zusätzliche N-Versorgung lag die N-Konzentration bereits nach zwei Tagen unter 4,4%, so dass für die Weißkleepflanzen eindeutig ein Mangel an Stickstoff nachgewiesen werden konnte.

Für die N-Konzentration im Spross zeigte die ANOVA bei 30 Tage alten Weißkleepflanzen eine signifikante Beeinflussung durch erhöhtes CO₂ (P=0,005; Tab. A 4). Tendenziell konnte aber an allen Untersuchungsterminen eine Verringerung in der N-Konzentration nachgewiesen werden. Dagegen stieg die Wurzel-N-Konzentration durch die Erhöhung der CO₂-Umgebungskonzentration, vor allem bei ausreichender N-Applikation, tendenziell an allen Untersuchungsterminen an. Nur bei 30 Tage alten Pflanzen mit adäquater N-Versorgung war diese Erhöhung (um 6%) signifikant. Darüber hinaus wurde für Spross und Wurzel ein signifikanter Einfluss mangelnder N-Versorgung auf die Konzentration an Stickstoff bei 26, 28 und 30 Tage alten Pflanzen nachgewiesen. Die N-Konzentration nahm deutlich mit zunehmendem Pflanzenalter infolge des N-Mangels ab. Bei 30 Tage alten Pflanzen war die Verringerung an im Gewebe gespeicherten Stickstoff am größten und betrug für Spross und Wurzel 69% bzw. 43% unter ambienter und 72% bzw. 47% unter erhöhter CO₂-Konzentration.

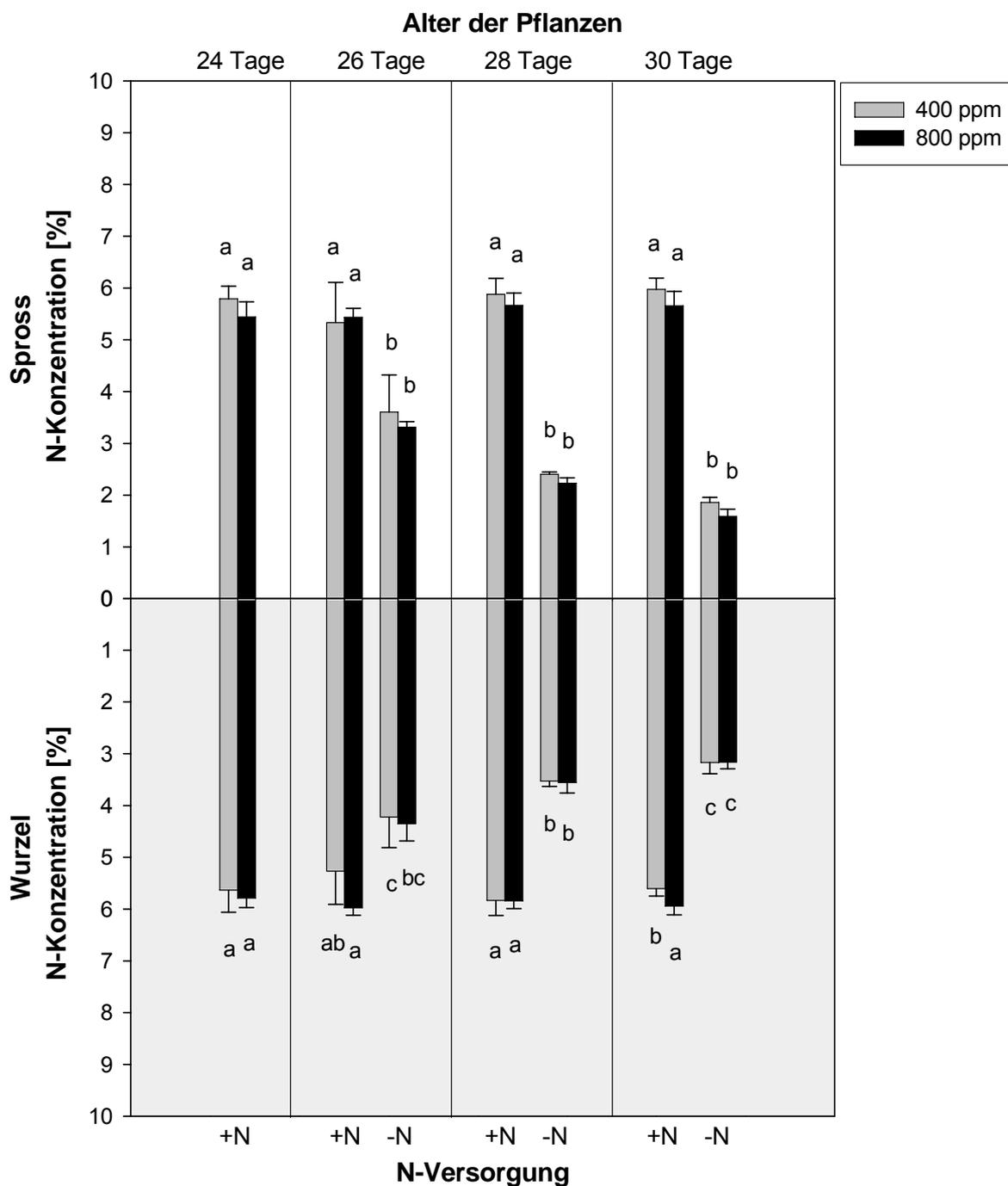


Abb. 27: Prozentuale N-Konzentration (bezogen auf die Trockenmasse) in Spross und Wurzel von *T. repens*-Pflanzen in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 5$, $P < 0,05$).

Generell war das C/N-Verhältnis im Spross höher als in der Wurzel und zeigte nur im Spross eine signifikante Beeinflussung durch erhöhtes CO₂. So wurde bei 28 und 30 Tage alten Weißkleepflanzen mit mangelnder N-Versorgung ein Anstieg des C/N-Verhältnisses von 8% bzw. 20% gegenüber N-Mangelpflanzen unter ambienter CO₂-Konzentration beobachtet. Der CO₂-Effekt war somit an die unzureichende N-Versorgung gekoppelt (Interaktionseffekt; Tab. A 4). Das C/N-Verhältnis in der Wurzel wurde nicht signifikant durch CO₂ beeinflusst. Die Unterversorgung an Stickstoff hatte sowohl im Spross als auch in der Wurzel eine signifikante Erhöhung des C/N-Verhältnis zur Folge, ausgenommen bei 24 Tage alten Weißkleepflanzen. Am letzten Untersuchungstermin war der N-Effekt am größten, so dass im Spross bzw. Wurzel ein Anstieg um 231% bzw. 107% unter ambienter und 270% bzw. 120% unter erhöhter CO₂-Konzentration nachgewiesen wurde. Wie die Werte zeigen, war die Erhöhung des C/N-Verhältnisses infolge mangelnder N-Versorgung in der Wurzel geringer als im Spross.

Tab. 4: C/N-Verhältnis in Spross und Wurzel in Abhängigkeit von der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und dem Pflanzenalter. Angegeben sind die Mittelwerte ($n = 5$, $P < 0,05$).

Pflanzenalter [Tage]	CO ₂ -Konzentration	N-Düngung	Spross C/N-Verhältnis	Wurzel C/N-Verhältnis
24	400 ppm	+N	6,53 ^a	6,41 ^a
	800 ppm	-N	6,99 ^a	6,20 ^a
26	400 ppm	+N	7,35 ^b	6,96 ^b
		-N	11,05 ^a	9,27 ^a
	800 ppm	+N	6,97 ^b	5,94 ^b
		-N	11,69 ^a	9,06 ^a
28	400 ppm	+N	6,43 ^c	5,99 ^b
		-N	16,26 ^b	11,52 ^a
	800 ppm	+N	6,70 ^c	6,05 ^b
		-N	17,61 ^a	11,59 ^a
30	400 ppm	+N	6,35 ^c	6,29 ^b
		-N	21,00 ^b	13,05 ^a
	800 ppm	+N	6,78 ^c	5,97 ^b
		-N	25,11 ^a	13,13 ^a

Der CO₂-Einfluss auf die C- und N-Konzentrationen von Spross und Wurzel war gering und nur vereinzelt signifikant ausgeprägt. Deutlicher hingegen war der Effekt der mangelnden N-Versorgung, der sowohl die C- und N-Konzentration als auch das C/N-Verhältnis signifikant beeinflusste. Interaktionseffekte der Behandlungsfaktoren CO₂ und Stickstoff konnten nur für die Wurzel-N-Konzentration sowie für das C/N-Verhältnis nachgewiesen werden.

3.2.2.3 Identifikation phenolischer Wurzelexsudate mittels HPLC-Analyse

Die Analyse und somit die Identifikation der unsteril gewonnenen Wurzelexsudate erfolgte nach der gleichen Methode wie zuvor für die sterilen Weißkleeexsudate (Kapitel 3.2.1.3). Anhand der HPLC-Analyse der unsterilen Wurzelexsudate wurden sieben Einzelsubstanzen nachgewiesen, die sich größtenteils von denen der steril gewonnenen Exsudate unterschieden. Durch den Vergleich der Retentionszeiten der detektierten Fraktionen mit den phenolischen Standardsubstanzen, konnten die Signalsubstanz 7,4'-DHF sowie der Inhibitor Umbelliferon identifiziert werden. Die anschließend durchgeführte Standardaddition bestätigte die zuvor beobachteten Ergebnisse. Das Umbelliferon wurde entsprechend seiner geringen Polarität zu Beginn der HPLC-Trennung, bereits 10 Minuten nach Einspritzung der Exsudatprobe detektiert (Abb. 28). In den Exsudaten von älteren Pflanzen wurde darüber hinaus nach etwa 20 Minuten die unbekannte Fraktion 2 (Abb. 28) nachgewiesen sowie an allen Beprobungsterminen eine Gruppe mit drei Fraktionen nach 24 bis 28 Minuten, zu der neben 7,4'-DHF auch die unbekanntes Fraktionen 3 und 4 zählten (Abb. 29). Zudem wurden in den Wurzelexsudaten der jüngeren Weißkleepflanzen – im Gegensatz zu den sterilen Exsudaten – zwischen 35 und 38 Minuten die unbekanntes Fraktionen 5 und 6 gemessen (Abb. 29). Formononetin und 4-Hydroxy-7-Methoxyflavon waren in nicht auswertbaren Spuren vorhanden.

Im anschließenden Wellenlängenscan wurden anhand der Verteilung der Maxima und Minima der detektierten Substanzen insgesamt vier verschiedene Gruppen unterschieden. Das antagonistisch wirkende Umbelliferon zeigte ein für einfache phenolische Substanzen charakteristisches Hauptmaximum bei 230 nm und Zweitmaximum bei 350 nm (Abb. 30). Allerdings ließen das untypische Absorptionsspektrum (Ausprägung einer Schulter) sowie der Vergleich mit dem Wellenlängenscan des synthetischen Umbelliferonstandards darauf schließen, dass das Umbelliferon von einer anderen, ähnlichen phenolischen Substanz

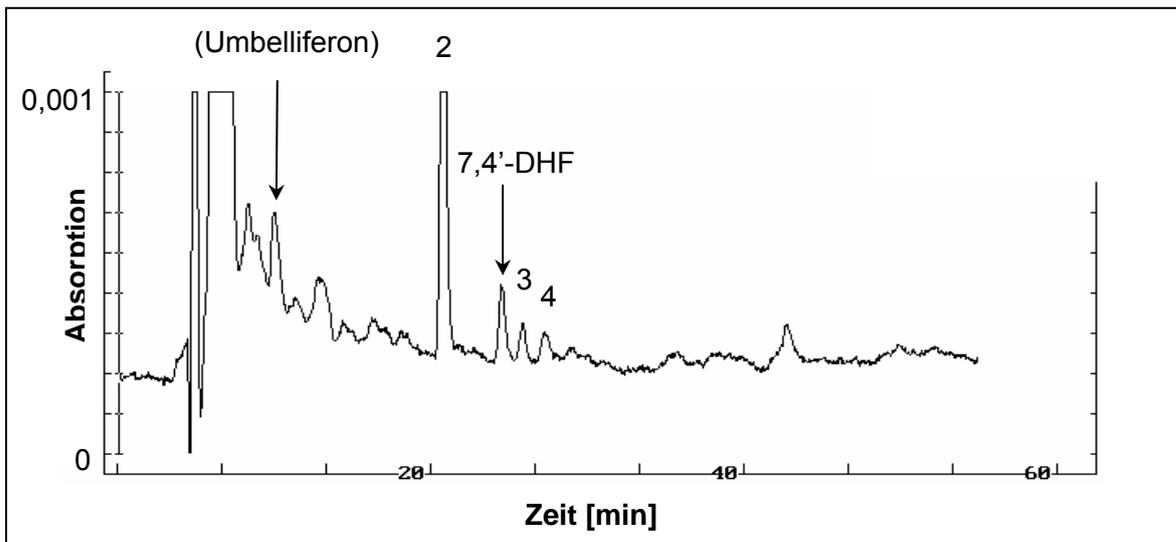


Abb. 28: Chromatogramm einer nicht-steril gewonnenen Exsudatprobe (800 ppm CO₂ und +N) von 28 Tage alten Weißkleeplanken. Zusätzlich wurde hier Umbelliferon und die unbekannte Fraktion 2 detektiert.

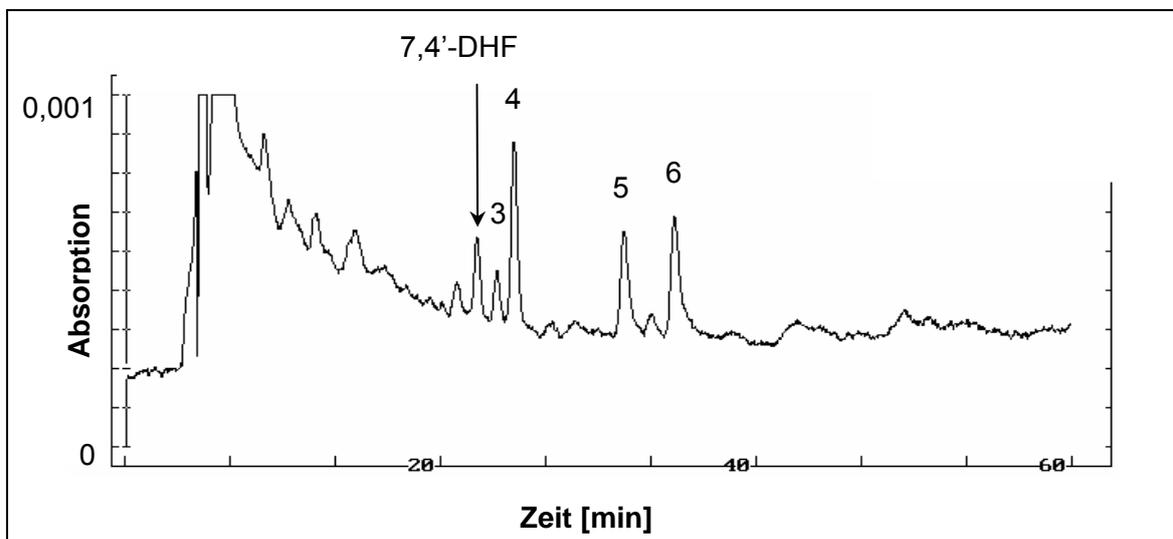


Abb. 29: Chromatogramm einer nicht-steril gewonnenen Exsudatprobe (800 ppm CO₂ und -N) von 24 Tage alten Weißkleeplanken. Neben 7,4'-Dihydroxyflavon (7,4'-DHF) konnten die unbekannt Fraktionen 3 und 4, sowie die Fraktionen 5 und 6 nachgewiesen werden.

überlagert wurde (Abb. 11). Auf weitere Analysen wurde daher verzichtet. Die unbekannte Fraktion 2 besaß mit drei auftretenden Maxima (270 nm, 300 nm und 335 nm) ein Absorptionsspektrum, welches sich deutlich von denen der einfachen Phenole und Hydroxyflavone unterschied (Abb. 30). Daneben war der Wellenlängenscan des vermeintlichen 7,4'-DHF identisch mit dem des synthetischen Standards und wies zudem ein ähnliches Absorptionsverhalten wie die unbekannte Fraktion 4 auf (Abb. 31). Das Hauptmaximum beider Phenole lag bei 330 bzw. 335 nm, das zweite Maximum bei 255 nm und das Minimum bei 270 nm. Die Absorptionsspektren der unbekanntenen Fraktionen 5 und 6 hatten einen ähnlichen Verlauf und Verteilung der Maxima und Minima wie das des 7,4'-DHF und der Fraktion 4 (Abb. 31). Allerdings war das Hauptmaximum im unteren Wellenlängenbereich zwischen 260 und 265 nm verlagert, während das Zweitmaximum bei 335 nm detektiert wurde. Das Minimum wurde, anders als bei dem Signalmolekül 7,4'-DHF und der Fraktion 4, erst bei 300 nm nachgewiesen.

Aufgrund der geringen vorhandenen Menge der unbekanntenen Fraktion 3, war für diese Exsudatkomponente kein Wellenlängenscan und somit keine weitere Identifikation möglich. Darüber hinaus lieferte die HPLC-Vergleichsanalyse sowie der Wellenlängenscan der weiteren synthetischen Standardsubstanzen (Kapitel 2.7.2) für die Identifikation ebenfalls keine zusätzlich verwertbaren Informationen.

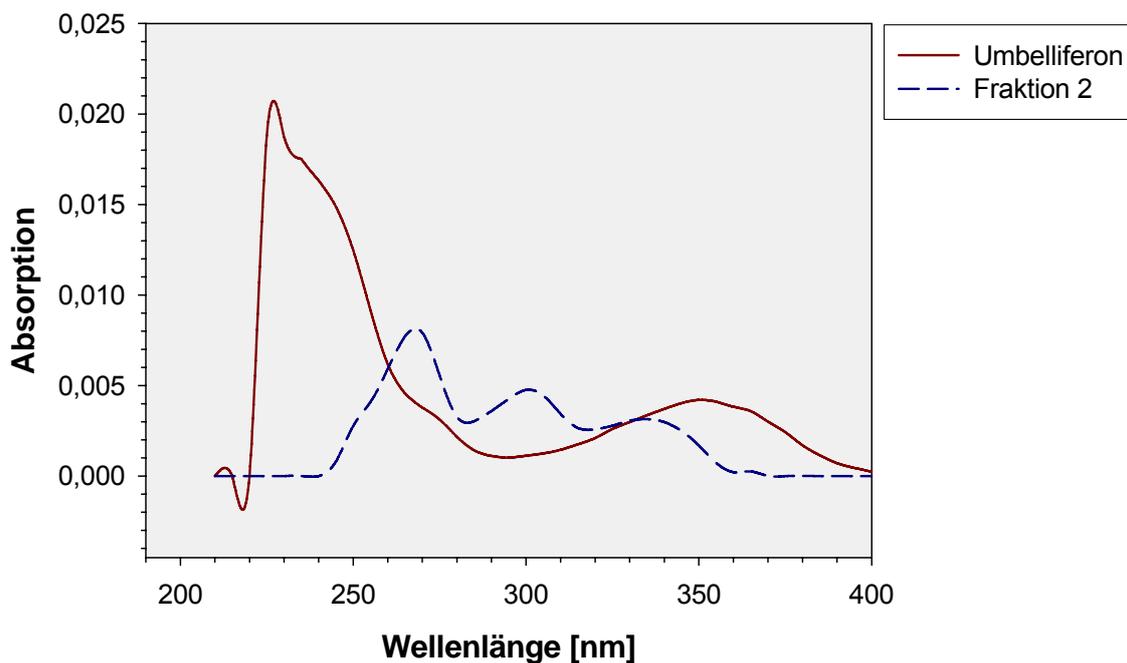


Abb. 30: Wellenlängenscan (200-400 nm) zur Bestimmung der phenolischen Verbindungen in nicht-steril gewonnenen Wurzelexsudaten von Weißklee.

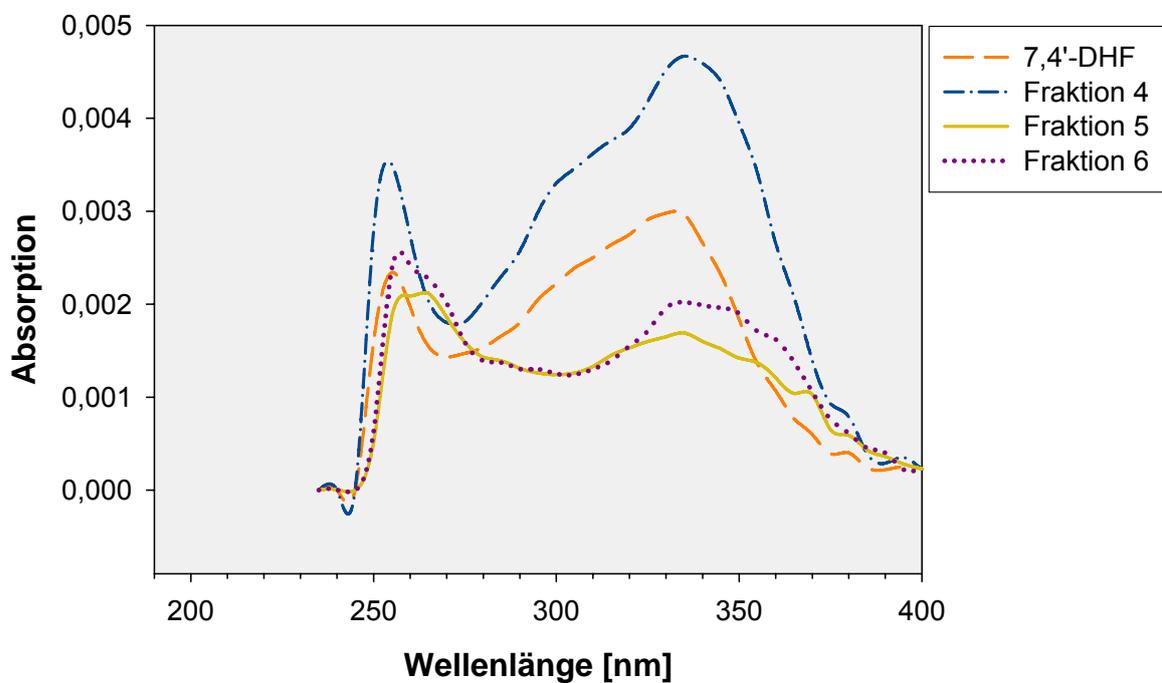


Abb. 31: Wellenlängenscan (200-400 nm) zur Bestimmung der weiteren phenolischen Verbindungen in nicht-steril gewonnenen Wurzelexsudaten von Weißklee.

Auch für die unsterilen Exsudatkomponenten wurde der Einfluss der beiden Behandlungsfaktoren CO₂ und N-Versorgung sowie der Effekt des Pflanzenalters auf das Exsudationsverhalten genauer analysiert.

Für die Abgaberate des Signalmoleküls 7,4'-DHF konnte über den gesamten Untersuchungszeitraum kein signifikanter Einfluss der CO₂-Konzentration und der N-Versorgung nachgewiesen werden (Abb. 32). Lediglich bei 24 Tage alten Weißkleeplanken zeigte die ANOVA einen signifikanten CO₂-Effekt ($P=0,028$; Tab. A 5), der zu einer Verminderung in der Abgaberate des 7,4'-DHF's führte. Allerdings hatte eine Erhöhung in der CO₂-Konzentration bei adäquater N-Versorgung generell eine reduzierte 7,4'-DHF-Abgaberate zur Folge, während bei N-limitierten Weißkleeplanken ein Anstieg beobachtet wurde.

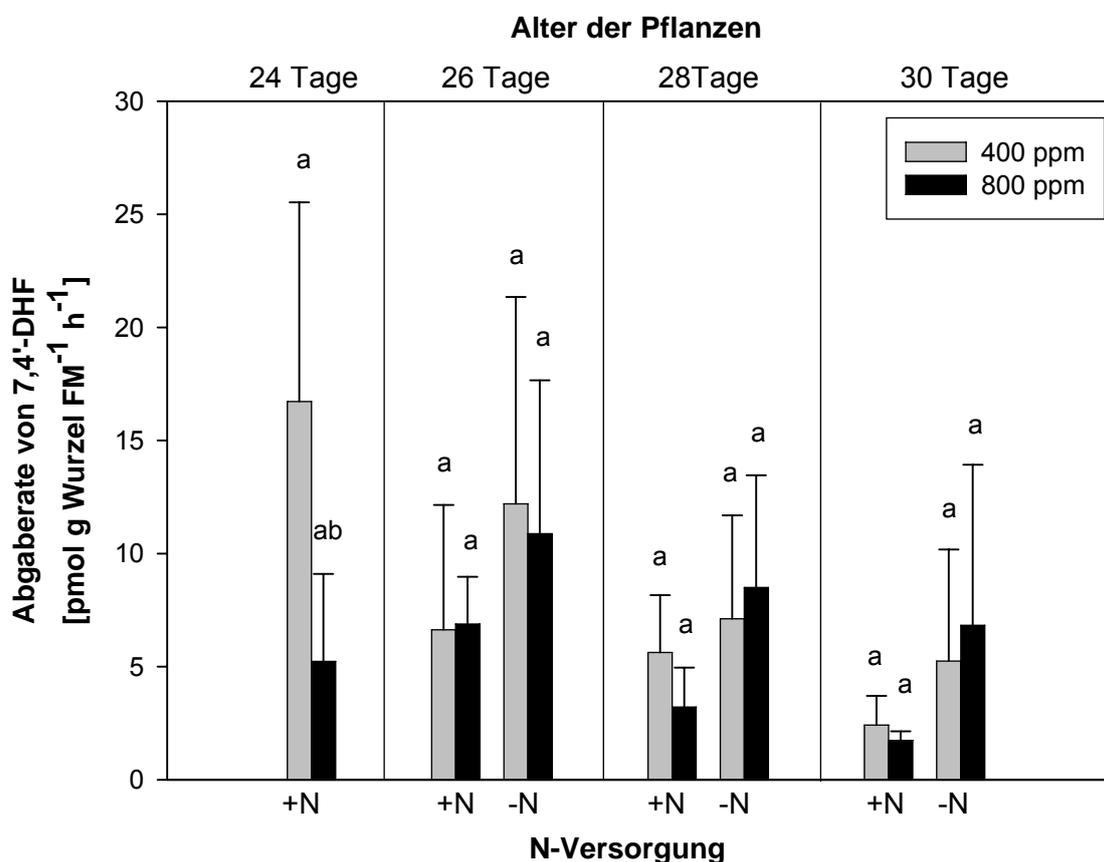


Abb. 32: Abgaberate von 7,4'-Dihydroxyflavon relativ zur Wurzelfrischmasse in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 5$, $P < 0,05$).

Dieser generelle CO_2 -Einfluss war an allen Untersuchungsterminen – ausgenommen bei 26 Tage alten Pflanzen – nachzuweisen. Darüber hinaus bewirkte der N-Mangel im Allgemeinen eine erhöhte Exsudation des Signalmoleküls, sowohl unter 400 ppm als auch unter 800 ppm CO_2 . Die 7,4'-DHF-Exsudation nahm zudem in älteren Weißkleepflanzen ab.

Auch das Exsudationsverhalten der unbekanntes Fraktion 2 war durch eine hohe Variabilität des CO_2 - und N-Einflusses gekennzeichnet (Abb. 33). Die Steigerung in der CO_2 -Konzentration hatte, wie die ANOVA belegte, nur bei 28 Tage alten Weißkleepflanzen einen signifikanten Einfluss ($P=0,02$; Tab. A 5) und bewirkte einen Anstieg der Abgaberate der Fraktion 2 in beiden N-Behandlungsvarianten. Für die 30 Tage alten Weißkleepflanzen wurde unter erhöhter CO_2 -Konzentration ebenfalls tendenziell eine höhere Abgaberate beobachtet, allerdings nur bei Pflanzen, die unzureichend an Stickstoff versorgt waren. Des Weiteren führte N-

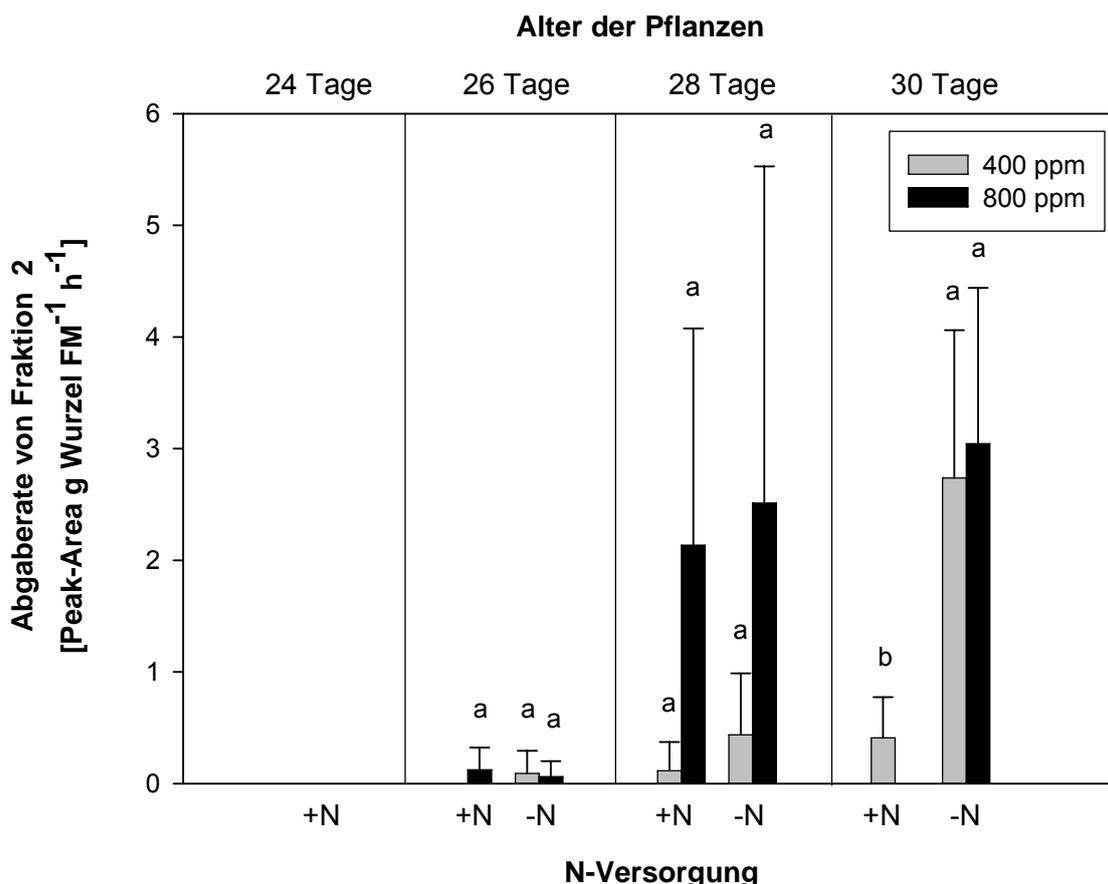


Abb. 33: Abgaberate der unbekanntes Fraktion 2 in Abhängigkeit der atmosphärischen CO_2 -Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 5$, $P < 0,05$).

Mangel generell zu einer erhöhten Abgaberate der Fraktion 2, sowohl unter 400 ppm als auch unter 800 ppm CO₂. Dieser Einfluss war allerdings nur bei 30 Tage alten Pflanzen unter ambienter CO₂-Konzentration signifikant und hatte eine Steigerung in der Exsudation um 568% gegenüber den Kontrollpflanzen mit ausreichender N-Versorgung zur Folge. Neben dem gering ausgeprägten CO₂- und N-Effekt beeinflusste vor allem das Pflanzenalter maßgeblich die Abgabe der Fraktion 2: ausschließlich ältere Weißkleeplanzen exsudierten diese phenolische Fraktion.

Im Hinblick auf das Exsudationsverhalten der unbekannt Fraktion 4 (Abb. 34), wurde, wie schon für das 7,4'-DHF, mit zunehmendem Pflanzenalter ein Rückgang in der Exsudation beobachtet. Daneben hatte die Erhöhung der CO₂-Konzentration keinen signifikanten Einfluss auf die Abgaberate, sondern führte nur

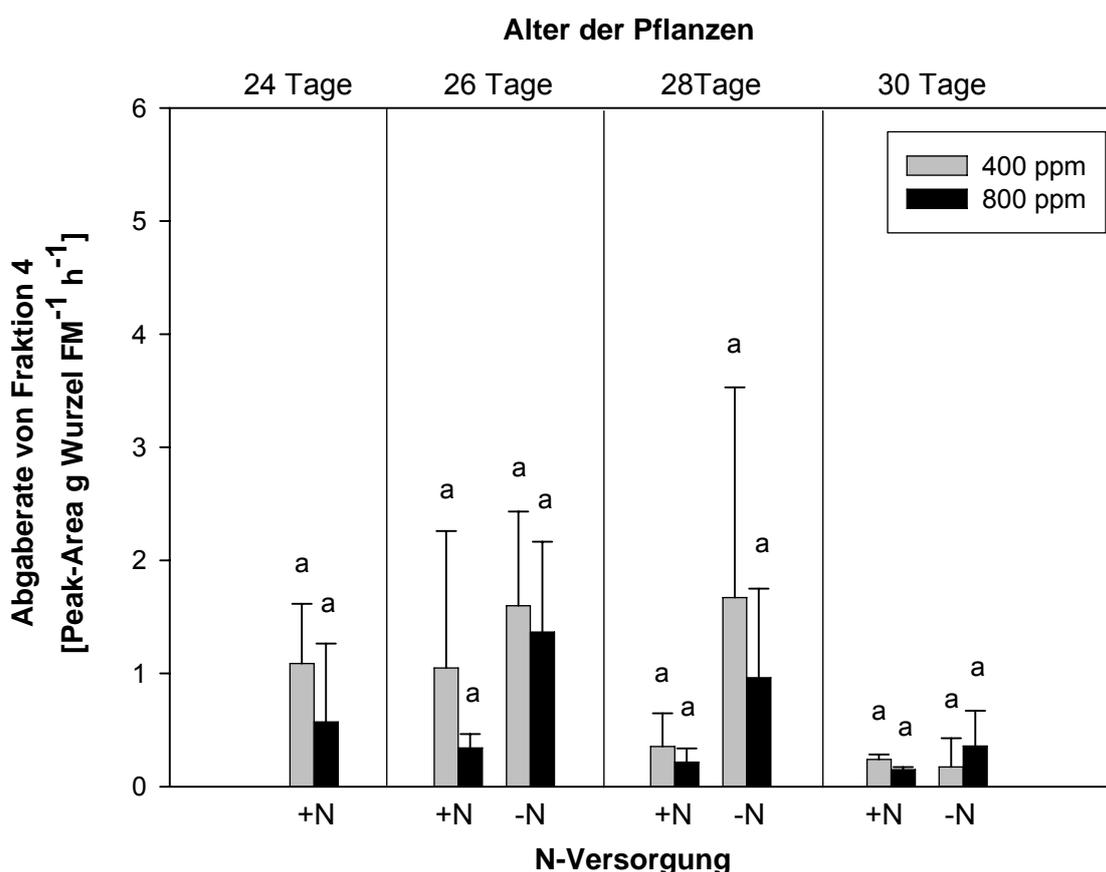


Abb. 34: Abgaberate der unbekannt Fraktion 4 in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 5$, $P < 0,05$).

tendenziell zu einer reduzierten Exsudation der phenolischen Fraktion in beiden N-Behandlungsvarianten. Hingegen konnte eine signifikante Beeinflussung unzureichender N-Versorgung anhand der ANOVA bei 28 Tage alten Weißkleepflanzen nachgewiesen werden ($P=0,031$; Tab. A 5), die – verglichen mit den Kontrollpflanzen mit adäquater N-Versorgung – eine erhöhte Abgabe zur Folge hatte. Dieser N-Einfluss wurde tendenziell auch bei 26 und 30 Tage alten Pflanzen beobachtet.

Auch für die unbekannte Fraktion 5 (Abb. 35) war ein zeitlicher Einfluss auf die Exsudation zu erkennen. Mit zunehmendem Pflanzenalter nahm die Exsudation des Phenols ab und konnte bei 30 Tage alten Weißkleepflanzen schließlich nicht mehr detektiert werden. Tendenzuell wurde auch hier infolge gesteigerter CO_2 -Konzentrationen zu jedem Zeitpunkt des Untersuchungszeitraums ein Rückgang

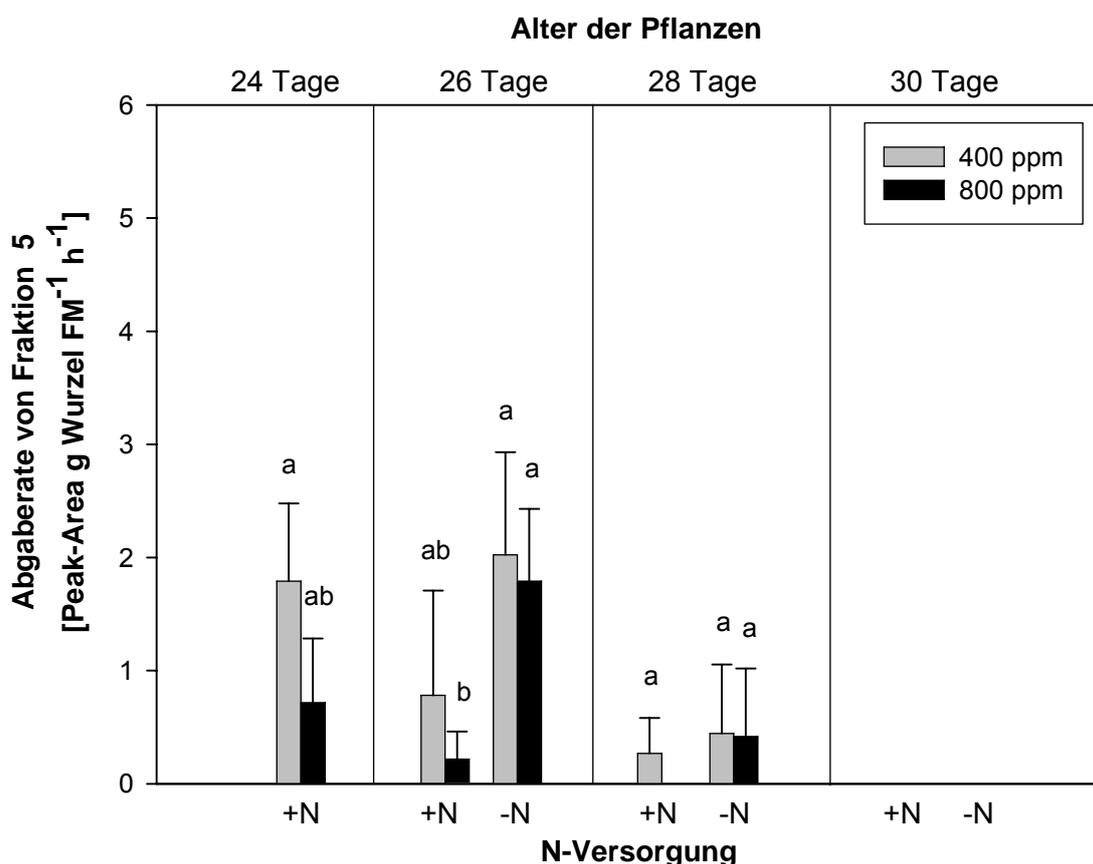


Abb. 35: Abgaberrate der unbekannten Fraktion 5 in Abhängigkeit der atmosphärischen CO_2 -Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 5$, $P < 0,05$).

in der Abgabe der Fraktion 5 beobachtet. Signifikant war dieser CO_2 -Einfluss, wie die ANOVA bestätigte, nur bei 24 Tage alten Pflanzen ($P=0,027$; Tab. A 5). Des Weiteren veranlasste die N-Limitierung prinzipiell die Weißkleepflanzen zu einer gesteigerten Abgabe der Fraktion 5. Allerdings war die Erhöhung (um 714%) ausschließlich bei 26 Tage alten Pflanzen unter erhöhter CO_2 -Konzentration signifikant.

Die Erhöhung der CO_2 -Konzentration und die unterschiedliche N-Versorgung der Weißkleepflanzen hatten über den gesamten Verlauf des unsterilen Exsudat-experiments keinen signifikanten Einfluss auf die Abgaberate der unbekanntes Fraktion 6 (Abb. 36). Wie schon für die Mehrzahl der unbekanntes Phenole beschrieben, bewirkte erhöhtes CO_2 generell eine verminderte Exsudation dieser Fraktion in beiden N-Behandlungsvarianten. Ferner hatte mangelnde N-Versorgung tendenziell einen Anstieg der Abgaberate zur Folge, sowohl unter

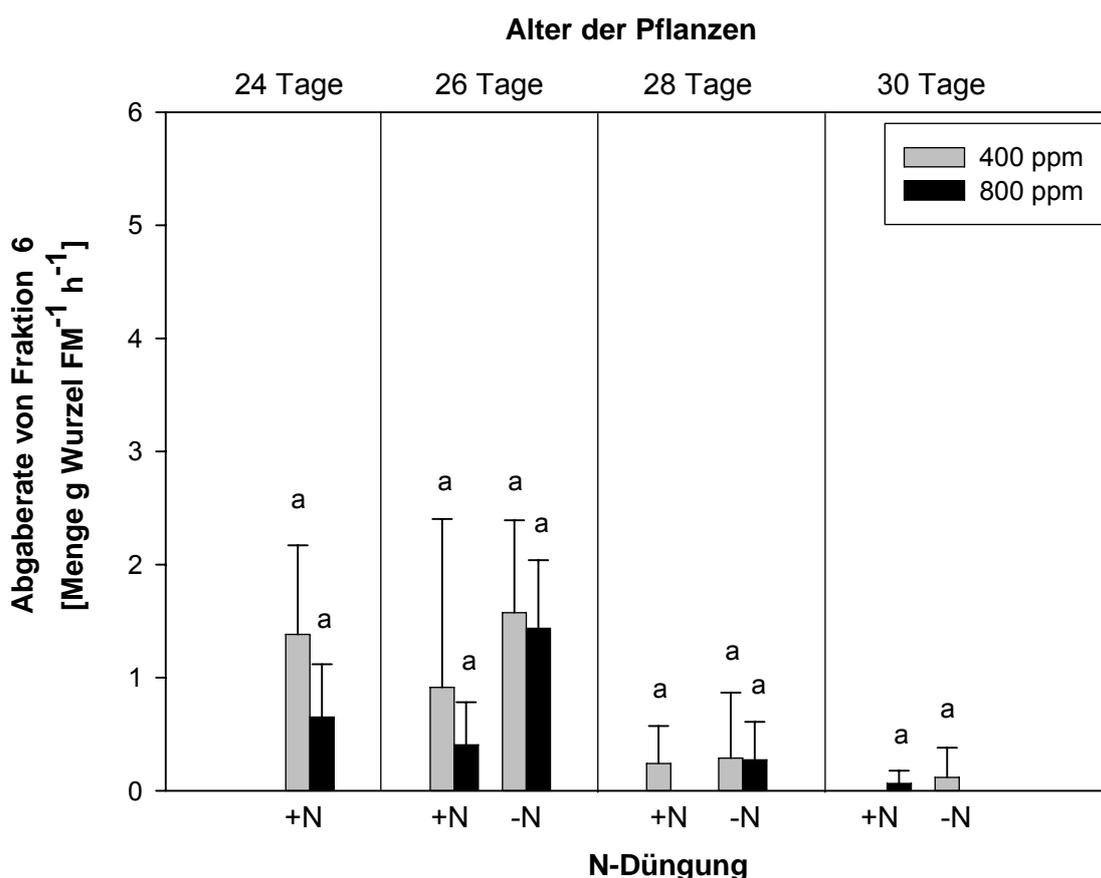


Abb. 36: Abgaberate der unbekanntes Fraktion 6 in Abhängigkeit der atmosphärischen CO_2 -Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 5$, $P < 0,05$).

400 ppm als auch unter 800 ppm CO₂. Die unbekannte Fraktion 6 zeigte ein vergleichbares Exsudationsverhalten wie die Fraktion 5: sie wurde ausschließlich in den Wurzelexsudaten von jüngeren Weißkleepflanzen nachgewiesen.

Die Exsudation der einzelnen phenolischen Fraktionen im nicht-sterilen Exsudatexperiment zeigte generell eine höhere Variabilität. So wurde nur vereinzelt ein signifikanter CO₂- und N-Effekt auf die Wurzelexsudation nachgewiesen. Allerdings konnte tendenziell für die Mehrzahl der Fraktionen mit Erhöhung der CO₂-Konzentration eine reduzierte Exsudation in beiden N-Behandlungen beobachtet werden. Den größten Einfluss auf das Exsudationsverhalten der einzelnen Fraktionen hatte das Pflanzenalter. Im Hinblick auf den Zeitpunkt der Exsudatabgabe konnten zwei Gruppen unterschieden werden: während die meisten Phenole vor allem von jüngeren Weißkleepflanzen exsudiert wurden, war die Fraktion 2 ausschließlich in den Wurzelexsudaten von älteren Pflanzen zu detektieren.

3.2.2.4 Identifikation phenolischer Wurzelexsudate mittels Massenspektroskopie

Für die weitere Identifikation der unbekannt Fraktionen, wurde, wie zuvor für die Fraktionen aus dem sterilen Exsudatexperiment, die Masse der HPLC-Fraktionen mittels LC-MS-Methode analysiert. Das Ergebnis der Analyse bestätigte auch hier, dass der synthetische 7,4'-DHF-Standard und das aus den Wurzelexsudaten isolierte 7,4'-DHF das gleiche Molekulargewicht von 254,2 besaßen. Gegenüber den anderen Fraktionen wies die unbekannte Fraktion 2 mit 215,2 eine deutlich geringere Masse auf (Abb. 37). Die Massenspektroskopie der unbekannt Fraktion 4 ergab schließlich ein Molekulargewicht von 284,2 (Abb. 38) und hatte somit die gleiche Masse, wie die aus den sterilen Exsudaten stammende Fraktion D. Für die Fraktionen 5 und 6 wurde schließlich mit der LC-MS-Analyse ein Molekulargewicht von 270,3 und 300,3 ermittelt.

Fraktion 2
(300 nm; 18.67 min)

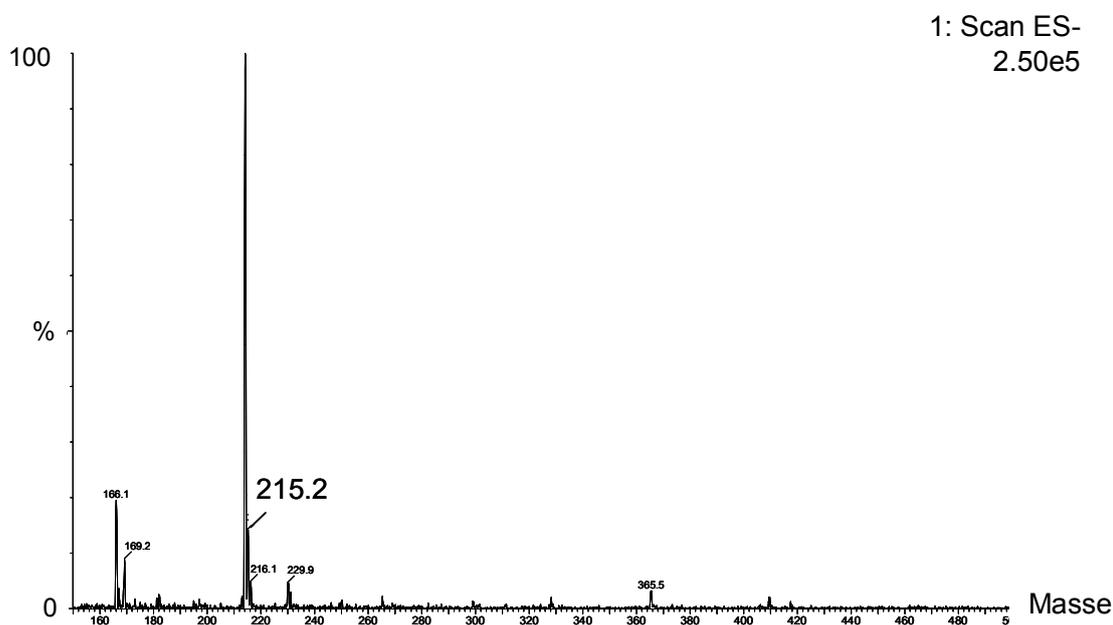


Abb. 37: Massenspektrum der aus Wurzelexsudaten isolierten Fraktion 2.

Fraktion 4
(300 nm; 19,24 min)

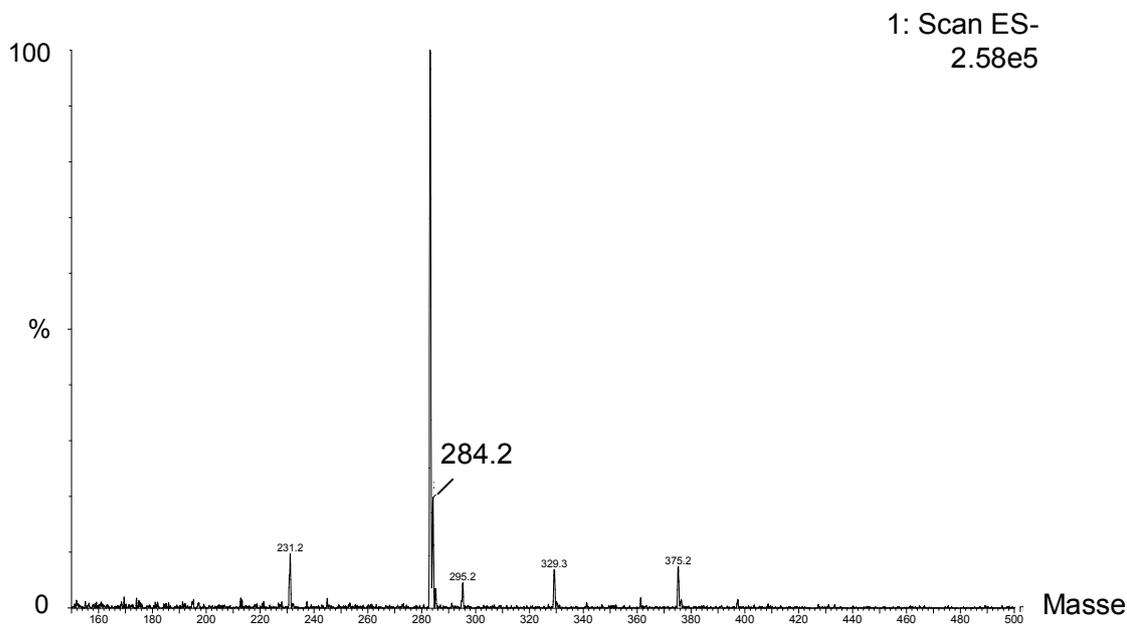


Abb. 38: Massenspektrum der aus Wurzelexsudaten isolierten Fraktion 4.

Die Masse des isolierten Umbelliferons und der unbekannte Fraktion 3 konnten nicht bestimmt werden, da die isolierte Menge der beiden Fraktionen nicht für eine LC-MS-Analyse ausreichte.

3.2.2.5 *Biologische Aktivität der der isolierten HPLC-Fraktionen*

Für die isolierten HPLC-Fraktionen 2, 4, 5, 6 sowie 7,4'-DHF sollte der *nod*-Gen-Induktionstest klären, inwieweit diese Fraktionen die Nodulationsgene zu aktivieren vermögen. Der Induktionstest zeigte nicht für alle Fraktionen eine messbare Gelbfärbung der Reaktionslösung bzw. erhöhte β -Galactosidase-Aktivität.

Die Berechnung der β -Galactosidase-Units nach Miller (1972) ermittelte für die einzelnen HPLC-Fraktionen folgende Werte:

<u>Fraktion</u>	<u>β-Galactosidase-Einheit</u>
2	0
7,4'-DHF	106,40
4	126,95
5	63,36
6	45,53

Wie der Induktionstest bewies, bewirkten lediglich die purifizierten Fraktionen 7,4'-DHF und 4 eine Aktivierung der Nodulationsgene. Das Aktivierungspotential der Fraktionen 5 und 6 war hingegen deutlich geringer. Dies war einerseits an der nur geringfügig sichtbaren Gelbfärbung der Reaktionslösung zu erkennen. Andererseits waren die gemessenen Werte der β -Galactosidase-Aktivität dieser Fraktionen sehr klein und somit die berechneten β -Galactosidase-Units geringer. Dagegen besaß die Fraktion 2 als einzige Exsudatkomponente nicht die Fähigkeit, die Nodulationsgene induzieren zu können.

Die Ergebnisse belegen, dass die Wurzelexsudate der nicht-steril kultivierten Weißkleepflanzen sowohl phenolische Komponenten enthielten, die die Nodulationsgene des Reporterstamms aktivieren können als auch Verbindungen, die nicht in den Nodulationsprozess involviert zu sein scheinen.

4 DISKUSSION

4.1 Genetische Anpassung von Rhizobien an ein neues C/N-Gleichgewicht im Swiss FACE

Die molekularbiologische Untersuchung der aus dem Swiss FACE stammenden *R. l. bv. trifolii*-Stämme zeigte eindeutig, dass nach 10 Jahren der Freiland CO₂-Begasung keine genetische Verschiebung in der Rhizobien-Population detektiert werden konnte. Wie die Hauptkomponentenanalyse der Fingerprints von *R. l. bv. trifolii* belegte, konnten die Rhizobien-Stämme in zwei Gruppen eingeteilt werden. Allerdings enthielten die Gruppe I und II zu annähernd gleichen Anteilen Isolate von Pflanzen, die unter ambienter und erhöhter CO₂-Konzentration kultiviert wurden (Abb. 6). Die *R. l. bv. trifolii*-Stämme unterschieden sich somit genetisch nicht voneinander. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu früheren Untersuchungen von MONTEALEGRE et al. (2000), die nach drei Jahren der CO₂-Begasung im Swiss FACE eine genetisch veränderte Zusammensetzung sowie eine veränderte Konkurrenzfähigkeit der *R. l. bv. trifolii*-Stämme nachgewiesen hatten. Die statistische Analyse der Fingerprints von MONTEALEGRE et al. (2000) identifizierte fünf Gruppen. Dreiundneunzig Prozent der Rhizobien-Stämme, die aus Weißkleeplanzen isoliert wurden, die unter erhöhter CO₂-Konzentration wuchsen, entfielen auf die Gruppe 4 und 5. Dagegen beherbergten die Gruppen 1, 2 und 3 zu mehr als 90% Isolate, deren Pflanzen unter ambienter CO₂-Konzentration kultiviert wurden. Die gefundenen Abweichungen in den Ergebnissen beider Arbeiten können nicht mit einem unterschiedlichen methodischen Ansatz erklärt werden, da die Probenentnahme, die Isolation sowie die Analyse der *R. l. bv. trifolii*-Stämme in beiden Arbeiten nach dem gleichen Verfahren erfolgten. Bestrebungen die Rhizobien-Isolate von MONTEALEGRE et al. (2000) trotzdem zu re-examinieren, scheiterte daran, dass diese Proben nicht mehr verfügbar waren.

Offensichtlich bewirkte in den ersten Jahren des Swiss FACE die Erhöhung der CO₂-Konzentration indirekt einen Selektionsdruck auf die Rhizobien-Population. Dabei schien die veränderte genetische Zusammensetzung im engen Zusammenhang mit der beobachteten Verdoppelung von *R. l. bv. trifolii*-Bakterien in der Rhizosphäre von *T. repens* (SCHORTEMAYER et al. 1996) und der Zunahme der N₂-Fixierung (ZANETTI et al. 1996; ZANETTI & HARTWIG 1997) als Folge

erhöhter atmosphärischer CO₂-Konzentration zu stehen. Im Allgemeinen wurden die Rhizosphärenorganismen indirekt durch Steigerung der Wurzelbiomasse, der Rhizodeposition bzw. Exsudation (u.a. von labilem Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen), aber auch durch Veränderung des C/N-Gehalts pflanzlicher Gewebe beeinflusst (Kapitel 1.3.3). Als Ursache für die genetische Verschiebung in der Rhizobien-Population wurden vor allem qualitative und quantitative Veränderungen der Wurzelexsudate von *T. repens* vermutet (SCHORTEMAYER et al. 1996; MARILLEY et al. 1999; MONTEALEGRE et al. 2000, 2002).

Dass in der vorliegenden Arbeit keine genetisch veränderte Zusammensetzung der *R. l. bv. trifolii*-Stämme mehr nachzuweisen war, kann nicht oder nicht alleine mit der Anpassung der Rhizobien an die erhöhten CO₂-Konzentrationen erklärt werden. Vielmehr scheinen die Veränderungen mit der Einstellung eines neuen C/N-Gleichgewichts im Graslandökosystem zusammenzuhängen. Es wird angenommen, dass die von MONTEALEGRE et al. (2000) beschriebenen CO₂-induzierten Veränderungen in der Populationsstruktur der Rhizobien unter Kontrolle eines Feedback-Mechanismus – verbunden mit dem C- und N-Status des Ökosystems bzw. des Bodens – standen (RICHTER 2003). In den ersten Jahren des Swiss FACE provozierte die Umwandlung der zuvor ackerbaulich genutzten Fläche in ein perennierendes Grassland eine hohe C- und N-Senke (VAN KESSEL et al. 2000, HARTWIG et al. 2002). Innerhalb dieses labilen Systems hatte die Erhöhung der CO₂-Konzentration einen signifikanten Einfluss sowohl auf die C- und N-Dynamik des Bodens als auch auf die Bodenmikroorganismen. So nahm die Verfügbarkeit an mineralischem Stickstoff im Boden mit Erhöhung der atmosphärischen CO₂-Konzentration ab (ZANETTI et al. 1997; ZANETTI & HARTWIG 1997). In Anlehnung an den von DÍAZ et al. (1993) und HARTWIG et al. (1996) postulierten Feedback-Mechanismus, bewirkte die Zunahme der Bodenmikroorganismen infolge erhöhter CO₂-Konzentrationen vermutlich eine Immobilisierung von Stickstoff und somit eine geringere Verfügbarkeit des mineralischen Stickstoffs für die Pflanzen. Gleichzeitig führte die CO₂-induzierte Steigerung der pflanzlichen Biomasse zu einem erhöhten Bedarf an Stickstoff, was zusätzlich zur Reduzierung des mineralischen Stickstoffpools beitrug. Als Folge nahm in den Weißkleebeständen die symbiotische N₂-Fixierung in den ersten drei Jahren des Swiss FACE zu (ZANETTI 1996). Nach 6- bis 8-jähriger CO₂-Begasung wurde allerdings ein Rückgang in der Stimulation der N₂-Fixierung beobachtet. Der vermehrte N-Eintrag durch die symbiotische N₂-Fixierung in das Ökosystem konnte somit das zu Beginn des Swiss FACE entstandene C/N-Ungleichgewicht allmählich ausgleichen (HARTWIG et al. 2000,

LÜSCHER et al., 2000 RICHTER 2003). Die beschriebene Stabilisierung des Grasslandökosystems hatte vermutlich einen Rückgang der indirekten CO₂-Beeinflussung der Mikroorganismen zur Folge, welcher auch die einheitliche Zusammensetzung der Rhizobien-Population erklärt. Somit ist es möglich, dass der Rückgang in der N₂-Fixierung nicht nur mit der gestiegenen Boden-N-Verfügbarkeit zusammenhing, sondern auch mit dem hier nachgewiesenen zeitlich veränderten CO₂-Einfluss auf die genetische Zusammensetzung der *R. l. bv. trifolii*-Stämme.

In diesem Zusammenhang ist es zudem denkbar, dass mit der Einstellung eines neuen C/N-Gleichgewichts ein verändertes bzw. angepasstes Exsudationsverhalten der Weißkleepflanzen einherging. Wie schon zuvor angeführt, wurde die beobachtete genetische Verschiebung der Rhizobien in den ersten Jahren der CO₂-Begasung im Swiss FACE mit qualitativen und quantitativen Veränderungen der Wurzelexsudate von *T. repens* begründet (s.o.). Einerseits dürfte die bessere Versorgung an mineralischem Stickstoff dazu geführt haben, dass die Pflanzen weniger phenolische Exsudate mit Signalwirkung in die Rhizosphäre abgaben, da sie auf den weniger energetisch aufwendigen Prozess der mineralischen N-Assimilation zurückgreifen konnten. Die Weißkleepflanzen waren somit nicht mehr auf die symbiotische N₂-Fixierung und die damit verbundene verstärkte Initiierung der Nodulation angewiesen. Darüber hinaus könnten auch mit der Einstellung eines neuen C/N-Gleichgewichts sich die zu Beginn des CO₂-Experiments postulierten qualitativen Veränderungen der Weißkleexsudate allmählich angepasst haben. Tatsächlich indizierten Studien unter kontrollierten Bedingungen, dass die Zusammensetzung der Rhizodeposition bzw. der Wurzelexsudate durch erhöhte atmosphärische CO₂-Konzentrationen beeinflusst werden kann. So konnte ein CO₂-Einfluss auf die Wurzelexsudate von *L. perenne* nachgewiesen werden, bei dem die Pflanzen geringere Mengen an Phenolsäuren und Zuckern unter erhöhtem CO₂ exsudierten (HODGE et al. 1998). Zudem ließen Ergebnisse von GRAYSTONE et al. (1998) auf ein höheres C/N-Verhältnis der exsudierten Substanzen infolge erhöhter CO₂-Konzentration schließen. Das neue C/N-Gleichgewicht im Grasslandökosystem könnte folglich auch zu einer Stabilisierung des C/N-Verhältnisses in den Wurzelexsudaten geführt haben, so dass die Exsudate von *T. repens* nach 10-jähriger CO₂-Begasung keine selektierende Wirkung mehr auf *R. l. bv. trifolii* besaßen.

Allerdings muss in diesem Zusammenhang auch kritisch angemerkt werden, dass die plötzliche, in der Literatur als „step-increase“ beschriebene CO₂-Erhöhung (CANNELL & THORNLEY 1998; NORBY et al. 1999; KÖRNER 2000; RICHTER

2003) vermutlich eine viel stärkere Auswirkung auf das Ökosystem hatte, als dies bei dem in der Natur tatsächlich stattfindenden allmählichen CO₂-Anstieg der Fall wäre. Es ist wahrscheinlich, dass bei einer gleichmäßigen Erhöhung der atmosphärischen CO₂-Konzentration die Folgen auf die Zusammensetzung der Rhizobien-Population geringer gewesen wären.

Die anfänglich im Swiss FACE gefundenen genetisch verschiedenen Subpopulationen waren folglich nur vorübergehend nachzuweisen und auf eine sich plötzlich veränderte CO₂-Umgebungskonzentration zurückzuführen, deren indirekte Folgen die Population von *R. l. bv. trifolii* kurzfristig maßgeblich beeinflussten. Mit der Einstellung eines neuen C/N-Gleichgewichts des Grassland-ökosystem konnten schließlich die CO₂-induzierten Veränderungen in der Rhizobien-Population nicht mehr detektiert werden.

Die in dieser Arbeit beschriebene Auftrennung der isolierten Rhizobien in die Gruppe I und II (Abb. 6) konnte nicht auf die Erhöhung der CO₂-Konzentration zurückgeführt werden. Auffällig ist allerdings, dass die Gruppe I überwiegend Rhizobien-Stämme enthielt, die aus Weißkleeplanzen des Kontrollrings 3 (C3) und des CO₂-begasteten Ring 3 (F3) isoliert wurden. Diese Versuchsfelder unterschieden sich gegenüber den anderen Flächen des FACE-Experiments (C1, C2, F1 und F2), dass sie einen geringeren organischen C-Gehalt aufwiesen (HARTWIG, mündliche Mitteilung). Darüber hinaus wurde für den dritten Versuchsblock ein Boden-pH-Wert von weniger als 5 ermittelt (DEIGLMAYR et al. 2004), für die übrigen Flächen hingegen ein durchschnittlicher pH von 7 (HEBEISEN et al. 1997). DEIGLMAYR et al. (2004) konnten in ihren Untersuchungen einen starken Einfluss des pH-Werts auf Mikroorganismen nachweisen: bei niedrigen pH-Werten wurden andere mikrobielle Gemeinschaftsstrukturen von Nitratreduzierern detektiert als unter neutralen Bodenbedingungen. Mit sehr großer Wahrscheinlichkeit bewirkte der niedrige Boden-pH auch eine Selektion von spezifischen *R. l. bv. trifolii*-Stämmen, die eine bessere Anpassung an die geringeren pH-Werte zeigten, so dass die isolierten Rhizobien des C3 und F3 Rings sich genetisch von den aus den anderen Versuchsfelder isolierten *R. l. bv. trifolii*-Stämmen unterschieden.

4.2 CO₂ stimuliert die Biomasseproduktion von Weißklee in Abhängigkeit der N-Versorgung und des Versuchsansatzes

Die im vorigen Abschnitt diskutierte Verschiebung der Rhizobien-Population in der Studie von MONTEALEGRE et al. (2000) war höchstwahrscheinlich die Folge indirekter CO₂-Beeinflussung. Diese Beobachtungen stehen im engen Zusammenhang mit dem direkten Einfluss erhöhter atmosphärischer CO₂-Konzentration auf *T. repens*, unter anderem auf das Wachstumsverhalten, die in dieser Arbeit unter kontrollierten Bedingungen untersucht wurden.

Eine Erhöhung der CO₂-Konzentrationen bewirkte sowohl im sterilen als auch im unsterilen Versuchsansatz bei *T. repens* eine Steigerung des Spross- und Wurzelwachstums, das bis zu über 100% betrug (Abb. 7, Abb. 25). Das Ausmaß der CO₂-Antwort war hierbei abhängig von der N-Versorgung der Pflanzen und von dem jeweiligen Versuchssystem. Eine CO₂-induzierte Stimulation der Biomasse in Abhängigkeit von der N-Verfügbarkeit wurde schon in zahlreichen CO₂-Experimenten für Nicht-Leguminosen nachgewiesen (GOUDRIAAN & DE RUITER 1983; HEBEISEN et al. 1997; OREN et al. 2001; SCHNEIDER et al. 2004; REICH et al. 2006), aber nur vereinzelt für Leguminosen (SIONIT 1983).

Der Photosyntheseapparat der C₃-Pflanzen bzw. die *RubisCO* ist bei ambienten atmosphärischen CO₂-Konzentrationen nicht gesättigt (DRAKE & GONZÁLEZ-MELER 1997; KÖRNER 1999; STRASBURGER et al. 2002). Die Erhöhung der CO₂-Konzentration auf 800 ppm führte somit bei *T. repens* zu einer gesteigerten Photosyntheseleistung, die in einer höheren C-Einlagerung in der pflanzlichen Biomasse (Kapitel 1.2) und schließlich in stärkerem Pflanzenwachstum resultierte. Auch die im Swiss FACE erworbenen Erkenntnisse stützen die Ergebnisse dieser Arbeit. So berichteten HEBEISEN et al. (1997a) von einer Steigerung der Weißkleebiomasse von 20% in den ersten drei Jahren des Freiland-CO₂-Experiments. Weitere Studien belegten sogar einen Anstieg in der Trockenmassebildung von 80% (HARTWIG et al. 2002) bzw. 100% (VAN KESSEL et al. 2000).

Die Antwort der Pflanzen auf erhöhte CO₂-Konzentrationen ist vor allem abhängig von der Verfügbarkeit anderer Nährstoffe, insbesondere Stickstoff, sowie der Lichtintensität (GOUDRIAAN & DE RUITER 1983; STITT & KRAPP 1999; REICH et al. 2006). Das durch CO₂ ausgelöste stärkere Pflanzenwachstum steigerte den N-Bedarf der Pflanze, so dass als Folge der gesteigerten Nährstoffaufnahme es schneller zur Reduzierung des mineralischen Stickstoffs und somit letztendlich zu einer Limitierung des Pflanzenwachstums kommen kann (INGESTAD 1982;

ZANETTI et al. 1997). Im Swiss FACE wurde allerdings unabhängig von der N-Versorgung eine CO₂-induzierte Stimulierung des Spross- und Wurzelwachstums von *T. repens* nachgewiesen (HEBEISEN et al. 1997a; VAN KESSEL et al. 2000; HARTWIG et al. 2002). Bei geringer N-Applikation konnten die Weißkleepflanzen im Feldversuch den erhöhten N-Bedarf aus der symbiotischen N₂-Fixierung decken (ZANETTI et al. 1996, 1997), so dass die Pflanzen nicht auf den mineralischen Stickstoff angewiesen waren.

Im sterilen Versuchsansatz der Magenta Boxen zeigte *T. repens* hingegen eine signifikant geringere CO₂-Antwort der Sprossbiomasse infolge von mangelnder N-Versorgung (Abb. 7). Demgegenüber wurde die positive CO₂-Reaktion der Wurzel durch den N-Mangel noch verstärkt (Abb. 7). Auch im unsterilen hydroponischen Gefäßversuch konnte mit zunehmendem N-Mangel eine geringere, wenn auch nicht-signifikante, Wachstumsstimulation der Weißkleepflanzen beobachtet werden (Abb. 25). Dieser gekoppelte CO₂-N-Effekt war vor allem im Spross sichtbar, was infolge der N-Limitierung mit einer reduzierten N-Verlagerung in den Spross (MARSCHNER 1995; KRONZUCKER et al. 1998) und verminderter Photosynthesekapazität zu erklären ist (GOUDRIAAN & DE RUITER 1983; STITT & KRAPP 1999). Da die Weißkleepflanzen in den beschriebenen Experimenten nicht inokuliert waren, ermöglichte die fehlende Nodulation somit keine ausgleichende N-Versorgung durch symbiotische N₂-Fixierung. Die beschriebene Abhängigkeit der Weißkleepflanzen von einer externen N-Versorgung führte letztendlich dazu, dass der N-Mangel die CO₂-Reaktion von *T. repens* limitierte. Somit zeigten die Weißkleepflanzen des sterilen und unsterilen Versuchsansatzes ein vergleichbares Wachstumsverhalten bei erhöhter CO₂-Konzentration wie Nicht-Leguminosen. Auch für die im Swiss FACE ebenfalls untersuchte Modellgrünlandpflanze *L. perenne* wurde eine reduzierte CO₂-Reaktion bei mangelnder N-Versorgung nachgewiesen (HEBEISEN et al. 1997; ZANETTI et al. 1997).

Von besonderem Interesse war der Wirkungseffekt der erhöhten CO₂-Konzentration und der N-Versorgung auf das Wurzelwachstum, da dies unmittelbar quantitativ die Wurzelexsudation und somit die Signalkaskade der *Trifolium-Rhizobien*-Symbiose beeinflusst. In den Magenta Boxen wurde die Wurzelbiomasse von *T. repens* positiv durch CO₂ stimuliert, unabhängig von der N-Versorgung (Abb. 7). Der CO₂-induzierte Zuwachs der Wurzelbiomasse (133%) war größer als der des Sprosses (93%), was sich auch in dem höheren Wurzel/Spross-Verhältnis widerspiegelte (Tab. 1). Auch im Swiss FACE konnte als Folge der CO₂-Erhöhung ein gesteigertes Wurzelwachstum für den Weißklee (JONGEN et al. 1995; HEBEISEN et al. 1996) sowie eine Erhöhung des

Wurzel/Spross-Verhältnis (VAN KESSEL et al. 2000) beobachtet werden. Allerdings fanden HARTWIG et al. (2002) eine Abnahme des Wurzel/Spross-Verhältnis, da das Wurzelwachstum von der CO₂-Erhöhung unbeeinflusst blieb. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Erhöhung des Wurzel/Spross-Verhältnisses kann zum Teil mit der CO₂-Wirkung begründet werden. Daneben ist es wahrscheinlich, dass das Sprosswachstum infolge räumlicher Limitierung der Pflanzen in den Boxen weniger stark durch CO₂ stimuliert wurde. Die Weißkleepflanzen stießen gegen Ende des Versuchs an die Deckel der Boxen. Auch eine Unterversorgung an anderen Nährstoffen ausser Stickstoff (z.B. Phosphor) kann das Wurzelwachstum gegenüber dem Sprosswachstum gefördert haben (FREDEEN et al. 1989; CAKMAK et al. 1994). Darüber hinaus führte Stickstoffmangel zu einem Anstieg der Wurzelbiomasse und somit auch zu einem größeren Wurzel/Spross-Verhältnis. Dieser Effekt wurde unter erhöhtem CO₂ noch verstärkt. Im Allgemeinen führt N-Limitierung bei Nicht-Leguminosen zu einer Verlagerung der Biomasse, bei der das Wachstum der Wurzel infolge höherer C-Transporte bevorzugt wird (MARSCHNER 1995; LEWIN et al. 1989; PEUKE et al. 1994). Im Swiss FACE wurde für *L. perenne* als Folge mangelnder N-Versorgung ein gesteigertes Wurzelwachstum und Wurzel/Spross-Verhältnis beobachtet (HEBEISEN et al. 1997, VAN KESSEL et al. 2000). Da die Weißkleepflanzen ohne Rhizobium-Inokulum die N-Limitierung nicht durch die symbiotische N₂-Fixierung ausgleichen konnten, reagierten sie wahrscheinlich mit einem verstärktem Transport von Assimilaten vom Spross in die Wurzel und folglich verstärkter C-Einlagerung (Kapitel 1.2). Die Zunahme des Wurzel/Spross-Verhältnisses ermöglichte es den Weißkleepflanzen normalerweise in einen größeren Wurzelraum vorzudringen und so die Nährstoffaufnahme zu verbessern. In Nährlösung allerdings bringt diese Strategie der Pflanzen keinen Vorteil. Auch im unsterilen Gefäßversuch förderte tendenziell CO₂ das Wurzelwachstum der Weißkleepflanzen. Allerdings war das Wurzel/Spross-Verhältnis aufgrund der stärkeren Stimulation der Sprossbiomasse geringer. Bei den 30 Tage alten Weißkleepflanzen konnten erste Anzeichen für die Blütenbildung beobachtet werden. Es ist daher denkbar, dass CO₂ zu Beginn der Reproduktionsphase eine weniger stimulierende Wirkung auf die Wurzel besaß. Die Unterversorgung an Stickstoff führte im unsterilen Gefäßversuch nicht zu einer gesteigerten Wurzelbiomasse. Die N-Limitation bewirkte indes eine Wachstumsstagnation und eine Verminderung des Wurzel/Spross-Verhältnisses. Diese gegensätzliche Beobachtung ist vermutlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass die Pflanzen sich zum Übergang in die generative Phase befanden und so die Energie bevorzugt in den Aufbau der Blüten investiert wurden.

Als Grund für den unterschiedlich stark ausgeprägten CO₂-Einfluss des sterilen und unsterilen Versuchssystems können mehrere Faktoren verantwortlich gewesen sein. Die Magenta Box als geschlossenes System besaß ein eigenes Mikroklima. Des Weiteren hat das höhere Alter der Weißkleepflanzen im unsterilen hydroponischen Gefäßversuch wahrscheinlich eine entscheidende Rolle gespielt. Die Erhöhung der CO₂-Konzentration führte somit vermutlich mit zunehmendem Pflanzenalter zu einer geringeren Stimulation der pflanzlichen Biomasse. Tatsächlich belegen Studien u.a. mit *Medicago sativa* (BAYSDORFER & BASSHAM 1985), *Poa alpina* (BAXTER et al. 1994), *Arabidopsis thaliana* (VAN DE KOOIJ & DE KOK 1996) und *Nicotiana tabacum* (GEIGER et al. 1998), dass CO₂-Begasung die relative Wachstumsrate in jungen Pflanzen stimulierte, während die relative Wachstumsrate in älteren Pflanzen abnahm bzw. unbeeinflusst blieb. Pflanzen durchlaufen zudem unter erhöhter CO₂-Konzentration die einzelnen Entwicklungsphasen schneller und erreichen somit früher das seneszente Stadium, in dem eine CO₂-Stimulation nicht mehr erfolgt (RYLE et al. 1992; STITT & KRAPP 1999). Es ist sehr wahrscheinlich, dass sich die Weißkleepflanzen in einer Entwicklungsphase befunden haben, in der CO₂ nur noch eine verminderte stimulierende Wirkung hatte. Während des Untersuchungszeitraums befanden sich die Pflanzen im Übergang von der vegetativen zur generativen Phase. Als Folge reagierte das vegetative Wachstum der Weißkleepflanzen weniger stark auf CO₂. Auch könnten äußere Einflüsse, wie die Beeinflussung von Mikroorganismen, und/oder versuchsbedingte klimatische Schwankungen in der Klimakammer eine höhere Variabilität in der CO₂-Reaktion der Pflanzen hervorgerufen haben.

Auffällig ist, dass die Weißkleepflanzen in den Magenta Boxen annähernd ein ähnliches Spross- und Wurzelgewicht aufwiesen, wie die Pflanzen im unsterilen Gefäßversuch, obwohl die Magenta Boxen wesentlich mehr Pflanzen enthielten (30 gegenüber zwei Weißkleepflanzen im unsterilen Versuch; Bild 11, Bild 12). Eine mögliche Erklärung für die verhältnismäßig geringere Biomasse der Weißkleepflanzen in den Magenta Boxen ist, dass das Wachstum der Pflanzen limitiert war. Der Einfluss erhöhter CO₂-Konzentrationen ist abhängig von weiteren vorherrschenden Umweltbedingungen und wenn das Wachstum limitiert ist, ist die Reaktion der Pflanzen auf CO₂ gering und die Photosyntheseleistung wird herunterreguliert (WALDRAW 1990). Die CO₂-Antwort der Pflanzen wird hauptsächlich durch die Nährstoffverfügbarkeit und die Lichtintensität beeinflusst (GOUDRIAAN & DE RUITER 1983). Eine Limitierung der Nährstoffe als Ursache scheint unwahrscheinlich, da auch Pflanzen mit ausreichender N-Versorgung eine

Wachstumslimitierung zeigten. Vielmehr könnte Lichtmangel die verminderte Biomassestimulation verursacht haben. Kondenswasser minimierte nämlich die Lichtzufuhr in den Boxen. Auch die räumliche Limitierung hat mit großer Wahrscheinlichkeit hier eine Rolle gespielt. Eine weitere Erklärung könnte eine CO₂-Limitierung in den Boxen gewesen sein. Obwohl die Deckel der Magenta Boxen mit ihrer speziellen Membran einen ausreichenden Gasaustausch gewährleisten sollten, könnte der CO₂-Verbrauch in den Boxen größer gewesen sein als die CO₂-Nachlieferung, die für eine effiziente Photosynthese nötig gewesen war. Auch G. NEUMANN (mündliche Mitteilung) beobachtete in einem geschlossenen, sterilen Versuchsansatz mit *Phaseolus vulgaris* als Folge der CO₂-Limitierung eine verminderte Wachstumsreaktion.

4.3 CO₂ beeinflusst unter N-Limitierung ausschließlich das C/N-Verhältnis im Spross

Eine Veränderung des C/N-Verhältnisses pflanzlicher Gewebe unter erhöhter CO₂-Konzentration, insbesondere der Wurzel, wird oftmals mit als Hauptgrund für eine veränderte Rhizodeposition bzw. Wurzelexsudation und somit indirekte CO₂-Beeinflussung der Rhizosphärenorganismen angeführt (VAN VEEN et al. 1991; RATTRAY et al. 1995; PATERSON et al. 1996). In den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten hatte die Erhöhung der CO₂-Konzentration nur im Spross von *T. repens* unter N-Limitierung eine Erhöhung des C/N-Verhältnisses zur Folge. Dies war sowohl bei den Weißkleepflanzen der Magenta Boxen als auch bei den älteren Pflanzen des hydroponischen Gefäßversuchs der Fall (Tab. 2, Tab. 4).

Bei erhöhter CO₂-Konzentration wird der Anstieg des C/N-Verhältnisses pflanzlicher Gewebe mit einer vermehrten C-Einlagerung in die Biomasse infolge gesteigerter Photosyntheseleistung begründet (COÛTEAUX et al. 1991, GORISSEN et al. 1995; KÖRNER 2000). Zusätzlich erfolgt für gewöhnlich mit zunehmender Akklimatisierung an die veränderten CO₂-Bedingungen, ein Rückgang der N-Konzentration insbesondere in den oberirdischen Organen der Pflanze, so dass das C/N-Ungleichgewicht noch verstärkt wird. Ist das Ökosystem zudem noch N-limitiert, nimmt dieser Effekt zu. Für die geringere N-Konzentration im Gewebe ist der gesteigerte Abbau oder die Degenerierung von Proteinen, wie der *RubisCO*, in den Blättern verantwortlich (WEBBER et al. 1994; DRAKE & GONZÁLEZ-MELER 1997; KÖRNER 2000).

In dem hier angeführten Experiment unter sterilen und unsterilen Versuchsbedingungen ist die Erhöhung des C/N-Verhältnisses im Spross allerdings allein auf einen verstärkten Rückgang der N-Konzentration zurückzuführen (Abb. 8, Abb. 27). Die C-Konzentration blieb hingegen weitgehend unbeeinflusst, obwohl der absolute C-Gehalt zunahm. Eine Abnahme der N-Konzentration im pflanzlichen Gewebe mit gleichzeitiger Zunahme des C/N-Verhältnisses konnte schon in früheren CO₂-Studien beobachtet werden (O'NEIL et al. 1987; COLEMAN et al. 1993; COTRUFO et al. 1998). Infolge des zunehmenden N-Mangels wurde vermutlich weniger Stickstoff in den Spross der Weißkleepflanzen transportiert und/oder die N-Nutzungseffizienz der Pflanzen erhöht, indem mehr Stickstoff aus dem Spross in die Wurzel verlagert wurde. Die gleichzeitige Erhöhung der CO₂-Konzentration verstärkte den angeführten N-Effekt, da die Weißkleepflanzen wegen des gesteigerten Nährstoffbedarfs schneller an Stickstoff limitiert waren (Kapitel 4.2). Oftmals wird die Abnahme der N-Konzentration in den Blättern mit dem Abbau der *RubisCO* erklärt (STITT & KRAPP 1999). Unter erhöhten atmosphärischen CO₂-Bedingungen ist weniger *RubisCO*-Protein notwendig um dieselbe Assimilationsrate zu erreichen, weil jedes *RubisCO*-Enzym mit höherer Kapazität arbeitet. Der aus dem Abbau der *RubisCO* stammende Stickstoff kann alternativ für den Aufbau nicht-photosynthetischer Organe, wie die Wurzel, bereitgestellt werden. (STITT & KRAPP 1999). Zudem nimmt unter erhöhter CO₂-Konzentration im Allgemeinen die N-Nutzungseffizienz der Pflanze zu (HOCKING & MEYER 1991; ROGERS et al. 1993; JACOB et al. 1995). Tatsächlich konnte eine Erhöhung des Wurzel/Spross-Verhältnisses im sterilen Experiment beobachtet werden. Auch wenn für diese Arbeit keine Angabe über den Protein- und/oder *RubisCO*-Gehalt in den Blättern vorliegen, ist es unwahrscheinlich, dass die beschriebene Abnahme der Spross N-Konzentration auf den verstärkten Abbau der *RubisCO* zurückgeht. Andernfalls hätte eine erhöhte CO₂-Konzentration auch bei ausreichender N-Versorgung eine Abnahme der Spross-N-Konzentration über den Versuchszeitraum provozieren müssen (Abb. 27). Gestützt wird diese Vermutung durch die Studie von WALCH-LIU (2001): bei Tabak führte erhöhtes CO₂ zur Reduzierung des *RubisCO*-Gehalts in den Blättern unabhängig von der N-Versorgung. Eine erhöhte N-Nutzungseffizienz durch den Abbau der *RubisCO* in den Weißkleepflanzen als Folge des Interaktionseffekts erscheint somit unwahrscheinlich. Vielmehr wurde durch die N-Limitierung die N-Verlagerung in den Spross gedrosselt.

Auch VAN KESSEL et al. (2000) konnten im Swiss FACE bei erhöhtem CO₂ für *L. perenne* und *T. repens* eine Erhöhung des C/N-Verhältnisses im Spross infolge

reduzierter N-Konzentration im Spross nachweisen. Während das C/N-Verhältnis von *T. repens* unabhängig von der N-Versorgung auf CO₂ reagierte (s.u.), war für *L. perenne* das Ausmaß der Erhöhung des C/N-Verhältnisses abhängig von der jeweiligen N-Versorgung. Im Gegensatz zu dem Freilandexperiment konnte in dieser Arbeit allerdings bei ausreichender N-Applikation kein CO₂-Einfluss auf das C/N-Verhältnis detektiert werden.

Auf das C/N-Verhältnis der Weißkleewurzel beider Versuchsansätze hatte die Erhöhung der CO₂-Konzentration unabhängig der N-Versorgung hingegen keinen Einfluss (Tab. 2, Tab. 4). Im Gegensatz zum Spross führte die N-Limitierung unter erhöhtem CO₂ nicht zu einem Rückgang der Wurzel-N-Konzentration (Abb. 8, Abb. 27), da mehr Stickstoff für den Aufbau eines größeren Wurzelsystems investiert und als Konsequenz weniger Stickstoff in den Spross transportiert wurde (Kapitel 4.2). Im Swiss FACE konnte für *T. repens* und vereinzelt auch für *L. perenne* ebenfalls kein CO₂-Einfluss auf die N-Konzentration der Wurzeln festgestellt werden (JONGEN et al. 1995; VAN KESSEL 2000; HARTWIG et al. 2002). Andere Studien belegen indes eine Abnahme der Gewebe N-Konzentration in der Wurzel von Nicht-Leguminosen unter erhöhtem CO₂ und als Folge eine Erhöhung des C/N-Verhältnisses (OVERDIECK & REINING 1986; JONGEN et al. 1995; PENDALL et al. 2004).

Wie C/N-Daten belegen, hat in beiden Versuchsansätzen keine Akklimatisierung an die CO₂-Konzentration im eigentlichen Sinne stattgefunden. Der Zeitpunkt der Akklimatisierung, scheint – neben der allgemeinen Nährstoffversorgung – von der Spezies und/oder vom Versuchsdesign abhängig zu sein. Für Tabak, als schnellwachsende Kulturpflanze, konnte unter kontrollierten Bedingungen schon nach 9 Tagen eine Verminderung des *RubisCO*-Gehalts nachgewiesen werden (WALCH-LIU et al. 2001). Weißklee als perennierende bzw. langsam wachsende Pflanze reagiert anscheinend erst mit länger andauernder CO₂-Begasung mit einem Abbau des carboxylierenden Enzyms. Eine Akklimatisierung wurde zudem oftmals erst bei Langzeit-CO₂-Begasung von Wochen bis Monaten nachgewiesen (SAGE et al. 1989; ARP et al. 1991; STITT & KRAPP 1999), selten innerhalb von wenigen Tagen (WÜRTH et al. 1998). Daneben könnte auch der hydroponische Versuchsansatz aufgrund der ausgeglicheneren Nährstoffversorgung eine Reduzierung der *RubisCO* hinausgezögert haben. ARP (1991) und POORTER et al. (1997) wiesen darauf hin, dass eine Abnahme des absoluten Blatt-N-Gehalts unter erhöhtem CO₂ kleiner war, wenn die Pflanzen in hydroponischer Kultur kultiviert wurden, gegenüber Pflanzen im Topfexperiment. Dieses Phänomen wurde auf eine verbesserte N-Versorgung in hydroponischer Kultur zurückgeführt.

4.4 Identifikation von Komponenten in Wurzelexsudaten als aglycosidische Flavone mit Signalfunktion

Die isolierten Fraktionen aus den steril und unsteril gewonnenen Exsudaten von *T. repens* konnten anhand ihrer Polaritätseigenschaften, Absorptionsverhalten, Molekulargewichte sowie ihrer aktivierenden oder inhibitorischen Wirkungen chemisch charakterisiert werden. Dabei ließen vor allem die Ergebnisse der HPLC-Analysen und der Massenspektroskopie darauf schließen, dass die Wurzelexsudate in beiden Versuchsansätzen aglycosidische Phenole enthielten. Zum einen zeigten die Chromatogramme der hydrolysierten (Daten nicht angeführt) und unbehandelten Exsudatproben keine Unterschiede. Zum anderen besitzen die Glycoside für gewöhnlich ein deutlich höheres Molekulargewicht, als es für die hier isolierten Fraktionen nachgewiesen wurde (HARBORNE & BAXTER 1999). Flavonoide werden als Aglyca oder glycosidische Konjugate von der Wurzel abgegeben (RHIJN & VANDERLEYDEN 1995). Aglyca besitzen zwar eine geringere Löslichkeit als die Glycoside, dafür aber ein höheres Aktivierungspotential als *nod*-Gen-Induzierer (HARTWIG & Phillips 1991; HUNGRIA et al. 1991a; SHAW et al. 2006). Alle isolierten Fraktionen besaßen, mit Ausnahme der Fraktion 2, zudem die Fähigkeit die Nodulationsgene des Reporterstamms zu aktivieren und bewiesen somit ihre funktionelle Bedeutung während des Nodulationsprozesses (Kapitel 3.2.1.5 und Kapitel 3.2.2.5).

Für die aus den steril gewonnen Exsudaten nachgewiesenen Fraktionen A und B fehlten Informationen über ihr Molekulargewicht und ihre Signalwirkung. Allerdings wiesen beide Exsudatkomponenten ein vergleichbares Absorptionsverhalten auf mit einem Hauptmaximum im Wellenlängenbereich von 230 bis 250 nm (Abb. 12). Ein solches Absorptionsspektrum ist charakteristisch für einfache phenolische Substanzen, wie z.B. das Hydroxycoumarin oder einfache Phenolcarbonsäuren (MABRY et al. 1970). Substanzen dieser Stoffgruppe besitzen für gewöhnlich nicht die Fähigkeit, die Nodulationsgene von *R. l. bv. trifolii* zu aktivieren (DJORDJEVIC et al. 1987). Die tatsächliche funktionelle Bedeutung der Fraktionen A und B konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht geklärt werden.

Flavonoide haben im Wellenlängenscan oberhalb von 320 nm ihr Hauptmaximum, wie dies für die Fraktionen C, D und E des sterilen sowie der Fraktion 4 aus dem unsterilen Versuchsansatz nachgewiesen werden konnte. Diese Exsudatkomponenten hatten zudem ein ähnliches Absorptionsverhalten wie die Signalsubstanz 7,4'-DHF und unterschieden sich nur geringfügig in ihrer Polarität (Abb. 11, Abb.

12). Folglich scheinen diese Fraktionen einer ähnlichen Stoffgruppe, vermutlich den Flavonen, anzugehören.

Des Weiteren zeigten die MS-Analyse sowie der Induktionstest, dass es sich bei der Fraktion C vermutlich um ein Hydroxyflavon mit wichtiger Signalfunktion bei N-Limitierung handelt. Trihydroxyflavone konnten allerdings als potentielle Substanzen ausgeschlossen werden, da die beiden in der HPLC-Analyse verwendeten Standardsubstanzen 7,3',4'-Trihydroxyflavon und Apigenin (4',5,7-Trihydroxyflavon) keine Übereinstimmung in der Retentionszeit mit der Fraktion C zeigten. Anhand der Massendifferenz der Fraktion C zu 7,4'-DHF (Abb. 12, Abb. 24) lässt sich vermuten, dass die Fraktion C zusätzlich eine Methyl- oder Hydroxygruppe trägt. Die Substitution einer Methylgruppe würde die Apolarität der Fraktion verstärken. Als Folge hätte sich bei der HPLC-Trennung die Retentionszeit deutlich hinter die des 7,4'-DHF verlagert. Wahrscheinlicher ist hingegen die Substitution durch eine Hydroxygruppe. Die polarerer Eigenschaften würden dann eine zeitlich frühere Auftrennung gegenüber 7,4'-DHF bewirken – wie für die Fraktion C in dieser Arbeit nachgewiesen wurde.

Die Fraktionen D des sterilen und 4 des unsterilen Exsudatexperiments wiesen das gleiche Absorptionsspektrum (Abb. 12, Abb. 31) und Molekulargewicht auf. Anhand ihrer Masse (HARBORNE & BAXTER 1999) und ihrer *nod*-Gen-induzierenden Wirkung konnten diese beiden Fraktionen potentiell als Geraldon identifiziert werden. Geraldon ist ein Methoxyflavon und nachweislich Bestandteil in den Wurzelexsudaten von *T. repens* (REDMOND et al. 1986; DJORDJEVIC et al. 1987).

Ferner lassen die charakteristischen Masse- und Polaritätseigenschaften der Fraktion E vermuten, dass es sich bei dieser Exsudatkomponente um ein Flavon oder Chalcon handelt. Auch Chalcone besitzen, wie die Flavone, die Fähigkeit die Nodulationsgene der Rhizobien zu aktivieren (MAXWELL et al. 1989). So konnte für die Substanz 4,4'-Dihydroxy-2'-Methoxychalcone eine aktivierende Wirkung auf *R. l. bv. trifolii* nachgewiesen werden (ROLFE 1988; GÖTTFERT 1993).

Die Fraktionen 5 und 6 des unsterilen Exsudatexperiments besaßen ähnliche Polaritätseigenschaften, unterschieden sich aber deutlich von den bisher angesprochenen Fraktionen. Allerdings wies die Fraktion 5 ein sehr ähnliches Absorptionsspektrum (Abb. 24, Abb. 31) und vergleichbare Retentionszeit wie die Testsubstanz Apigenin auf. Auch das Molekulargewicht beider Substanzen unterschied sich nur minimal (270,3 und 270,2). Es ist daher höchstwahrscheinlich, dass die Fraktion 5 ein dem Apigenin nah verwandtes Trihydroxyflavon

ist. Demgegenüber konnte die Fraktion 6 mit den beschriebenen Methoden nicht genauer identifiziert werden. Das höhere Molekulargewicht deutet allerdings auf ein aglycosidisches Flavonoid mit komplexerer Molekularstruktur hin.

Die aus den unsteril gewonnen Exsudaten isolierte Fraktion 2, war als einzige Exsudatkomponente nicht in der Lage, die Nodulationsgene des Reporterstamms zu aktivieren. Mit einem Molekulargewicht von 215 hat die Fraktion eine Masse, die zwischen dem der einfachen Phenole (z.B. Umbelliferon mit 162,1) und dem der Flavonoide (z.B. 7,4'-DHF mit 254,2) liegt. Es ist folglich denkbar, dass es sich bei der Fraktion 2 um ein frühes intermediäres Produkt in der Phenylpropanoid-Biosynthese handelt. Da sie zudem ausschließlich von älteren Weißkleeflanzen exsudiert wurde (Abb. 33), könnte der Fraktion 2 eher eine inhibitorische Funktion während der generativen Phase zukommen.

Eine zweifelsfreie Identifikation der isolierten Fraktionen war ohne NMR-Analyse nicht möglich. Dennoch konnten anhand der verwendeten Analysen, neben den von DJORDJEVIC et al. (1987) bereits nachgewiesene Substanzen 7,4'-DHF und Geraldon, neue, bisher in der Literatur nicht beschriebene Signalsubstanzen in den Exsudaten von *T. repens* nachgewiesen werden.

4.5 CO₂-Einfluss auf die Wurzelexsudation von *T. repens* ist abhängig von der N-Versorgung und dem Versuchsansatz

Neben der chemischen Identifizierung der phenolischen Exsudatfraktionen war es Ziel dieser Arbeit, den CO₂-Einfluss auf die Exsudation der Signalsubstanzen von *T. repens* bei zwei Stickstoffdüngungsstufen zu charakterisieren. Der Einfluss erhöhter CO₂-Konzentration auf die Signalsubstanzabgabe war nur im sterilen Exsudatexperiment deutlich ausgeprägt und führte insbesondere in der Anfangsphase des Beobachtungszeitraums in beiden N-Varianten zu einer verstärkten Abgabrate der Signalfractionen 7,4'-DHF, C, D und E (bezogen auf die Anzahl Pflanzen pro Magenta Box; Abb. 14, Abb. 18, Abb. 19, Abb. 20), aber auch des antagonistisch wirkenden Umbelliferons (Abb. 13). Eine gesteigerte Wurzelexsudation infolge erhöhter CO₂-Konzentrationen konnte zuvor schon in anderen Experimenten nachgewiesen werden (CHENG & JOHNSON 1998; VAN GINKEL et al. 2000, PENDALL et al. 2004; ALLARD et al. 2006), ist aber keineswegs ein generell auftretendes Phänomen (HODGE & MILLARD 1998; USELMAN et al. 2000; BAZOT et al. 2006). Insbesondere HAASE et al. (2007) berichteten in diesem Zusammenhang ebenfalls von einer erhöhten Abgabe phenolischer

Signalsubstanzen bei *Phaseolus vulgaris*. Diese verstärkte Exsudation an Signalsubstanzen stimuliert u.a. vermutlich das Wachstum der Rhizobien in einer CO₂-reichen Umwelt. Tatsächlich konnte im Swiss FACE als Folge der CO₂-Erhöhung eine Verdoppelung der Population von *R. l. bv. trifolii* in der Rhizosphäre des Weißkleees beobachtet werden (SCHORTEMAYER et al. 1996).

Die im sterilen Exsudatexperiment beobachtete CO₂-bedingte Abgabe der Signalsubstanzen ist einerseits auf die höhere, durch CO₂ stimulierte Wurzelbiomasse zurückzuführen (Kapitel 4.2 und Abb. A 1). Auch VAN GINKEL et al. (2000) und MIKAN et al. (2000) begründeten den von ihnen beobachteten, durch Wurzelexsudate hervorgerufenen höheren C-Input in den Boden mit einem gesteigerten Wurzelwachstum unter erhöhtem CO₂. Andererseits konnte für das 7,4'-DHF am letzten Beprobungstermin unter erhöhtem CO₂ bei N-Limitierung auch eine gesteigerte Abgaberate in Bezug auf die Wurzelfrischmasse nachgewiesen werden (Abb. 15). Für die ersten beiden Termine fehlen aus versuchs-technischen Gründen Angaben über die Exsudation der Signalsubstanzen bezogen auf die Wurzelfrischmasse. Allerdings scheint der CO₂-Effekt auf die Abgabe der Signalsubstanzen, insbesondere des 7,4'-DHF, zu jedem Zeitpunkt des Versuchs größer gewesen zu sein, als der CO₂-induzierte Anstieg in der Wurzelbiomasse, wie anhand der Exsudatdaten der 15 Tage alten Weißkleepflanzen sowie der Wurzelfrischmasse zu Versuchsende vermutet werden kann (Abb. 14, Abb. A 1). Es ist wahrscheinlich, dass auch zu einem früheren Zeitpunkt des sterilen Exsudatexperiments die Erhöhung der CO₂-Konzentration die Abgaberate der Signalsubstanzen pro Gramm Wurzelfrischmasse steigerte. Bereits in früheren CO₂-Studien wurde ein Anstieg der Exsudation unter erhöhter CO₂-Konzentration nicht nur auf eine höhere Wurzelbiomasse zurückgeführt, sondern z. T. auch mit einer gesteigerten Exsudation pro Einheit Wurzelfläche erklärt (CHENG & JOHNSON 1998).

Bei älteren steril kultivierten Weißkleepflanzen wurde eine CO₂-stimulierte Phenolabgabe vor allem unter N-Limitierung beobachtet (Abb. 14, Abb. 19, Abb. 20). Dabei überstieg in Einzelfällen der Einfluss mangelnder N-Versorgung den CO₂-Effekt. Als Konsequenz der CO₂-Erhöhung gerieten die Weißkleepflanzen schneller in N-Mangel (INGESTAD 1982; ZANETTI et al. 1997) und reagierten deshalb mit einer vermehrten Exsudation von Signalsubstanzen. Für Luzerne wurde unter N-Limitierung eine gesteigerte Exsudation *nod*-Gen-induzierender Flavonoide nachgewiesen (CORONADO et al. 1995). Durch die erhöhte Signalabgabe wird unter natürlichen Bedingungen in der Rhizosphäre wahrscheinlich gewährleistet, dass eine größere Anzahl von Rhizobien zur

Nodulation stimuliert werden und schließlich der Mangel an mineralischem Stickstoff durch eine symbiotische N₂-Fixierung ausgeglichen werden kann. ZANETTI et al. (1998) beobachteten in einem Klimakammerexperiment mit *T. repens* unter erhöhter CO₂-Konzentration und N-Mangel zudem eine vermehrte Knöllchenbildung, die sie auf das Vorhandensein einer größeren möglichen Infektionsoberfläche der Wurzel zurückführte. Darüber hinaus dürfte zusätzlich die verstärkte Abgabe der Signalsubstanzen die höhere Knöllchenbildung initiiert haben. Die Leguminosen scheinen folglich die Nodulation je nach N-Status durch die Regulierung der Flavonoidakkumulation zu beeinflussen. Im Gegensatz zu den Phenolen konnte bei N-limitierten Pflanzen eine geringere Exsudation von organischem Kohlenstoff nachgewiesen werden als bei Pflanzen, die ausreichend an Stickstoff versorgt waren (USELMAN et al. 2000; HENRY et al. 2005, HAASE et al. 2007). Für die Baumart *Robinia pseudoacacia* wurde dieses Phänomen mit dem größeren Bedarf von Assimilaten der symbiotischen Bakterien zur verstärkten N₂-Fixierung erklärt (USELMAN et al. 2000).

Auffällig ist, dass sich die Exsudation des 7,4'-DHF_s pro Gramm Wurzelfrischmasse unter erhöhter CO₂-Konzentration und bei ausreichender N-Versorgung vermindert (Abb. 15). Der Rückgang in der Signalabgabe ist wahrscheinlich die Folge der schnelleren physiologischen Entwicklung der Weißkleepflanzen unter erhöhter CO₂-Konzentration und somit eines verminderten CO₂-Einflusses auf die 7,4'-DHF-Exsudation in älteren Weißkleepflanzen. Für die Exsudation des 7,4'-DHF_s unter unsterilen Versuchsbedingungen konnte tendenziell ebenfalls eine von der N-Versorgung abhängige CO₂-Reaktion beobachtet werden: ausreichend an Stickstoff versorgte Weißkleepflanzen reduzierten die Signalabgabe unter erhöhter CO₂-Konzentration, während sich die Exsudation bei N-Limitierung erhöhte (Abb. 32). Die reduzierte 7,4'-DHF-Exsudation bei ausreichender N-Versorgung lässt sich auch hier damit erklären, dass sich die Weißkleepflanzen unter erhöhtem CO₂ schneller entwickelten. Zudem befanden sich die Pflanzen am Übergang zur generativen Phase und investierten somit vermutlich bereits Energie in den Aufbau der Blüten und nicht in die Wurzel-exsudation (Kapitel 4.2). Die beschriebene N-abhängige CO₂-Reaktion in der Exsudation der Signalsubstanz wurde sowohl im sterilen als auch im unsterilen Experiment nachgewiesen, was auf ein charakteristisches Exsudationsverhalten des 7,4'-DHF_s unter den beschriebenen Umweltbedingungen schließen lässt. Mit zunehmendem N-Mangel exsudierten die Weißkleepflanzen zudem unter sterilen Bedingungen verstärkt die *nod*-Gen-aktivierende Fraktion C (Abb. 18). Dieses Hydroxyflavon hat somit besonders bei N-limitierten Pflanzen eine wichtige Signal-

funktion während der Nodulation. Die Fraktion C konnte als neue, bisher nicht beschriebene Signalsubstanz in den Wurzelexsudaten von *T. repens* nachgewiesen werden. Entsprechend der funktionalen Bedeutung des Hydroxyflavons ist es denkbar, dass der Weißklee unter Stickstoffmangel besonders solche Substanzen exsudiert, die ein potentiell höheres Aktivierungspotential auf die Nodulationsgene von *R. l. bv. trifolii* besitzen als die Hauptsignalsubstanz 7,4'-DHF.

Die stärker ausgeprägten CO₂- und N-Effekte auf die Wurzelexsudation im sterilen Versuchsansatz sind auf das speziell vorherrschende Mikroklima in den Magenta Boxen und die fehlende mikrobielle Beeinflussung von außen zurückzuführen. Darüber hinaus zeigten die Weißkleepflanzen unter unsterilen Versuchsbedingungen eine höhere Variabilität, die sich auch in größeren Schwankungen der Wurzelexsudation widerspiegelte. Auch könnten äußere Faktoren, wie Mikroben und Licht, eine raschere Degeneration der Exsudate im unsterilen Experiment begünstigt haben.

SCHORTEMAYER et al. (1996), MARILLEY et al. (1999) und MONTEALEGRE et al. (2000, 2002) begründeten die Verschiebung in der Rhizobien-Population im Swiss FACE mit quantitativen und/oder qualitativen Veränderungen in den Wurzelexsudaten. Erhöhtes CO₂ beeinflusste in der vorliegenden Arbeit in beiden Versuchsansätzen die Wurzelexsudation zwar quantitativ (Abb. 14, Abb. 18, Abb. 19, Abb. 20, Abb. 32, Abb. 33, Abb. 35), qualitative Veränderungen der phenolischen Signalsubstanzen konnten hier allerdings nicht nachgewiesen werden. Dies stimmt mit der Tatsache überein, dass auch das C/N-Verhältnis der Weißkleewurzel nicht durch erhöhtes CO₂ beeinflusst wurde, weder im sterilen, noch im unsterilen Experiment (Kapitel 4.3). Allerdings ist es denkbar, dass sich die Zusammensetzung an organischen Säuren, Aminosäuren und/oder Zuckerverbindungen in den Wurzelexsudaten des Weißklees unabhängig vom C/N-Verhältnis der Wurzel qualitativ durch die erhöhte CO₂-Konzentration veränderte, was in dieser Arbeit nicht untersucht wurde. Diese Exsudatkomponenten haben zwar nicht die Fähigkeit Nodulationsgene zu aktivieren, wirken aber, neben Phenolcarbonsäuren und anderen phenolischen Substanzen, chemotaktisch (GÖTTTFERT 1993). Folglich könnte bereits vor dem „Anschalten“ der Nodulationsgene durch die qualitativ veränderte Abgabe dieser chemotaktisch wirkenden Substanzen eine Selektion spezifischer *R. l. bv. trifolii*-Stämme erfolgt sein, was schließlich mit zu dem von MONTEALEGRE et al. (2000) beobachteten genetischen Verschiebung in der Rhizobien-Population beigetragen haben könnte.

Neben der CO₂-Konzentration und der N-Versorgung beeinflusste auch das Pflanzenalter bzw. die Entwicklungsphase der Pflanzen sowohl qualitativ als auch quantitativ das Exsudationsverhalten von *T. repens*. Die Exsudation der überwiegenden Signalsubstanzen nahm mit zunehmendem Pflanzenalter ab, sowohl im sterilen als auch im unsterilen Exsudatexperiment (Abb. 14, Abb. 19, Abb. 20, Abb. 32, Abb. 35, Abb. 36). Desgleichen beobachteten HAASE et al. (2007) eine Abnahme in der Abgabe von Signalsubstanzen in älteren *Phaseolus*-Bohnen. Der in dieser Studie beobachtete Rückgang kann einerseits mit dem Alter der Weißkleeplanzen und im unsterilen Versuchsansatz auf den schon angesprochenen Übergang in die generative Entwicklungsphase in Zusammenhang gebracht werden. Im sterilen Experiment dürfte zudem noch die räumliche bzw. Licht-Limitierung der Weißkleeplanzen in den Magenta Boxen eine Rolle gespielt haben (Kapitel 4.2). Andererseits erfolgte hier die Abgabe der Signalsubstanzen wahrscheinlich nur an den jüngeren Wurzelspitzen. Aufgrund des größeren Anteils an älterer Wurzelmasse und der Exsudation anderer spezifischer Substanzen in älteren Pflanzen, wie der Fraktion 2 im unsterilen Experiment, könnte es zu einer verminderten Abgaberate pro Gesamtwurzelmasse der Wurzelexsudate gekommen sein. Einen eindeutigen Aufschluss könnte hier eine lokale Exsudatsammlung liefern, wie sie KAPE et al. (1992b) für die Wurzeln der Sojabohne beschrieben.

Qualitative Veränderungen mit zunehmendem Pflanzenalter konnten lediglich unter unsterilen Versuchsbedingungen beobachtet werden. Die Fraktionen 5 und 6 wurden nur am Anfang des Untersuchungszeitraums detektiert (Abb. 35, Abb. 36), während die Fraktion 2 ausschließlich von älteren Pflanzen exsudiert wurde (Abb. 33). Veränderungen in der Exsudatzusammensetzung mit zunehmendem Pflanzenalter sind wahrscheinlich, aber für *T. repens* bisher nicht beschrieben. Für Luzerne, Sojabohne und Bohne wurden in den Samenexsudaten andere Flavonoide nachgewiesen als in den Wurzelexsudaten (HARTWIG et al. 1989; GRAHAM 1991; HUNGRIA et al. 1991a; HUNGRIA et al. 1991b). Im Gegensatz zu den Untersuchungen von DJORDJEVIC et al. (1987), die die Exsudate von Weißkleekeimlingen analysierten, waren in den hier beschriebenen Versuchen, Formononetin und 4'-Hydroxy-7-Methoxyflavon nur in Spuren in den Wurzelexsudaten zu detektieren. Vermutlich werden diese Substanzen nur oder überwiegend von Keimlingen abgegeben und 4'-Hydroxy-7-Methoxyflavon scheint in älteren Weißkleeplanzen als Signalsubstanz für die Nodulation von geringerer Bedeutung zu sein.

4.6 Schlussfolgerungen und Perspektiven

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass nach 10-jähriger CO₂-Begasung im Swiss FACE keine Verschiebung in der Rhizobien-Population mehr nachgewiesen werden konnte. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass sich im Laufe des Freilandversuchs ein neues C/N-Gleichgewicht im Grasslandökosystem eingestellt hat. Die anfänglich im Swiss FACE beobachtete Veränderung in der genetischen Zusammensetzung der Rhizobien-Population ist höchstwahrscheinlich Folge einer erhöhten Exsudation phenolischer Signalsubstanzen von *T. repens* unter erhöhter CO₂-Konzentration. Die gesteigerte Abgabe von Signalsubstanzen in beiden Klimakammerexperimenten konnte mit einer höheren Wurzelbiomasse des Weißkleees begründet werden, aber insbesondere für die Hauptsignalsubstanz 7,4'-DHF, auch mit einer gesteigerten Exsudation pro Gramm Wurzelfrischmasse. Qualitative Veränderungen in der Exsudation von Signalsubstanzen unter erhöhtem CO₂-Angebot, wie anfänglich ebenfalls vermutet, wurden hingegen nicht gefunden. Allerdings könnte die Erhöhung der CO₂-Konzentration qualitativ die Exsudation chemotaktisch wirkender Substanzen – wie organischer Säuren, Aminosäuren, Zucker – beeinflusst und so eine Verschiebung der genetischen Zusammensetzung durch Selektion bestimmter Rhizobien-Stämme mit begünstigt haben. Die beobachteten CO₂-Effekte wurden zudem stark vom Pflanzenalter und von dem N-Status der Weißkleepflanzen beeinflusst, wobei mangelnde N-Versorgung zuweilen den CO₂-Effekt überlagerte. Daneben hatte der Versuchsansatz einen maßgeblichen Einfluss auf die CO₂-Reaktion der Weißkleepflanzen: sterile Kultivierungsbedingungen erzielten eindeutigere und signifikantere Ergebnisse.

Weitere Experimente sind notwendig, um den hier gefundenen CO₂-Einfluss auf die Exsudation der Signalsubstanzen und die vermuteten qualitativen Veränderungen nicht-phenolischer Exsudatkomponenten zu stützen. Darüber hinaus bleibt zu überprüfen, ob die Fraktion C unter N-Limitierung tatsächlich ein höheres Aktivierungspotential als 7,4'-DHF besitzt und ob allein eine erhöhte Exsudation dieser Signalsubstanzen eine Selektion von Subpopulationen von *R. l. bv. trifolii* hervorufen kann. Letzteres könnte anhand von Transformanten von *R. l. bv. trifolii* in einem biologischen Aktivitätstest (z.B. *nod*-Gen-Induktionstest) überprüft werden. In mehreren Versuchsdurchläufen würden den Proben mit den Transformanten z.B. unterschiedliche Mengen an 7,4'-DHF zugesetzt. Der Aktivitätstest würde schließlich zeigen, ob bestimmte Transformanten eine stärkere, gegebenenfalls auch schnellere, Induktion der Nodulationsgene aufweisen und ob somit gezielt Subpopulationen selektiert werden können.

Sterile Kultivierungssysteme sind für Exsudatexperimente, aufgrund der geringeren äußeren Beeinflussung, für derartige Versuche am besten geeignet, wobei alternative Systeme eingesetzt bzw. entwickelt werden sollten, die eine räumliche Limitierung vor allem der Sprosse verhindern. Sinnvoll ist es zudem, die Sammlung der Wurzelexsudate auch an jüngeren Pflanzen und in früheren Entwicklungsstadien durchzuführen, um so ein breiteres Spektrum der exsudierten Phenole zu erhalten und um mögliche Einflüsse durch den Übergang vom vegetativen auf das generative Wachstum ausschließen zu können. Für die Identifizierung unbekannter Fraktionen mittels NMR-Analyse, müsste die Sammlung der Wurzelexsudate quantitativ angehoben werden. Eine andere Möglichkeit wäre die Extraktion der relevanten phenolischen Substanzen direkt aus Weißkleewurzeln, da sie hier vermutlich in höherer Konzentration vorliegen. Schließlich bleibt zu überlegen, ob eine andere Modellgraslandpflanze für die Exsudatexperimente herangezogen werden sollte. *T. repens* ließ sich aufgrund seiner geringeren Stabilität des Gewebes, insbesondere der Wurzel, nur schwer hydroponisch kultivieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

CO₂ ist eines der wichtigsten Treibhausgase, das das Klima und terrestrische Ökosysteme nachhaltig beeinflusst. Bis heute ist wenig über den Einfluss von erhöhten atmosphärischen CO₂-Konzentrationen auf symbiotische Interaktionen in der Rhizosphäre, insbesondere auf die N₂-fixierende Symbiose von *Trifolium repens* und *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* bekannt. Erste Ergebnisse eines 10-jährigen Freiland-CO₂-Begasungsexperiments (Swiss FACE) zeigten, dass sich nach drei Jahren kontinuierlicher CO₂-Begasung die genetische Zusammensetzung der Rhizobien-Population in den Wurzelknöllchen von *T. repens* unter erhöhter CO₂-Konzentration verändert hatte. Im ersten Abschnitt dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob nach 10-jähriger CO₂-Begasung im Swiss FACE weiterhin genetisch unterschiedliche Rhizobien-Stämme in den Wurzelknöllchen des Weißklees nachgewiesen werden können oder ob eine Anpassung der Knöllchenbakterien an erhöhte CO₂-Konzentrationen erfolgt ist. Darüber hinaus sollte diese Arbeit klären, ob erhöhte atmosphärische CO₂-Konzentrationen in Abhängigkeit der N-Versorgung bei *T. repens* zu quantitativen und qualitativen Veränderungen in der Wurzelexsudation führen, insbesondere hinsichtlich der Abgabe von Substanzen mit Signalfunktion während der Nodulation. Im Sommer 2002 wurden mit CO₂ begaste und unbegaste Versuchsflächen des FACE beprobt und Rhizobien aus Wurzelknöllchen der geernteten Weißkleepflanzen isoliert. Die Untersuchung von *R. l. bv. trifolii* mittels BOX-PCR DNA Fingerprinting ergab, dass nach 10-jähriger CO₂-Begasung im Swiss FACE keine Veränderung in der genetischen Zusammensetzung der Rhizobien mehr festgestellt werden konnten. Die genetische Verschiebung innerhalb der Rhizobien-Population war somit nur vorübergehend nachweisbar. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass sich im Laufe des Freiland-CO₂-Experiments ein neues C/N-Gleichgewicht im Grasland-Ökosystem eingestellt hat. Zu Beginn des FACE-Experiments wurde eine Erhöhung des C/N-Verhältnisses im Boden detektiert, das durch die gesteigerte symbiotische N₂-Fixierung und den daraus resultierenden vermehrten N-Eintrag in das Ökosystem allmählich ausgeglichen werden konnte. Diese Stabilisierung des Grasland-Ökosystems hatte höchstwahrscheinlich auch einen Rückgang der indirekten CO₂-Beeinflussung auf die Mikroorganismen zur Folge, so dass nach 10 Jahren im Swiss FACE keine genetische Diversität der Rhizobien-Population mehr nachzuweisen war.

Um die Wirkung erhöhter atmosphärischer CO₂-Konzentrationen auf die Wurzel-

exsudation von Signalsubstanzen zu untersuchen, wurden Weißkleeplanzen in zwei unabhängigen Klimakammerexperimenten unter sterilen und unsterilen Versuchsbedingungen bei ambienter und erhöhter CO₂-Konzentration (400 und 800 ppm) und unterschiedlicher Stickstoffdüngung hydroponisch kultiviert. Die Gewinnung der Wurzelexsudate erfolgte über einen Zeitraum von sieben Stunden an drei bzw. vier unterschiedlichen Terminen. Die phenolischen Bestandteile der Wurzelexsudate wurden durch eine Festphasenextraktion extrahiert und anschließend mittels HPLC und LC-MS analysiert. Zusätzlich wurden die isolierten Fraktionen, auf ihre Fähigkeit die Nodulationsgene von *R. I. bv. trifolii* zu aktivieren, anhand eines *nod*-Gen-Induktionstests überprüft. Die Erhöhung der CO₂-Konzentration führte in beiden Versuchsansätzen zu einem gesteigerten Spross- und Wurzelwachstum, aber nicht zu einer Veränderung des C/N-Verhältnisses in der Wurzel. In den Wurzelexsudaten von *T. repens* konnten, neben der bekannten Signalsubstanz 7,4'-Dihydroxyflavon, neue, bisher in der Literatur nicht beschriebene phenolische Substanzen nachgewiesen werden. Die Fraktionen wurden anhand ihrer Polaritätseigenschaften, Absorptionsverhalten und Molekulargewichte als aglycosidische Flavone identifiziert, die, bis auf eine Fraktion (Fraktion 2) des unsterilen Experiments, alle die Fähigkeit zur *nod*-Gen-Induktion besaßen. CO₂ beeinflusste die Exsudation der Signalsubstanzen quantitativ, nicht aber qualitativ. Die erhöhte Exsudation, insbesondere des 7,4'-Dihydroxyflavons, konnte einerseits auf die höhere Wurzelbiomasse unter erhöhtem CO₂ zurückgeführt werden, andererseits aber auch auf eine höhere Abgaberate in Bezug auf die Wurzelfrischmasse. Diese CO₂-Reaktion der Weißkleeplanzen, sowohl hinsichtlich der Biomasseproduktion als auch der Wurzelexsudation, war deutlich abhängig von der N-Versorgung und signifikant nur unter sterilen Versuchsbedingungen ausgeprägt. Im Einzelfall überstieg der N-Einfluss sogar den CO₂-Effekt: mit zunehmendem N-Mangel exsudierten die Weißkleeplanzen unter sterilen Bedingungen verstärkt die *nod*-Gen-aktivierende Exsudat-Fraktion C. Diese, als Hydroxyflavon identifizierte Fraktion besitzt folglich bei N-Limitierung eine wichtige Signalfunktion. Neben der CO₂-Konzentration und der N-Versorgung beeinflusste das Pflanzenalter maßgeblich die Wurzelexsudation von *T. repens*, was sich vor allem im unsterilen Versuchsansatz in einem Rückgang der Abgabe von Signalsubstanzen bei älteren Weißkleeplanzen, aber auch in der Qualität der exsudierten Phenole äußerte.

Die anfänglich im Swiss FACE beobachtete Veränderung in der genetischen Zusammensetzung von *R. I. bv. trifolii* war mit sehr großer Wahrscheinlichkeit die Folge einer gesteigerten Exsudation phenolischer Signalsubstanzen von *T. repens* unter erhöhter atmosphärischer CO₂-Konzentration.

6 SUMMARY

CO₂ is one of the main greenhouse gases strongly influencing the climate and the terrestrial ecosystem. Up to now little is known about the impact of elevated atmospheric CO₂ on symbiotic interactions in the rhizosphere, especially on the N₂-fixing symbiosis between *Trifolium repens* and *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. First results of a ten-year Free-Air CO₂ enrichment experiment (Swiss FACE) showed that after three years of CO₂ fumigation the genetic composition of the *Rhizobium* population in the root nodules of *T. repens* had changed. The first part of this thesis set out to clarify the question whether a genetic difference in the *Rhizobium* population of root nodules of white clover could still be detected after ten years of CO₂ fumigation or if an adaptation of the nodule bacteria to elevated CO₂ concentrations had occurred. Furthermore the thesis addressed the question whether elevated atmospheric CO₂ leads to quantitative and qualitative changes in the root exudation of *T. repens* particularly with regard to exudation of signal substances during the nodulation process. In summer 2002 white clover plants were collected from plots fumigated with CO₂ and control plots of the Swiss FACE. *Rhizobium* strains were isolated from the clover root nodules and used for rep-PCR DNA fingerprinting. Results clearly showed that after ten years of CO₂ enrichment changes in the genetic composition of the *R. l. bv. trifolii* could no longer be observed. Thus, CO₂-induced changes in the population structure of rhizobia seemed to be transient. This can be traced back to the possibility that over the experimental period a new C/N equilibrium in the grassland ecosystem has been established. At the beginning of the FACE experiment an increase in the C/N ratio of the soil was detected, which could be balanced in the course of time through enhanced symbiotic N₂ fixation and consequently a higher N input into the ecosystem. The observed stabilisation of the grassland ecosystem most likely caused a reduction of the indirect CO₂ impact on the microorganisms. This might explain why a change in the genetic composition of *Rhizobium* strains was not longer detected after ten years in the Swiss FACE.

To investigate an influence of elevated atmospheric CO₂ concentration on the release of signalling compounds clover plants were cultivated hydroponically in two independent climate chamber trials under axenic and non-axenic conditions at ambient and elevated CO₂ concentrations (400 and 800 ppm) and different levels of N supply. Root exudates were collected over a period of seven hours and at three and four different plant ages, respectively. Phenolic compounds were

extracted by solid-phase extraction and afterwards analysed with HPLC and LC-MS. Additionally, the isolated fractions were tested for their ability to induce the nodulation genes of *R. I. bv. trifolii* using a *nod*-gene induction test. The CO₂ enrichment caused an increase in shoot and root growth in both experimental setups, but did not provoke a change in the C/N ratio of the roots. Besides the known signal compound 7,4'-dihydroxyflavone new phenolic substances could be detected, which have not yet been described in literature. The fractions were identified by their polarity, light absorption and molecular weight as aglyca and flavones. All of these had the ability for *nod*-gene induction except one fraction (fraction 2). CO₂ influenced the exudation of signalling compounds quantitatively but not qualitatively. The enhanced exudation, especially of 7,4'-dihydroxyflavone, could be attributed to the higher root mass under elevated CO₂ but also to a higher release rate on a root fresh weight basis. The CO₂ reaction of the clover plants, for the biomass production as well as for the root exudation, was clearly dependent on the N supply and only significant under axenic conditions. In individual cases the N impact was more pronounced than the CO₂ effect: with increasing N demand axenic clover plants enhanced the exudation of the *nod*-gene inducing fraction C. It is concluded that this fraction, identified as a hydroxyflavone, has therefore an important signal function under N limitation. Besides the CO₂ concentration and N supply, root exudation by *T. repens* was considerably influenced by the plant age, which caused a reduction of the signal exudation in older plants and qualitative changes of the released phenols, especially under non-axenic conditions.

The present study suggests that the genetic shift of *R. I. bv. trifolii* detected at the beginning of the Swiss FACE experiment was most likely a consequence of the enhanced exudation of phenolic signal compounds of *T. repens* under elevated atmospheric CO₂ concentrations.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- AGUILAR, J.M.M., ASHBY, A.M., RICHARDS, A.J.M., LOAKE, G.J., WATSON, M.D. & SHAW, C.H. (1988): Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. *Journal of General Microbiology* 134, 2741-2746.
- AINSWORTH, E.A. & LONG, S.P. (2005): What have we learned from 15 years of free-air- CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytologist* 165, 351-372.
- ALLARD, V., ROBIN, C., NEWTON, P.C.D., LIEFFERING, M. & SOUSSANA, J.F. (2006): Short and long-term effects of elevated CO₂ on *Lolium perenne* rhizodeposition and its consequence on soil organic matter turnover and plant N yield. *Soil Biology & Biochemistry* 38, 1178-1187.
- ALLEN, S.G., IDSO, S.B., KIMBALL, B.A., BAKER, J.T., ALLEN, L.H., JR., MAUNEY, J.R., RADIN, J.W., & ANDERSON, M.G. (1990): Effects of air temperature on atmospheric CO₂-plant growth relationships. DOE ER-0450T. U.S. Department of Energy, Washington DC.
- ARP, W.J. (1991): Effects of source-sink relations on photosynthetic acclimation to elevated CO₂. *Plant, Cell and Environment* 14, 869-876.
- ATKINS, C. & SMITH, P. (2000): Ureide synthesis in legume nodules. In: TRIPLETT, E.W. [Hrsg.]: Prokaryotic nitrogen fixation. Horizon Scientific Press, Wymondham. 559-588.
- BARBOUR, W.M., HATTERMAN, D.R. & STACEY, G. (1991): Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2635-2639.
- BASSETT, B., GOODMAN, R.N. & NOVACKY, A. (1977): Ultrastructure of soybean nodules. I. Release of Rhizobia from infection thread. *Canadian Journal of Microbiology* 23, 573-582.
- BAXTER, R., GRANTLEY, M., ASHENDEN, T.W. & FARRAR, J. (1994): Effects of elevated carbon dioxide on three grass species from montane pasture. II Nutrient allocation and efficiency of nutrient use. *Journal of Experimental Botany* 45, 1267-1278.

- BAYSDORFER, C. & BASSHAM, J.A. (1985): Photosynthetic supply and utilisation in alfalfa: a developmental shift from a source to a sink limitation of photosynthesis. *Plant Physiology* 77, 313-317.
- BAZOT, S., ULFF, L., BLUM, H., NGUYEN, C. & ROBIN, C. (2006): Effects of elevated CO₂ concentration on rhizodeposition from *Lolium perenne* grown on soil exposed to 9 years of CO₂ enrichment. *Soil Biology & Biochemistry* 38, 729-236.
- BAZZAZ, F.A. (1990): The response of natural ecosystems to rising global CO₂ levels. *Annual Reviews of Ecological Systems* 21, 167-196.
- BERGERSEN, F.J. (1961): The growth of *Rhizobium* in synthetic media. *Australian Journal of Biological Science* 14, 349-360.
- BERGERSEN, F.J. (1982): Root nodules of Legumes: Structure and Functions. Research Studies Press, Chichester. 164 S.
- BERINGER, JE (1974): R Factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology* 84, 188-198.
- BILLES, G., ROUHIER, H. & BOTTFNER, P. (1993): Modifications of the carbon and nitrogen allocations in the plant (*Triticum aestivum* L.) soil system in response to increased atmospheric CO₂ concentration. *Plant and Soil* 157, 215-225.
- BREWING, N.J. (1991): Development of the legume root nodules. *Annual Review of Cell Biology* 7, 191-226.
- BROOKS; A. & FARQUHAR; G.D. (1985): Effect of temperature on the CO₂/O₂ specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration in the light. *Planta* 165, 397-406.
- BROUGHTON, W.J., JABBOURI, S. & PERRET, X. (2000): Keys to symbiotic harmony. *Journal of Bacteriology* 182, 5641-5652.
- BROUGHTON, W.J., ZHANG, F., PERRET, X. & STAEHELIN, C. (2003): Signals exchanged between legumes and *Rhizobium*: agriculture uses and perspectives. *Plant and Soil* 252; 129-137.
- CAKMAK, I., HENGELER, C. & MARSCHNER, H. (1994): Partitioning of shoot and root dry matter and carbohydrates in bean plants suffering from phosphorus, potassium and magnesium deficiency. *Journal of Experimental Botany* 45, 1245-1250.

- CANNELL, M.G.R. & THORNLEY, J.H.M. (1998): N-poor ecosystems may respond more to elevated [CO₂] than N-rich ones in the long term. A model analysis of grassland. *Global Change Biology* 4, 431-442.
- CÁRDENAS, L., VIDALI, L., DOMÍNGUEZ, J., PÉREZ, H., SÁNCHEZ, F., HEPLER, P.K. & QUINTO, C. (1998): Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium etli* nodulation signals. *Plant Physiology* 116, 871-877.
- CARLSON, R.W., PRICE, N. & STACEY, G. (1994): The biosynthesis of Rhizobial lipo-oligosaccharide nodulation signal molecules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7, 684-695.
- CHENG, W. & JOHNSON, D.W. (1998): Elevated CO₂, rhizosphere processes, and soil organic matter decomposition. *Plant and Soil* 202, 167-174.
- COLEMAN, J.S., MCCONNAUGHAY, 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., KÜPPERS, M., KÜPPERS, B., VIRGONA, J. & BARLOW, E.W.R. (1988): The influence of CO₂ enrichment, phosphorus deficiency and water stress on the growth, conductance and water use of *Pinus radiata* D. Don. *Plant, Cell & Environment* 11, 91-98.
- CORONADO, C, ZUANAZZI, J.A.S., SALLAUD, C., QUIRION, J.-C., ESNAULT, R., HUSSON, H.-P., KONDOROSI, A. & RATET, P. (1995): Alfalfa root flavonoid production is nitrogen regulated. *Plant Physiology* 108, 533-542.
- COTRUFO, M.F., INESON, P. & ROWLAND, A. (1994): Decomposition of tree leaf litters grown under elevated CO₂: effect of litter quality. *Plant and Soil* 163, 121-130.
- COTRUFO, M.F., INESON, P. & SCOTT, A. (1998): Elevated CO₂ reduces the nitrogen concentration of plant tissues. *Global Change Biology* 4, 43-54.
- COÛTEAUX, M.M., MOUSSEAU, M., CÉLÉRIER, M.L. & BOTTNER, P. (1991) : Increased atmospheric CO₂ and litter quality: decomposition of sweet chestnut leaf litter with animal food webs of different complexity. *Oikos* 61, 54-64.
- 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.

- CULLIMORE, J.V., RANJEVA, R. & BONO, J.J. (2001): Perception of lipochitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends in Plant Science* 6, 24-30.
- CURE, J.D. & ACOCK, B. (1986): Crop responses to carbon dioxide doubling: a literature survey. *Agriculture and Forest Meteorology* 38, 127-145.
- DE GRAAFF, M.-A., SIX, J. & VAN KESSEL, C. (2007): Elevated CO₂ increases nitrogen rhizodeposition and microbial immobilization of root-derived nitrogen. *New Phytologist* 173, 778-786.
- DEIGLMAYR, K., PHILIPPOT, L., HARTWIG, U.A. & KANDELER, E. (2004): Structure and activity of nitrate-reducing community in the rhizosphere of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* under long-term elevated atmospheric pCO₂. *FEMS Microbiology Ecology* 49, 445-454.
- DE SASSURE, T. (1804): *Recherches Chimiques sur la Vegetation*, Paris ; übersetzt von A. Wieler in *Chemische Untersuchungen über die Vegetation*, Engelmann, Leipzig, 1890; zitiert bei Dalrymple, D.G., *Controlled environment agriculture: a global review of greenhouse food production*, U.S. Department of Agriculture, Economic Res. Ser., Washington DC, 1973.
- DEL VECCHIO, V.G., PETROZIELLO, J.M., GRESS, M.J., MCCLESKEY, F.K., MELCHER, G.P., CROUCH, H.K. & LUPSKI, J.R. (1995): Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive-sequence PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 2141-2144.
- DÉNARIÉ, J., DEBELLÉ, F. & PROMÉ, J.-C. (1996): *Rhizobium* lipochitooligosaccharide nodulation factors: signalling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry* 65, 503-535.
- DÍAZ, S., GRIME, J.P., HARRIS, J. & MCPHERSON, E. (1993): Evidence of a feedback mechanism limiting plant response to elevated carbon dioxide. *Nature* 364, 616-617.
- DÍAZ, S. (1995): Elevated CO₂ responsiveness, interactions at the community level and plant functional types. *Journal of Biogeography* 22, 289-295.
- DJORDJEVIC, M.A., REDMOND, J.W., BATLEY, M. & ROLFE, B.G. (1987): Clovers secrete specific phenolic compounds which either stimulate or repress *nod* gene expression in *Rhizobium trifolii*. *The EMBO Journal* 6, 1173-1179.

- DOMBEK, P.E., JOHNSON, L.K., ZIMMERLEY, S.T. & SADOWSKY, M.J. (2000): Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2572-2577.
- DOWNIE, J.A., MARIE, C., SCHEU, A.K., FIRMIN, J.L., WILSON, K.E., DAVIES, A.E., CUBO, T.M., MAVRIDOU, A.; JOHNSTON, A.W.B. & ECONOMOU, A. (1991): Genetic and biochemical studies on the nodulation genes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. In: HENNECKE, H. & VERMA, D.P.S. [Hrsg.]: *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*. Kluwer, Dordrecht. 134-141.
- DOWNIE, J.A. & WALKER, S.A. (1999): Plant response to nodulation factors. *Current Opinion in Plant Biology* 2, 483-489.
- DRAKE, B.G. & GONZÁLEZ-MELER, M.A. (1997): More efficient plants: a consequence of rising atmospheric CO₂? *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 609-639.
- EHRHARDT, D.W., WAIS, R. & LONG, S.R. (1996): Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* 85, 673-681.
- FELLE, H.H., KONDOROSI, E., KONDOROSI, A. & SCHULTZE, M. (1998): The role of ion fluxes in Nod factor signalling in *Medicago sativa*. *The Plant Journal* 13, 455-463.
- FIRMIN, J.L., WILSON, K.E., ROSSEN, L. & JOHNSTON, A.W.B. (1986): Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants. *Nature* 324, 90-92.
- FISHER, R.F., EGELHOFF, T.T., MULLIGAN, J.T. & LONG, S.R. (1988): Specific binding of proteins from *Rhizobium meliloti* cell-free extracts containing NodD to DNA sequences upstream of inducible nodulation genes. *Genes Development* 2, 282-293.
- FRANSSSEN, H.J., VIJN, I., YANG, W.C. & BISSELING, T. (1992): Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Molecular Biology* 19, 89-107.
- FREDEEN, A.L., RAO, I.M. & TERRY, N. (1989): Influence of phosphorus nutrition on growth and carbon partitioning in *Glycine max*. *Plant Physiology* 89, 225-230.

- GAWORZEWSKA, E.T. & CARLILE, M.J. (1982): Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants. *Journal of General Microbiology* 128, 789-798.
- GEIGER, M., WALCH-LIU, P., HARNECKER, J., SCHULZE, E.-D., LUDWIG, F. SONNEWALD, U., SCHEIBLE, W.-R. & STITT, M. (1998): Enhanced carbon dioxide leads to modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity in older plants and higher levels of amino acids in higher plants. *Plant, Cell and Environment* 21, 253-268.
- GERING, C.A., IRVING, H.R., KABBARA, A.A., PARISH, R.W., BOUKLI, N.M. & BROUGHTON, W.J. (1997): Rapid, plateau-like increase in intercellular free calcium are associated with nod-factor-induced root-hair deformation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10, 791-802.
- GORISSEN, A., VAN GINKEL, J.H., KEURENTJES, J.J.B. & VAN VEEN, J.A. (1995): Grass root decomposition is retarded when grass has been grown under elevated CO₂. *Soil Biology & Biochemistry* 27, 117-120.
- GÖTTFERT, M. (1993): Regulation and functional of rhizobial nodulation genes. *FEMS Microbiology Reviews* 104, 39-64.
- GOUDRIAAN, J. & DE RUITER, H.E. (1983): Plant growth in response to CO₂ enrichment, at two levels of nitrogen and phosphorus supply. 1. Dry matter, leaf area and development. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 31, 157-169.
- GRAYSTON, S.J., CAMPBELL, C.D., LUTZE, J.L. & GIFFORD, R.M. (1998): Impact of elevated CO₂ on the metabolic diversity of microbial communities in N-limited grass swards. *Plant and Soil* 203, 289-300.
- GULASH, M., AMES, P., LAROSILIERE, R.C. & BERGMAN, K. (1984): Rhizobia are attracted to localized sites on legume roots. *Applied and Environmental Microbiology* 48, 149-152.
- HAASE, S., NEUMANN, G., KANIA, A., KUZYAKOV, Y., RÖMHELD, V. & KANDELER, E. (2007): Elevation of atmospheric CO₂ and N-nutritional status modifies nodulation, nodule-carbon supply and root exudation of *Phaseolus vulgaris*. *Soil Biology and Biochemistry* (angenommen).
- HARBORNE, J.B. & BAXTER, H. (1999): *The handbook of natural flavonoids*. Band 1 + 2. Wiley-VCH-Verlag, Weinheim. 1800 S.

- HARDY, R.W.F. & HAVELKA, U.D. (1976): Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field-grown legumes with emphasis on soybean. In: NUTMAN, P.S. [Hrsg.]: Symbiotic nitrogen fixation in plants. Cambridge University Press, Cambridge. 421-439.
- HARTWIG, U.A., MAXWELL, C.A., JOSEPH, C.M. & PHILLIPS, D.A. (1989): Interactions among flavonoid *nod* gene inducers released from alfalfa seeds and roots. *Plant Physiology* 91, 1138-1142.
- HARTWIG, U.A., & PHILLIPS, D.A. (1991): Release and modification of *nod*-gene-inducing flavonoids from alfalfa seeds. *Plant Physiology* 95, 804-807.
- HARTWIG, U.A., ZANETTI, S., HEBEISEN, T., LÜSCHER, A., FREHNER, M., FISCHER, B. VAN KESSEL; C., HENDREY, G.R., BLUM, H. & NÖSBERGER, J. (1996): Symbiotic nitrogen fixation: one key to understand the response of temperate grassland ecosystems to elevated CO₂? In: KÖRNER, C. & BAZZAZ, F.A.: Community, Population, and Evolutionary responses to elevated CO₂ concentration. Academic Press, New York. 253-264.
- HARTWIG, U.A., LÜSCHER, A., DAEPF, M., BLUM, H., SOUSSANA, J.-F. & NÖSBERGER, J. (2000): Due to symbiotic N₂ fixation, five years of elevated atmospheric pCO₂ had no effect on the N concentration of plant litter in fertile, mixed grassland. *Plant and Soil* 224, 43-50.
- HARTWIG, U.A., LÜSCHER, A., NÖSBERGER, J. & VAN KESSEL, C. (2002): Nitrogen-15 budget in model ecosystems of white clover and perennial ryegrass exposed for four years at elevated atmospheric pCO₂. *Global Change Biology* 8, 194-202.
- HÄTTENSCHWILER, S. & KÖRNER, C. (2003): Does elevated CO₂ facilitate naturalization of the non-indigenous *Prunus laurocerasus* in Swiss temperate forests? *Journal of Ecology* 17, 778-785.
- HEBEISEN, T., LÜSCHER, A., ZANETTI, S., FISCHER, B.U., HARTWIG, U.A., FREHNER, M., HENDREY, G.R., BLUM, H. & NÖSBERGER, J. (1997a): Growth response of *Trifolium repens* L. und *Lolium perenne* L. as monocultures and bi-species mixture to free air CO₂ enrichment and management. *Global Change Biology* 3, 149-160.
- HEBEISEN, T., LÜSCHER, A. & NÖSBERGER, J. (1997b): Effects of elevated atmospheric CO₂ and nitrogen fertilisation on yield of *Trifolium repens* and *Lolium perenne*. *Acta Oecologica* 18, 277-284.

- HENDREY, G.R., LEWIN, K.F. & NAGY, J. (1992): Control of carbon dioxide in unconfined field plots. In: SCHULZE, E.-D. & MOONEY, H.A. [Hrsg.]: Design and execution of experiments on CO₂ enrichment. Report no. 6 in the Ecosystems Research Report Series of Environmental Research Programme of the Commission of the European Communities. CEC, Brüssel. 309-327.
- HENRY, F., NGUYEN, CH., PATERSON, E., SIM, A. & ROBIN, CH. (2005): How does nitrogen availability alter rhizodeposition in *Lolium multiflorum* Lam. during vegetative growth? *Plant and Soil* 269, 181-191.
- HIRSCH, A.M. (1992): Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist* 122, 211-237.
- HOCKING, P.J. & MEYER, C.P. (1991): Carbon dioxide enrichment decreases critical nitrate and nitrogen concentration in wheat. *Journal of Plant Nutrition* 14, 571-584.
- HODGE, A., GRAYSTON, S.J. & ORD, B.G. (1996): A novel method for characterisation and quantification of plant root exudates. *Plant and Soil* 184, 97-104.
- HODGE, A., PATERSON, E., GRAYSTON, S.J., CAMPBELL, C.D., ORD, B.G. & KILLHAM, K. (1998): Characterisation and microbial utilisation of exudate material from the rhizosphere of *Lolium perenne* grown under CO₂ enrichment. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 1033-1043.
- HODGE, A. & MILLARD, P. (1998): Effect of elevated CO₂ on carbon partitioning and exudates release from *Plantago lanceolata*. *Physiologia Plantarum* 103, 280-286.
- HUNGRIA, M., JOSEPH, C.M. & PHILLIPS, D.A. (1991a): Anthocyanidins and flavonols, major *nod* gene inducer from seeds of a black-seeded common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiology* 97, 751-758.
- HUNGRIA, M., JOSEPH, C.M. & PHILLIPS, D.A. (1991b): *Rhizobium nod* gene inducer exuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiology* 97, 759-764.
- INGESTAD, T. (1982): Relative addition rate and external concentration; driving variables used in plant nutrition research. *Plant, Cell & Environment* 5, 443-453.

- INNES, R.W., KUEMPEL, P.L., PLAZINSKI, J., CANTER-CREMERS, H., ROLFE, B.G. & DJORDJEVIC, M.A. (1985): Plant factors induce expression of nodulation and host-range genes in *Rhizobium trifolii*. *Molecular and General Genetics* 201, 426-432.
- IPCC (2001): *Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge.
- JACOB, J., GREITNER, C. & DRAKE, B.G. (1995): Acclimation of photosynthesis in relation to Rubisco and non-structural carbohydrate contents and *in situ* carboxylase activity in *Scirpus olneyi* grown at elevated carbon dioxide in the field. *Plant, Cell and Environment* 18, 87-884.
- JAIN, V. & NAINAWATEE, H.S. (2002): Signals to legume nodulation and soil microorganisms. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 11, 1-10.
- JOHNSTON, A.W.B. & BERINGER, J.E. (1977): Chromosomal recombination between *Rhizobium* species. *Nature* 267, 611-613.
- JONGEN, M., JONES, M.B., HEBEISEN, T., BLUM, H. & HENDREY, G. (1995): The effect of elevated CO₂ concentrations on the root growth of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* grown in a FACE system. *Global Change Biology* 1, 361-371.
- KAPE, R., PARNISKE, M., BRANDT, S. & WERNER, D. (1992a): Isoliquiritigenin, a strong *nod* gene- and glyceollin resistance-inducing flavonoid from soybean root exudate. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1705-1710.
- KAPE, R., WEX, K., PARNISKE, M., GÖRGE, E., WETZEL, A. & WERNER, D. (1992b): Legume root metabolites and VA-Mycorrhiza development. *Plant Physiology* 141, 54-60.
- KEELING, C.D. & WHORF, T.P. (2005): Atmospheric CO₂ records from sites in the SIO air sampling network. In *Trends: A Compendium of Data on Global Change*. Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy, Oak Ridge, Tenn.
- KIM, J. & REES, D.C. (1992): Structural models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum-iron protein. *Science* 257, 1677-1682.
- KIMBALL, B.A. (1983): Carbon dioxide and agriculture yield: an assemblage and analysis of 430 prior observations. *Agronomy Journal* 75, 779-788.

- KIJNI, J.W. (1992): The *Rhizobium* infection process. In: STACEY, G., BURRIS, R.H. & EVANS, H.J. [Hrsg.]: Biological nitrogen fixation. Chapman & Hall, New York. 349-398.
- KIMBALL, B.A., MAUNEY, J.R., NAKAYAMA, F.S. & IDSO, S.B. (1993): Effects of increasing atmospheric CO₂ on vegetation. *Vegetatio* 104/105, 65-75.
- KOEUTH, T., VERSALOVIC, J. & LUPSKI, J.R. (1995): Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* box elements in diverse bacteria. *Genome Research* 5, 408-418.
- KÖRNER, C. (1999): Biologische Folgen der CO₂-Erhöhung. *Biologie in unserer Zeit* 29, 353-363.
- KÖRNER, C. (2000): Biosphere responses to CO₂ enrichment. *Ecological Applications* 10 (6), 1590-1619.
- KÖRNER, C. (2006): Plant CO₂ responses: an issue of definition, time and resource supply. *New Phytologist* 172, 393-411.
- KONDOROSI, E., BANFALVI, Z. & KONDOROSI, A. (1984): Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti*: identification of nodulation genes. *Molecular and General Genetics* 193, 445-452.
- KRONZUCKER, H.J., SCHJOERRING, J.K., ERNER, Y., KIRK, G.J.D., SIDDIQI, M.Y. & GLASS, A.D.M. (1998): Dynamic interactions between root NH₄⁺ influx and long-distance N translocation in rice: insight into feedback processes. *Plant Cell Physiology* 39, 1287-1293.
- LAMBERS, H., CHAPIN, F.S. & PONS, T.L. (1998): *Plant physiological ecology*. Springer-Verlag, New York. 540 S.
- LAMBORG, M.R., HARDY, R.W.F. & PAUL, E.A. (1983): Microbial effects. In: LEMON, E.R. [Hrsg.]: CO₂ and plants. The response of plants to rising levels of atmospheric carbon dioxide. Westview Press, Boulder. 131-176.
- LEWIN, S.A., MOONEY, H.A. & FIELD, C. (1989): The dependence of plant root:shoot ratios on internal nitrogen concentration. *Annals of Botany* 64, 71-75.
- LEWIN, K.F., HENDREY, G.R., NAGY, J. & LAMORTE, R.L. (1994): Design and application of a free-air carbon dioxide enrichment facility. *Agriculture For Meteorology* 70, 15-29.

- LEWIS-HENDERSON, W.R. & DJORDJEVIC, M.A. (1991a): A cultivar-specific interaction between *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* and subterranean clover is controlled by *nodM*, other bacterial cultivar specificity genes, and a single recessive host gene. *Journal of Bacteriology* 173, 2791-2799.
- LEWIS-HENDERSON, W.R. & DJORDJEVIC, M.A. (1991b): *nodT*, positively-acting cultivar specificity determinant controlling nodulation of *Trifolium subterraneum* by *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Plant Molecular Biology* 16, 515-526.
- LONG, S.P. & DRAKE, B.G. (1992): Photosynthetic CO₂ assimilation and rising atmospheric CO₂ concentrations. In: BAKER, N.R. & THOMAS, H. [Hrsg.]: *Topics in photosynthesis. Crop photosynthesis: spatial and temporal determinants*. Elsevier Science, Amsterdam. 2, 69-107.
- LONG, S.R. (1996): *Rhizobium* symbiosis: nod-factors in perspective. *The Plant Cell* 8, 1885-1898.
- LUO, Y.Q. & REYNOLDS, J.F. (1999): Validity of extrapolating field CO₂ experiments to predict carbon sequestration in natural ecosystems. *Ecology* 80, 1568-1583.
- LUPSKI, J.R. & WEINSTOCK, G.M. (1992): Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *Journal of Bacteriology* 174, 4525-4529.
- LÜSCHER, A., HARTWIG, U.A.; SUTER, D. & NÖSBERGER, J. (2000): Direct evidence that symbiotic N₂ fixation in fertile grassland is an important trait for a strong response of plants to elevated atmospheric CO₂. *Global Change Biology* 6, 655-662.
- MABRY, T.J., MARKHAM, K.R. & THOMAS, M.B. (1970): *The systematic identification of flavonoids*. Springer-Verlag, New York. 354 S.
- MARIE, C., BROUGHTON, W.J. & DEAKIN, W.J. (2001): *Rhizobium* type III secretion systems: legume charmers or alarmers? *Current Opinion in Plant Biology* 4, 336-342.
- MARILLEY, L., HARTWIG, U.A. & ARAGNO, M. (1999): Influence of an elevated atmospheric CO₂ content on soil and rhizosphere bacterial communities beneath *Lolium perenne* and *Trifolium repens* under field conditions. *Microbial Ecology* 38, 39-49.
- MARSCHNER, H. (1995): *Mineral nutrition of higher plants*. 2. Aufl. Academic Press, London, San Diego. 889 S.

- MASTERSON, C.L. & SHERWOOD, M.T. (1978): Some effects of increased atmospheric carbon dioxide on white clover (*Trifolium repens*) and pea (*Pisum sativum*). *Plant and Soil* 49, 421-426.
- MAXWELL, C.A., HARTWIG, U.A., JOSEPH, C.M. & PHILLIPS, D.A. (1989): A chalcone and two related flavonoids released from alfalfa roots induce *nod* genes of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiology* 91, 842-847.
- MCIVER, J., DJORDJEVIC, M.A., WEINMAN, J.J. & ROLFE, B.G. (1993): Influence of *Rhizobium leguminisarum* biovar *trifolii* host specific nodulation genes on the ontogeny of clover nodulation. *Protoplasma* 172, 166-179.
- MCKAY, I.A. & DJORDJEVIC, M.A. (1993): Production and excretion of Nod metabolites by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* are disrupted by the same environmental factors that reduce nodulation in the field. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3385-3392.
- MIKAN, C.J., ZAK, D.R., KUBISKE, M.E. & PREGITZER, K.S. (2000): Combined effects of atmospheric CO₂ and N availability on the belowground carbon and nitrogen dynamics of aspen mesocosms. *Oecologia* 124, 432-445.
- MILLER, J.H. (1972): *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. 352-355.
- MILLER, D.D., DE RUIJTER, N.C.A., BISSELING, T. & EMONS, A.M.C (1999): The role of actin in root hair morphogenesis: studies with lipochito-oligosaccharide as a growth stimulator and cytochalasin as an actin perturbing drug. *Plant Journal* 17, 141-154.
- MONTEALEGRE, C.M., VAN KESSEL, C., BLUMENTHAL, J.M., HUR, H.-G., HARTWIG, U.A. & SADOWSKY, M.J. (2000): Elevated atmospheric CO₂ alters microbial population structure in pasture ecosystem. *Global Change Biology* 6, 475-482.
- MONTEALEGRE, C.M., VAN KESSEL, C., RUSSELLE, M.P. & SADOWSKY, M.J. (2002): Changes in microbial activity and composition in a pasture ecosystem exposed to elevated atmospheric carbon dioxide. *Plant and Soil* 243, 197-207.

- MOONEY, H.A., CANADELL, J., CHAPIN III, F.S., EHLERINGER, J.R., KÖRNER, C., MCMURTRIE, R.E., PARTON, W.J., PITELKA, L.F. & SCHULZE, E.-D. (1999): Ecosystem physiology responses to global change. In: WALKER, B., STEFFEN, W., CANADELL, J. & INGRAM, J. [Hrsg.]: The terrestrial biosphere and global change. Cambridge University Press, Cambridge. 141-190.
- MORTENSON, L.E. (1966): Components of cell-free extrats of *Clostridium pasteurianum* required for ATP-dependent H₂ evolution from dithionite and for N₂ fixation. *Biochemica et Biophysica Acta* 127, 18-25.
- NAP, J.P & BISSELING, T. (1990): Nodulin function and nodulin gene regulation in root nodule development. In: GRESSHOFF, P.M. [Hrsg.]: Molecular biology of symbiotic nitrogen fixation. CRC Press, Boca Raton. 181-229.
- NEUMANN, G. & RÖMHELD, V. (2001): The release of root exudates as affected by plant's physiological status. In: PINTON, R., VARANINI, Z. & NANNIPIERI, P. [Hrsg.]: The Rhizosphere. Marcel Dekker, Basel, New York. 41-93.
- NEWCOMB, W. (1976): A correlated light and electron microscopy study of symbiotic growth and differentiation in *Pisum sativum* root nodules. *Canadian Journal of Botany* 54, 2163-2186.
- NIJS, I., IMPENS, I. & BEHAEGHE, T. (1988): Effects of elevated atmospheric carbon dioxide on gas exchange and growth of white clover. *Photosynthesis Research* 15, 163-176.
- NORBY, R.J., O'NEILL, E.G., HOOD, W.G. & LUXMOORE, R.J. (1987): Carbon allocation, root exudation and mycorrhizal colonization of *Pinus echinata* seedlings grown under CO₂ enrichment. *Tree Physiology* 3, 203-210.
- NORBY, R.J., WULLSCHLEGER, S.D., GUNDERSON, C.A., JOHNSON, D.W. & CEULEMANS, R. (1999): Tree responses to rising CO₂: implications for the future forest. *Plant, Cell & Environment* 22, 683-714.
- O'NEIL, E.G., LUXMOORE, R.J. & NORBY, R.J. (1987): Elevated atmospheric CO₂ effects on seedling growth, nutrient uptake and rhizosphere bacterial population of *Liriodendron tulpifera* L. *Plant and Soil* 104, 3-11.

- OREN, R., ELLSWORTH, D.S., JOHNSEN, K.H., PHILLIPS, N., EWERS, B.E., MAIER, C., SCHÄFER, K.V.R., MCCARTHY, H., HENDREY, G., MCNULTY, S.G. & KATUL, G.G. (2001): Soil fertility limits carbon sequestration by forest ecosystems in a CO₂-enriched atmosphere. *Nature* 411, 469-472.
- OVERDIECK, D. & REINING, F. (1986): Effect of atmospheric CO₂ enrichment on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and white clover (*Trifolium repens* L.) competing in managed model-ecosystem. *Acta Oecologica* 7, 357-366.
- PATERSON, E., RATTRAY, E.A.S. & KILLHAM, K. (1996): Effect of elevated atmospheric CO₂ concentration on C-partitioning and rhizosphere C-flow for three plant species. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 195-201.
- PATERSON, E., HALL, J.M., RATTRAY, E.A.S., GRIFFITHS, B.S., RITZ, K. & KILLHAM, K. (1997): Effect of elevated CO₂ on rhizosphere carbon flow and soil microbial processes. *Global Change Biology* 3, 363-377.
- PATTERSON, D.T. & FLINT, E.P. (1990): Implications of increasing carbon dioxide and climate change for plant communities and competition in natural and managed ecosystems. In: KIMBALL, B.A. [Hrsg.]: *Impact of carbon dioxide, trace gases, and climate change on global agriculture*. American Society of Agronomy, Madison. 83-110.
- PEETERS, A., PARENTE, G. & LE GALL, A. (2006): Temperate legumes: key species for sustainable temperate mixtures. *Grassland Science in Europe* 11, 205-220.
- PETERS, N.K. & VERMA, D.P.S. (1990): Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5, 33-37.
- PEUKE, D.J., HARTUNG, W. & JESCHKE, W.D. (1994): The uptake and flow of C, N, and ions between roots and shoots in *Ricinus communis* L. II Grown with low or high nitrate supply. *Journal of Experimental Botany* 45, 733-740.
- PHILIPS, D.A. (1992): Flavonoids: plant signal to soil microbes. *Recent Advances in Phytochemistry* 26, 201-231.
- POLICY, H.W., JOHNSON, H.B., MARINO, B.D. & MAYEUX, H.S. (1993): Increase in C₃ plant water-use efficiency and biomass over glacial to present CO₂ concentrations. *Nature* 361, 61-64.
- POORTER, H. (1993): Interspecific variation in the growth response of plants to an elevated ambient CO₂ concentration. *Vegetatio* 104/105, 77-97.

- POORTER, H., BERKEL, V., BAXTER, R., DEN HERTOOG, J., DIJKSTRA, P., GIFFORD, R.M., GRIFFIN, K.L., ROUNET, C., ROY, J. & WONG, S.C. (1997): The effect of elevated carbon dioxide on the chemical composition and construction costs of leaves of 27, C3 species. *Plant, Cell and Environment* 20, 472-482.
- RADEMAKER, J.L.W. & DE BRUIJN, F.J. (1997): Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. Internet Artikel. Siehe: <http://www.msu.edu/user/debruijn/>
- RAHMSTORF, S. & SCHELLNHUBER, H.J. (2006): *Der Klimawandel*. 2. Aufl. C.H. Beck oHG, München. 144 S.
- RATTRAY, E.A.S., PATERSON, E. & KILLHAM, K. (1995): Characterization of the dynamics of C-partitioning within *Lolium perenne* and to the rhizosphere microbial biomass using ¹⁴C pulse chase. *Biology and Fertility of Soils* 19, 280-286.
- REDMOND, J.W., BATLEY, M., DJORDJEVIC, M.A., INNES, R.W., KUEMPEL, P.L. & ROLFE, B.G. (1986): Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature* 323, 632-635.
- REICH, P.B., HOBBIE, S.E., LEE, T., ELLSWORTH, D.S., WEST, J.B., TILMAN, D., KNOPS, J.M.H., NAEEM, S. & TROST, J. (2006): Nitrogen limitation constrains sustainability of ecosystem response to CO₂. *Nature* 440, 922-925.
- REUTER, D.J. & ROBINSON, J.B. (1997): *Plant Analysis*. 2. Aufl. CSIRO Publishing, Australia. 450 S.
- REYNOLDS, H.L. (1996): Effects of elevated CO₂ on plants grown in competition. In: KÖRNER, C. & BAZZAZ, F.A. [Hrsg.]: *Carbon dioxide, populations, and communities*. Academic Press, San Diego. 273-286.
- RHIJN, P. & VANDERLEYDEN, J. (1995): The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiological Reviews* 59, 124-142.
- RICE, C.W., GARCIA, F.O., HAMPTON, C.O. & OWENSBY, C.E. (1994): Soil microbial response in tallgrass prairie to elevated CO₂. *Plant and Soil* 165, 67-74.

- RICHTER, M. (2003): Influence of elevated atmospheric CO₂ concentration on symbiotic N₂ fixation and availability of nitrogen in grassland ecosystems. Dissertation, ETH Zürich.
- ROGERS, G.S., PAYNE, L., MILHAM, P. & CONROY, J. (1993): Nitrogen and phosphorus requirements of cotton and wheat under changing CO₂ concentrations. *Plant and Soil* 155, 231-234.
- ROGERS, H.H., RUNION, G.B. & KRUPA, S.V. (1994): Plant responses to atmospheric CO₂ enrichment with emphasis on roots and the rhizosphere. *Environmental pollution* 83, 155-189.
- ROGERS, H.H., PRIOR, S.A., RUNION, G.B. & MITCHELL, R.J. (1996): Root to shoot ratio of crops as influenced by CO₂. *Plant and Soil* 187, 229-248.
- ROLFE, B.G. (1988): Flavones and isoflavones as inducing substances of legume nodulation. *BioFactors* 1, 3-10.
- ROSTAS, K., KONDOROSI, E., HORVÁTH, B., SIMONCSITS, A. & KONDOROSI, A. (1986): Conservation of Extended Promoter Regions of Nodulation Genes in *Rhizobium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 83, 1757-1761.
- RYLE, G.J.A., POWELL, C.E. & DAVIDSON, I.A. (1992): Growth of white clover, dependent on N₂ fixation, in elevated CO₂ and temperature. *Annals of Botany* 70, 221-228.
- SADOWSKY, M.J., KINKEL, L.L., BOWERS, J.H. & SCHOTTEL, J.L. (1996): Use of repetitive intergenic DNA sequences to classify pathogenic and disease-suppressive streptomycetes strains. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3489-3493.
- SADOWSKY, M.J. & SCHORTEMAYER, M. (1997): Soil microbial responses to increased concentrations of atmospheric CO₂. *Global Change Biology* 3, 217-224.
- SADOWSKY, M.J. & HUR, H.G. (1998): Use of endogenous repeated sequences to fingerprint bacterial genomic DNA. In: LUPSKI, J.R., WEINSTOCK, G. & DE BRUJIN, F.J. [Hrsg.]: *Bacterial Genomes: Structure and Analysis*. Chapman and Hall, London. 399-413.
- 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.

- SCHEFFER, M., BROVKIN, V. & COX, P.M. (2006): Positive feedback between global warming and atmospheric CO₂ concentration inferred from past climate change. *Geophysical Research Letters* 33, L10702.
- SCHEIDEGGER, U.C. & NÖSBERGER, J. (1984): Influence of carbon dioxide concentration on growth, carbohydrate content, translocation and photosynthesis of white clover. *Annals of Botany* 54, 735-742.
- SCHENK, U., MANDERSCHIED, R., HUGEN, J. & WEIGEL, H.-J. (1995): Effects of CO₂ enrichment and intraspecific competition on biomass partitioning, nitrogen content and microbial biomass carbon in soil of perennial ryegrass and white clover. *Journal of Experimental Botany* 46, 987-993.
- SCHENK, U., JÄGER, H.-J. & WEIGEL, H.J. (1997): The response of perennial ryegrass/white clover swards to elevated atmospheric CO₂ concentrations. I. Effects on competition and species composition and interaction with N supply. *New Phytologist* 135, 67-79.
- SCHLAMMAN, H.R.M., OKKER, R.J.H. & LUGTENBERG, B.J.J. (1992): Regulation of nodulation gene expression by NodD in rhizobia. *Journal of Bacteriology* 174, 5177-5182.
- SCHLAMMAN, H.R.M., PHILLIPS, D.A. & KONDOROSI, E. (1998): Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes. In: SPAINK, H.P., KONDOROSI, A. & HOOYKAAS, P.J.J. [Hrsg.]: *The Rhizobiaceae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 361-386.
- SCHLAMMAN, H.R.M., OLSTHOORN, M.M.A., HARTEVELD, M., DÖRNER, L., DJORDJEVIC, M.A., THOMAS-OATES, J.E. & SPAINK, H.P. (2006): The production of species-specific highly unsaturated fatty acyl-containing LCOs from *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* is stringently regulated by nodD and involves the nodRL genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 215-226.
- SCHNEIDER, M.K., LÜSCHER, A., RICHTER, M., AESCHLIMANN, U., HARTWIG, U.A., BLUM, H., FROSSARD, E. & NÖSBERGER, J. (2004): Ten years of free-air CO₂ enrichment altered the mobilization of N from soil in *Lolium perenne* L. swards. *Global Change Biology* 10, 1377-1388.
- SCHOFIELD, P.R. & WATSON, J.M. (1985): DNA sequence of *Rhizobium trifolii* nodulation genes reveals a reiterated and potentially regulatory sequence preceding *nodABC* and *nodEF*. *Nucleic Acids Research* 14, 2891-2903.

- SCHOPFER, P. & BRENNICKE, A. (2006): Pflanzenphysiologie. 6. Aufl. Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag, München. 700 S.
- SCHORTEMAYER, M., HARTWIG, U.A., HENDREY, G.R. & SADOWSKY, M.J. (1996): Microbial community changes in the rhizosphere of white clover and perennial ryegrass exposed to free air carbon dioxide enrichment (FACE). *Soil Biology and Biochemistry* 28, 1717-1724.
- SCHULTZE, M., KONDOROSI, E., RATET, P., BUIRÉ, M. & KONDOROSI, A. (1994): Cell and molecular biology of Rhizobium-plant interactions. *International Review of Cytology* 156, 1-75.
- SCHULTZE, M. & KONDOROSI, A. (1998): Regulation of symbiotic root nodule development. *Annual Reviews of Genetics* 32; 33-57.
- SHAW, L.J., MORRIS, P. & HOOKER, J.E. (2006): Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environmental Microbiology* 8, 1867-1880.
- SIEGENTHALER, U., STOCKER, T.F., MONNIN, E., LÜTHI, D., SCHWANDER, J., STAUFFER, B., RAYNAUD, D., BARNOLA, J., FISCHER, H., MASSON-DELMOTTE, V. & JOUZEL, J. (2005): Stable carbon cycle-climate relationship during the late Pleistocene. *Science* 310, 1313-1317.
- SIONIT, N. (1983): Response of soybean to two levels of mineral nutrition in CO₂ enriched atmosphere. *Crop Science* 23, 329-333.
- SMIT, G., TUBBING, D.M.J., KIJNE, J.W. & Lugtenberg, B.J.J. (1991): Role of Ca²⁺ in the activity of rhicadhesin from *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, which mediates the first step in attachment of *Rhizobiaceae* cells to plant root hair tips. *Archive of Microbiology* 155, 278-283.
- SOMASEGARAN, P. & HOBEN, H.J. (1994): Handbook for Rhizobia: methods in Legume-*Rhizobium* technology. Springer-Verlag, New York. 450 S.
- SOWERBY, A., BLUM, H., GRAY, T.R.G. & BALL, A.S. (2000): The decomposition of *Lolium perenne* in soils exposed to elevated CO₂: comparison of mass loss of litter with soil respiration and soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1359-1366.
- SPAINK, H.P., WEINMAN, J., DJORDJEVIC, M.A., WIJFFELMAN, C.A., OKKER, R.J.H. & LUGTENBERG, B.J.J. (1989a): Genetic analysis and cellular localization of the *Rhizobium* host specificity-determining NodE protein. *EMBO Journal* 8, 2811-2818.

- SPAINK, H.P., WIJFFELMAN, C.A., OKKER, R.J.H. & LUGTENBERG, B.J.J. (1989b): Localization and functional regions of the *Rhizobium nodD* product using hybrid *nodD* genes. *Plant Molecular Biology* 12, 59-73.
- SPAINK, H.P., WIJFJES, A.H.M. & LUGTENBERG, B.J.J. (1995): Rhizobium NodI and NodJ proteins play a role in the efficiency of secretion of lipochitin oligosaccharides. *Journal of Bacteriology* 177, 6276-6281.
- SPAINK, H.P. (2000): Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Review of Microbiology* 54, 257-288.
- 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.
- STRASBURGER, E., SITTE, P., WEILER, E.W., KADEREIT, J.W., BRESINSKY, A. & KÖRNER, C. (2002): *Lehrbuch der Botanik für Hochschulen*. 35. Neub. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin. 1123 S.
- STULEN, I. & DEN HERTOOG, J. (1993): Root growth and functioning under atmospheric CO₂ enrichment. *Vegetatio* 104/105, 99-115.
- SURIN, B.P., WATSON, J.M., HAMILTON, W.D.O., ECONOMOU, A. & DOWNIE, J.A. (1990): Molecular characterization of the nodulation gene, *nodT*, from two biovars of *Rhizobium leguminosarum*. *Molecular Microbiology* 4, 245-252.
- SUTER, D., FREHNER, M., FISCHER, B. U., NÖSBERGER, J., & LÜSCHER, A. (2002): Elevated CO₂ increases carbon allocation to the roots of *Lolium perenne* under free-air CO₂ enrichment but not in a controlled environment. *New Phytologist* 154, 65-75.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. (2000): *Physiologie der Pflanze*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin. 773 S.
- USELMAN, S.M., QUALLS, R.G. & THOMAS, R.B. (2000): Effects of increased atmospheric CO₂, temperature, and soil N availability on root exudation of dissolved organic carbon by a N-fixing tree (*Robinia pseudoacacia* L.). *Plant and Soil* 222, 191-202.
- VAN DE KOOIJ, T.A.W. & DE KOK, L.J. (1996): Impact of elevated CO₂ on growth and development of *Arabidopsis thaliana* L. *Phyton* (Horn) 36, 173-184.

- VAN GINKEL, J.H., GORISSOB, A. & POLCI, D. (2000): Elevated atmospheric carbon dioxide concentration: effects of increased carbon input in a *Lolium perenne* soil on microorganisms and decomposition. *Soil Biology & Biochemistry* 32, 449-456.
- VAN KESSEL, C., HORWATH, W.R., HARTWIG, U.A., HARRIS, D. & LÜSCHER, A. (2000): Net soil carbon input under ambient and elevated CO₂ concentrations: isotopic evidence after 4 years. *Global Change Biology* 6, 435-444.
- VAN RHIJN, P. & VANDERLEYDEN, J. (1995): The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiological Reviews* 59, 124-142.
- VAN VEEN, J.A., LILJEROTH, E. & LEKKERKERK, L.J.A. (1991): Carbon fluxes in plant-soil systems at elevated atmospheric CO₂ levels. *Ecological Applications* 1, 175-181.
- VANCE, C.P. (2000): Amide biosynthesis in root nodules of temperate legumes. In: TRIPLETT, E.W. [Hrsg.]: *Prokaryotic nitrogen fixation*. Horizon Scientific Press, Wymondham. 589-607.
- VERMA, D.P.S. (2000): Nodulins: nodule-specific host gene products, their induction and function in root nodule symbiosis. In: TRIPLETT, E.W. [Hrsg.]: *Prokaryotic nitrogen fixation*. Horizon Scientific Press, Wymondham. 467-488.
- WALCH-LIU, P., NEUMANN, G. & ENGELS, C. (2001): Elevated atmospheric CO₂ concentration favors nitrogen partitioning into roots of tobacco plants under nitrogen deficiency by decreasing nitrogen demand of the shoot. *Journal of Plant Nutrition* 24, 835-854.
- WARDLAW, I.F. (1990): The control of carbon partitioning in plants. *New Phytologist* 116, 341-381.
- WEBBER, A.N., NIE, G.Y. & LONG, S.P. (1994): Acclimation of photosynthetic proteins to rising atmospheric CO₂. *Photosynthesis Research* 39(3), 413-425.
- WERNER, D. (1992): Physiology of nitrogen-fixing legume nodules: compartments and functions. In: STACEY, G., BURRIS, R.H. & EVANS, H.J. [Hrsg.]: *Biological nitrogen fixation*. Chapman & Hall, London, New York. 399-431.

- WEST, J.B., HILLERISLAMBERS, J., LEE, T.D., HOBBI, S.E. & REICH, P.B. (2005): Legume species identity and soil nitrogen supply determine symbiotic nitrogen-fixation responses to elevated atmospheric [CO₂]. *New Phytologist* 167, 523-530.
- WÜRTH, M.K.R., WINTER, K. & KÖRNER, Ch. (1998): Leaf carbohydrate responses to CO₂-enrichment at the top of a tropical forest. *Oecologia* 116, 18-25.
- ZAAT, S.A.J., WIJFFELMAN, C.A., SPAINK, H.P., VAN BRUSSEL, A.A.N., OKKER, R.J.H. & LUGTENBERG, B.J.J. (1987): Induction of the *nodA* promoter of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI by plant flavanones and flavones. *Journal of Bacteriology* 169, 198-204.
- ZAK, D.R., PREGITZER, K.S., CURTIS, P.S., TEERI, J.A., FOGEL, R. & RANDLETT, D.L. (1993): Elevated atmospheric CO₂ and feedback between carbon and nitrogen cycles. *Plant and Soil* 151, 105-117.
- ZANETTI, S., HARTWIG, U.A., LÜSCHER, A., HEBEISEN, T., FREHNER, M., HENDREY, G.R., BLUM, H. & NÖSBERGER, J. (1996): Stimulation of symbiotic N₂ fixation in *Trifolium repens* L. under elevated atmospheric pCO₂ in a grassland ecosystem. *Plant Physiology* 112, 575-583.
- ZANETTI, S. & HARTWIG, U.A. (1997): Symbiotic N₂ fixation increases under elevated atmospheric pCO₂ in the field. *Acta Oecologica* 18, 285-290.
- ZANETTI, S., HARTWIG, U.A., VAN KESSEL, C., LÜSCHER, A., HEBEISEN, T., FREHNER, M., FISCHER, B.U., HENDREY, G.R., BLUM, H. & NÖSBERGER, J. (1997): Does nitrogen nutrition restrict the CO₂ response of fertile grassland lacking legumes? *Oecologia* 112, 17-25.
- ZANETTI, S. HARTWIG, U.A. & NÖSBERGER, J. (1998): Elevated atmospheric CO₂ does not affect *per se* the preference for symbiotic nitrogen as opposed to mineral nitrogen of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell and Environment* 21, 623-630.

8 ANHANG

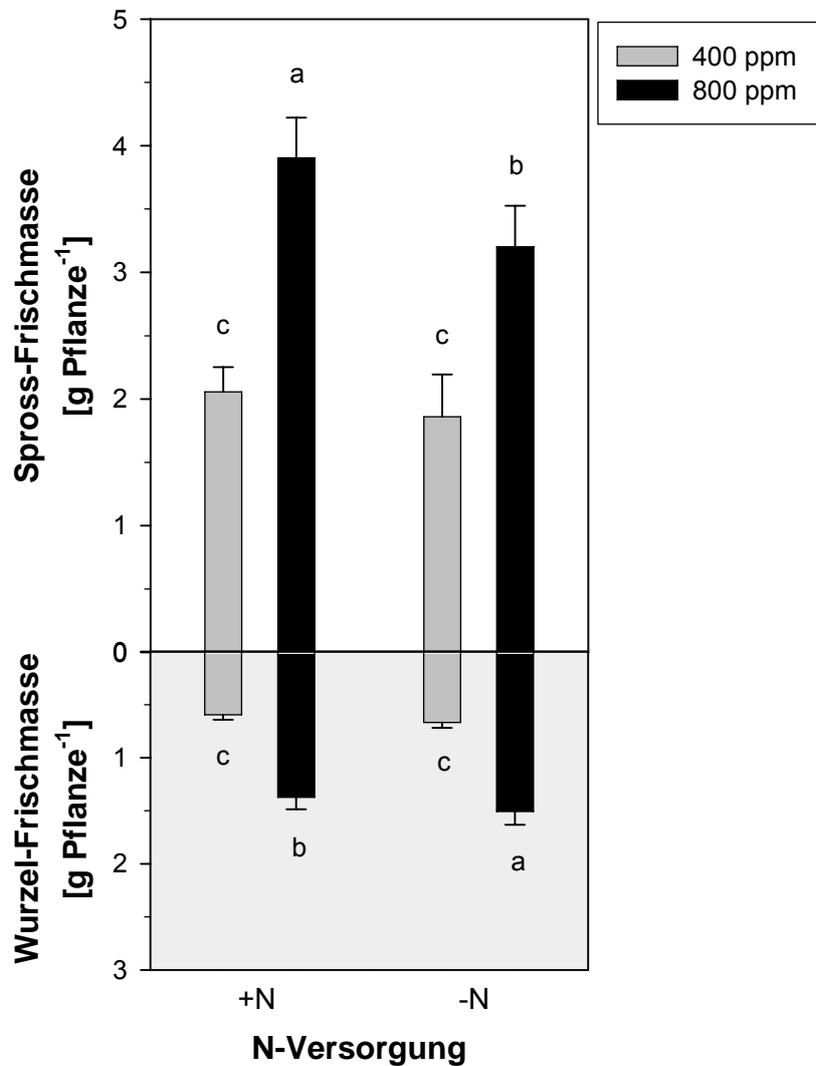


Abb. A 1: Spross- und Wurzelfrischmasse von steril kultivierten *T. repens*-Pflanzen in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration und der N-Versorgung. Die Säulen entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichungen ($n = 15, P < 0,05$).

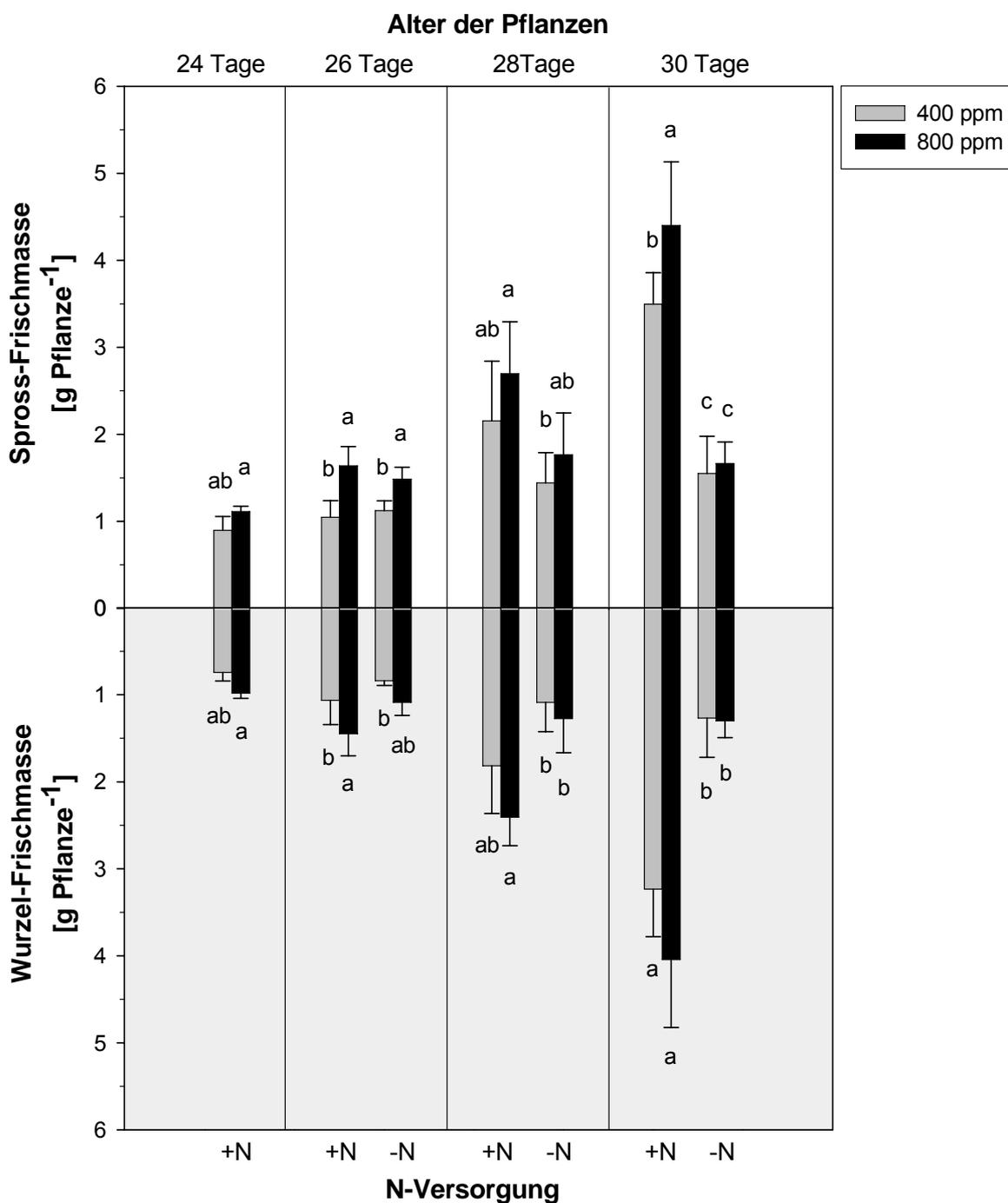


Abb. A 2: Spross- und Wurzel-Frischmasse von nicht-steril kultivierten *T. repens*-Pflanzen in Abhängigkeit der atmosphärischen CO₂-Konzentration, der N-Versorgung und des Pflanzenalters. Die Säulen entsprechen Mittelwerte mit Standardabweichungen ($n = 5$, $P < 0,05$).

Tab. A 1: F- und P-Werte ($P < 0,05$) der zweifaktoriellen ANOVA für den Einfluss der CO_2 -Konzentration und N-Versorgung auf die Pflanzenbiomasse [g Pflanze^{-1}], das Wurzel/Spross-Verhältnis, die C- und N-Konzentration [%] sowie das C/N-Verhältnis unter sterilen Versuchsbedingungen.

	CO₂	N	CO₂ × N
Spross-Trockenmasse	$F_{1,54}=431,2$ $P<0,0001$	$F_{1,54}=12,8$ $P=0,0007$	$F_{1,54}=9,4$ $P=0,0034$
Wurzel-Trockenmasse	$F_{1,54}=189,5$ $P<0,0001$	$F_{1,54}=8,0$ $P=0,0066$	$F_{1,54}=0,016$ $P=0,8988$
Wurzel/Spross-Verhältnis	$F_{1,54}=9,2$ $P=0,0038$	$F_{1,54}=17,4$ $P=0,0001$	$F_{1,54}=0,0002$ $P=0,9891$
Spross C-Konzentration	$F_{1,54}=3,9$ $P=0,0522$	$F_{1,54}=284,8$ $P<0,0001$	$F_{1,54}=5,7$ $P=0,0207$
Wurzel C-Konzentration	$F_{1,54}=22,3$ $P<0,0001$	$F_{1,54}=437,9$ $P<0,0001$	$F_{1,54}=18,5$ $P<0,0001$
Spross N-Konzentration	$F_{1,54}=26,1$ $P<0,0001$	$F_{1,54}=885,8$ $P<0,0001$	$F_{1,54}=14,5$ $P=0,0004$
Wurzel N-Konzentration	$F_{1,54}=0,2$ $P=0,6579$	$F_{1,54}=2381,6$ $P<0,0001$	$F_{1,54}=0,06$ $P=0,8054$
Spross C/N-Verhältnis	$F_{1,54}=29,5$ $P<0,0001$	$F_{1,54}=675,6$ $P<0,0001$	$F_{1,54}=23,0$ $P<0,0001$
Wurzel C/N-Verhältnis	$F_{1,54}=0$ $P=0,9330$	$F_{1,54}=1867,6$ $P<0,0001$	$F_{1,54}=1,5$ $P=0,2216$

Tab. A 2: F- und P-Werte ($P < 0,05$) der zweifaktoriellen ANOVA für den Einfluss der CO_2 -Konzentration und N-Versorgung auf die Wurzelexsudation von *T. repens* [$\text{pmol (30 Pflanzen)}^{-1} \text{ h}^{-1}$] bzw. [Peak-Area (30 Pflanzen) $^{-1} \text{ h}^{-1}$] unter sterilen Versuchsbedingungen.

		CO_2	N	$\text{CO}_2 \times \text{N}$
Pflanzenalter	Fraktionen			
[Tage]				
15	Umbelliferon	$F_{1,8}=18,5$ $P=0,0026$	$F_{1,8}=0,2$ $P=0,6373$	$F_{1,8}=0,3$ $P=0,6258$
	7,4'-DHF	$F_{1,8}=182$ $P<0,0001$	$F_{1,8}=14,3$ $P=0,0054$	$F_{1,8}=9,1$ $P=0,0166$
	Fraktion A	$F_{1,8}=2,3$ $P=0,1660$	$F_{1,8}=1,7$ $P=0,2347$	$F_{1,8}=1,9$ $P=0,2016$
	Fraktion B	$F_{1,8}=12,8$ $P=0,0072$	$F_{1,8}=0$ $P=0,9786$	$F_{1,8}=1,7$ $P=0,2245$
	Fraktion C	$F_{1,8}=37,2$ $P=0,0003$	$F_{1,8}=1,4$ $P=0,2716$	$F_{1,8}=1,2$ $P=0,3107$
	Fraktion D	$F_{1,8}=49,2$ $P=0,0001$	$F_{1,8}=7,7$ $P=0,0240$	$F_{1,8}=2,4$ $P=0,1597$
	Fraktion E	$F_{1,8}=37,9$ $P=0,0003$	$F_{1,8}=0,1$ $P=0,8349$	$F_{1,8}=0,4$ $P=0,5690$
17	Umbelliferon	$F_{1,8}=175,9$ $P<0,0001$	$F_{1,8}=95,0$ $P<0,0001$	$F_{1,8}=61,9$ $P<0,0001$
	7,4'-DHF	$F_{1,8}=10,7$ $P=0,0114$	$F_{1,8}=11,8$ $P=0,0088$	$F_{1,8}=3,3$ $P=0,1081$
	Fraktion A	$F_{1,8}=0,6$ $P=0,4718$	$F_{1,8}=5,7$ $P=0,0447$	$F_{1,8}=0,6$ $P=0,4792$
	Fraktion B	$F_{1,8}=7,3$ $P=0,0273$	$F_{1,8}=5,5$ $P=0,0466$	$F_{1,8}=4,1$ $P=0,0784$
	Fraktion C	$F_{1,8}=1,0$ $P=0,3508$	$F_{1,8}=37,6$ $P=0,0003$	$F_{1,8}=1,2$ $P=0,3081$
	Fraktion D	$F_{1,8}=8,4$ $P=0,0216$	$F_{1,8}=3,9$ $P=0,0837$	$F_{1,8}=3,3$ $P=0,1076$
	Fraktion E	$F_{1,8}=11,2$ $P=0,0101$	$F_{1,8}=18,5$ $P=0,0026$	$F_{1,8}=4,0$ $P=0,0817$

		CO ₂	N	CO ₂ × N
Pflanzenalter	Fraktionen			
[Tage]				
19	Umbelliferon	F _{1,8} =30,6 P=0,0006	F _{1,8} =68,1 P<0,0001	F _{1,8} =20,6 P=0,0019
	7,4'-DHF	F _{1,8} =74,1 P<0,0001	F _{1,8} =115,2 P<0,0001	F _{1,8} =50,7 P=0,0001
	Fraktion A	F _{1,8} =2,7 P=0,1416	F _{1,8} =2,7 P=0,1383	F _{1,8} =0,1 P=0,7127
	Fraktion B	F _{1,8} =0,1 P=0,7493	F _{1,8} =8,2 P<0,0217	F _{1,8} =0,2 P=0,7040
	Fraktion C	F _{1,8} =0,1 P=0,7914	F _{1,8} =138,1 P<0,0001	F _{1,8} =0 P=0,9744
	Fraktion D	F _{1,8} =8,7 P=0,0182	F _{1,8} =9,3 P=0,0159	F _{1,8} =0,9 P=0,3616
	Fraktion E	F _{1,8} =34,0 P=0,0004	F _{1,8} =102,4 P<0,0001	F _{1,8} =13,7 P=0,0060

Tab. A 3: F- und P-Werte ($P < 0,05$) der zweifaktoriellen ANOVA für den Einfluss der CO₂-Konzentration und N-Versorgung auf die Wurzelexsudation von *T. repens* [pmol g Wurzel FM⁻¹ h⁻¹] unter sterilen Versuchsbedingungen.

		CO ₂	N	CO ₂ × N
	Fraktion			
	Umbelliferon	F _{1,8} =0,1 P=0,8349	F _{1,8} =30,9 P=0,0005	F _{1,8} =1,9 P=0,2099
	7,4'-DHF	F _{1,8} =0,9 P=0,3819	F _{1,8} =78,9 P<0,0001	F _{1,8} =14,0 P=0,0057

Tab. A 4: F- und P-Werte ($P < 0,05$) der zweifaktoriellen ANOVA für den Einfluss der CO₂-Konzentration und N-Versorgung auf die Pflanzenbiomasse [g Pflanze⁻¹], das Wurzel/Spross-Verhältnis, die C- und N-Konzentration [%] sowie das C/N-Verhältnis unter unsterilen Versuchsbedingungen.

		CO ₂	N	CO ₂ × N
Pflanzenalter				
[Tage]				
24	Spross-Trockenmasse	F _{1,8} =20,7 P=0,0019		
	Wurzel-Trockenmasse	F _{1,8} =3,6 P=0,0944		
	Wurzel/Spross-Verhältnis	F _{1,8} =12,1 P=0,0084		
	Spross C-Konzentration	F _{1,8} =0,7 P=0,4419		
	Wurzel C-Konzentration	F _{1,8} =0,1 P=0,8244		
	Spross N-Konzentration	F _{1,8} =4,0 P=0,0812		
	Wurzel N-Konzentration	F _{1,8} =0,6 P=0,4444		
	Spross C/N-Verhältnis	F _{1,8} =4,3 P=0,0730		
	Wurzel C/N-Verhältnis	F _{1,8} =0,8 P=0,4086		
26	Spross-Trockenmasse	F _{1,16} =35,2 P<0,0001	F _{1,16} =11,1 P=0,0042	F _{1,16} =1,2 P=0,2822
	Wurzel-Trockenmasse	F _{1,16} =6,3 P=0,0237	F _{1,16} =0,8 P=0,3815	F _{1,16} =0,3 P=0,6239
	Wurzel/Spross-Verhältnis	F _{1,16} =4,5 P=0,0505	F _{1,16} =3,4 P=0,0838	F _{1,16} =3,5 P=0,0793
	Spross C-Gehalt	F _{1,16} =1,0 P=0,3383	F _{1,16} =10,5 P=0,0051	F _{1,16} =1,0 P=0,3313
	Wurzel C-Gehalt	F _{1,16} =0,1 P=0,7281	F _{1,16} =36,3 P<0,0001	F _{1,16} =1,6 P=0,2243
	Spross N-Gehalt	F _{1,16} =0,1 P=0,7073	F _{1,16} =57,4 P<0,0001	F _{1,16} =0,6 P=0,4457

		CO ₂	N	CO ₂ × N
Pflanzenalter				
[Tage]				
26	Wurzel N-Gehalt	F _{1,16} =3,9 P=0,0664	F _{1,16} =33,9 P<0,0001	F _{1,16} =1,4 P=0,2574
	Spross C/N-Verhältnis	F _{1,16} =0,1 P=0,8138	F _{1,16} =58,0 P<0,0001	F _{1,16} =0,9 P=0,3669
	Wurzel C/N-Verhältnis	F _{1,16} =2,3 P=0,1466	F _{1,16} =37,6 P<0,0001	F _{1,16} =0,7 P=0,4246
28	Spross-Trockenmasse	F _{1,16} =5,5 P=0,0320	F _{1,16} =0,1 P=0,8147	F _{1,16} =0,001 P=0,9733
	Wurzel-Trockenmasse	F _{1,16} =1,6 P=0,2216	F _{1,16} =2,6 P=0,1283	F _{1,16} =0,9 P=0,3611
	Wurzel/Spross-Verhältnis	F _{1,16} =4,7 P=0,0449	F _{1,16} =5,0 P=0,0418	F _{1,16} =1,7 P=0,2160
	Spross C-Gehalt	F _{1,16} =1,9 P=0,1869	F _{1,16} =102,2 P<0,0001	F _{1,16} =0,2 P=0,6361
	Wurzel C-Gehalt	F _{1,16} =2,8 P=0,1151	F _{1,16} =670,7 P<0,0001	F _{1,16} =0,3 P=0,6068
	Spross N-Gehalt	F _{1,16} =4,1 P=0,0612	F _{1,16} =1312,5 P<0,0001	F _{1,16} =0,04 P=0,8502
	Wurzel N-Gehalt	F _{1,16} =0,0 P=0,9846	F _{1,16} =635,1 P<0,0001	F _{1,16} =0,1 P=0,7522
	Spross C/N-Verhältnis	F _{1,16} =11,4 P=0,0039	F _{1,16} =1849,6 P<0,0001	F _{1,16} =5,0 P=0,0400
	Wurzel C/N-Verhältnis	F _{1,16} =0,2 P=0,7490	F _{1,16} =833,4 P<0,0001	F _{1,16} =0,0 P=0,9864
30	Spross-Trockenmasse	F _{1,16} =8,7 P=0,0094	F _{1,16} =23,0 P=0,0002	F _{1,16} =1,7 P=0,2098
	Wurzel-Trockenmasse	F _{1,16} =5,2 P=0,0366	F _{1,16} =25,8 P=0,0001	F _{1,16} =1,4 P=0,2564
	Wurzel/Spross-Verhältnis	F _{1,16} =0,1 P=0,8071	F _{1,16} =8,1 P=0,0118	F _{1,16} =0,02 P=0,8831
	Spross C-Gehalt	F _{1,16} =7,0 P=0,0175	F _{1,16} =38,2 P<0,0001	F _{1,16} =0,6 P=0,4511
	Wurzel C-Gehalt	F _{1,16} =0,54 P=0,4738	F _{1,16} =457,7 P<0,0001	F _{1,16} =0,1 P=0,8290

		CO₂	N	CO₂ × N
<i>Pflanzenalter</i>				
<i>[Tage]</i>				
30	Spross N-Gehalt	F _{1,16} =10,5 P=0,0052	F _{1,16} =2018,8 P<0,0001	F _{1,16} =0,1 P=0,7883
	Wurzel N-Gehalt	F _{1,16} =5,2 P=0,0372	F _{1,16} =1289,2 P<0,0001	F _{1,16} =5,5 P=0,0321
	Spross C/N-Verhältnis	F _{1,16} =17,6 P=0,0007	F _{1,16} =931,0 P<0,0001	F _{1,16} =11,5 P=0,0037
	Wurzel C/N-Verhältnis	F _{1,16} =0,3 P=0,5653	F _{1,16} =1023,9 P<0,0001	F _{1,16} =0,9 P=0,3644

Tab. A 5: F- und P-Werte ($P < 0,05$) der zweifaktoriellen ANOVA für den Einfluss der CO_2 -Konzentration und N-Versorgung auf die Wurzelexsudation von *T. repens* [$\text{pmol g Wurzel FM}^{-1} \text{h}^{-1}$] bzw. [Peak-Area g Wurzel $\text{FM}^{-1} \text{h}^{-1}$] unter sterilen Versuchsbedingungen.

		CO_2	N	$\text{CO}_2 \times \text{N}$
Pflanzenalter	Exsudierte			
[Tage]	Fraktionen			
24	7,4'-DHF	$F_{1,8}=7,1$ $P=0,0282$		
	Fraktion 2			
	Fraktion 4	$F_{1,8}=1,5$ $P=0,2584$		
	Fraktion 5	$F_{1,8}=7,2$ $P=0,0275$		
	Fraktion 6	$F_{1,8}=3,2$ $P=0,1120$		
26	7,4'-DHF	$F_{1,16}=0,03$ $P=0,8541$	$F_{1,16}=2,8$ $P=0,1150$	$F_{1,16}=0,1$ $P=0,7865$
	Fraktion 2	$F_{1,16}=0,5$ $P=0,5115$	$F_{1,16}=0,04$ $P=0,8399$	$F_{1,16}=1,2$ $P=0,2962$
	Fraktion 4	$F_{1,16}=1,6$ $P=0,2281$	$F_{1,16}=4,4$ $P=0,0520$	$F_{1,16}=0,4$ $P=0,5373$
	Fraktion 5	$F_{1,16}=1,5$ $P=0,2414$	$F_{1,16}=18,4$ $P=0,0006$	$F_{1,16}=0,3$ $P=0,6203$
	Fraktion 6	$F_{1,16}=0,6$ $P=0,4456$	$F_{1,16}=4,2$ $P=0,0567$	$F_{1,16}=0,2$ $P=0,6573$
28	7,4'-DHF	$F_{1,16}=0,1$ $P=0,7576$	$F_{1,16}=4,2$ $P=0,0580$	$F_{1,16}=1,3$ $P=0,2699$
	Fraktion 2	$F_{1,16}=6,8$ $P=0,0201$	$F_{1,16}=0,2$ $P=0,6635$	$F_{1,16}=0,001$ $P=0,9712$
	Fraktion 4	$F_{1,16}=1,0$ $P=0,3443$	$F_{1,16}=5,7$ $P=0,0310$	$F_{1,16}=0,4$ $P=0,5229$
	Fraktion 5	$F_{1,16}=0,5$ $P=0,4808$	$F_{1,16}=2,1$ $P=0,1675$	$F_{1,16}=0,3$ $P=0,5635$
	Fraktion 6	$F_{1,16}=0,6$ $P=0,4586$	$F_{1,16}=0,9$ $P=0,3600$	$F_{1,16}=0,4$ $P=0,5146$

		CO₂	N	CO₂× N
Pflanzenalter	Exsudierte			
[Tage]	Fraktionen			
30	7,4'-DHF	F _{1,16} =0,05 P=0,8269	F _{1,16} =3,8 P=0,0713	F _{1,16} =0,3 P=0,5850
	Fraktion 2	F _{1,16} =0,01 P=0,9208	F _{1,16} =29,6 P=0,0002	F _{1,16} =0,5 P=0,4818
	Fraktion 4	F _{1,16} =0,3 P=0,6220	F _{1,16} =0,6 P=0,4681	F _{1,16} =2,1 P=0,1722
	Fraktion 5			
	Fraktion 6	F _{1,16} =0,1 P=0,7541	F _{1,16} =0,1 P=0,7541	F _{1,16} =1,2 P=0,2867

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt und wörtliche oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Stuttgart, 03. April 2007

Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die vielfältige fachliche, technische und kameradschaftliche Unterstützung nicht möglich gewesen. Daher möchte ich allen herzlich danken, die mich während dieser Zeit begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. N. von Wirén, der nach dem überraschenden Ausscheiden von Prof. Dr. U. Hartwig bereitwillig die Betreuung meiner Doktorarbeit übernahm. Er hat den Fortgang meiner Arbeit mit großem Interesse begleitet, stand mit großem fachlichen Wissen und stetiger Diskussionsbereitschaft immer zur Seite.

Herrn Prof. Dr. M. Küppers möchte ich für die Übernahme des Koreferats danken, der es mir somit auch ermöglichte, an der Naturwissenschaftlichen Fakultät zu promovieren. Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. W. Claupein für die Möglichkeit weiterhin am Institut für Pflanzenbau und Grünland arbeiten zu können, für die Betreuung innerhalb des Graduiertenkollegs sowie für die finanzielle Unterstützung während meiner Promotion.

Mein Dank gilt ferner Herrn Prof. Dr. M. Sadowsky und Dr. G. Neumann, die mich mit ihrem umfangreichen Fachwissen und praktischen Erfahrungen maßgeblich während der letzten Jahre unterstützt haben.

Bei Herrn Dr. W. Armbruster möchte ich für die LC-MS-Analyse der Exsudatproben bedanken.

Ich danke Herrn Dr. U. Thumm, der immer ein offenes Ohr für die großen und kleinen Probleme eines Doktoranden hatte und immer behilflich zur Seite stand.

Ganz besonderes bedanken möchte ich mich bei Dagmar Mezger und Astrid Stadthaus sowie Frau Dachtler, Frau Ruckwied und Susanne Reiner, ohne deren perfekt organisierte Laborarbeit und Mithilfe ein reibungsloser Versuchsablauf sowie zahlreichen Analysen nicht möglich gewesen wäre.

Ein großer Dank gilt zudem Kathrin Deiglmayr und Angelika Kania, die das Manuskript kritisch Korrektur gelesen haben und mit ihren wissenschaftlichen Anregungen sowie stetig motivierenden Worte entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke meinen lieben Freunden und Kollegen Martin Erbs, Susan Haase, Marc Lamers, Angelika Häusermann, Brigitte Gassert, Silvia Kirchner, Bernhard Bauer, Olga Calvo, Claudia Weishaar, Anderson Meda, Lixing Yuan, Anne Bohner,

Bettina Tonn, ... für ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft, für gute Nerven und vor allem die nichtwissenschaftlichen Gespräche und Ablenkungen.

Meiner Familie möchte ich ganz herzlich für die vielfältige Unterstützung und das Verständnis danken, die sie mir während meiner Promotion zu Teil werden ließen. Meinem Vater danke ich speziell für das kritische Korrekturlesen und die Anregungen zu meiner Arbeit. Ein großer Dank gilt insbesondere meiner Mutter, die mich in den letzten Monaten immer wieder auf vielseitige Weise zu motivieren vermochte.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) sowie dem Hochschul- und Wissenschaftsprogramm (HWP) der Universität Hohenheim danke ich schließlich für die finanzielle Unterstützung meines Dissertationsprojektes.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Sara Lilly Stöber
geboren am 11.11.1974 in Marburg (Lahn)
ledig

Schulbildung

1981 – 1985 Grundschule Wigand-Gerstenberg-Schule, Frankenberg
1985 – 1994 Gymnasium Edertalschule, Frankenberg
Juni 1994 Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife an o.g. Schule

Hochschulausbildung

10/1994 – 10/2001 Studium an der Justus-Liebig-Universität, Giessen
1. Biologie und Geografie für das Lehramt an
Gymnasien
2. Geografie
Abschlüsse: 1. Staatsexamen, Diplom-Geografin
08/2000 – 01/2001 Staatsexamens-/Diplomarbeit in Geografie
Thema:
„Die Insel Teneriffa: Die vertikale Zonierung der Vegetation
unter Berücksichtigung von Klima, Geologie und Boden“

Berufstätigkeiten

Seit 03/2002 Promotion im Graduiertenkolleg „Klimarelevante Gase“,
Universität Hohenheim, Stuttgart
Thema:
„Einfluss von erhöhtem atmosphärischen CO₂ auf die N₂-
fixierende Symbiose von *Trifolium repens* L. und *Rhizobium*
leguminosarum biovar. *trifolii*“.
Seit 03/2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pflanzenbau
und Grünland, Institut für Pflanzenernährung, Universität
Hohenheim

Studentische und praktische Tätigkeiten

- 04/1999 – 07/2000 Studentische Hilfskraft am Botanischen Institut, Justus-Liebig-Universität Giessen
- 04/1999 – 02/2001 Studentische Hilfskraft am Institut für Pflanzenökologie, Justus-Liebig-Universität Giessen
- 08/1999 – 10/1999 Praktikum bei der Planungsgruppe für Natur und Umwelt (PGNU), Frankfurt
- 08/2000 – 09/2000 Studentische Hilfskraft am Institut für Grünlandwirtschaft und Futterbau, Justus-Liebig-Universität Giessen
- 07/2001 – 08/2001 Praktikum bei der Planungsgruppe für Natur und Landschaft, Hungen

Auslandsaufenthalte

- 06/2003 – 07/2003 Forschungsaufenthalt an der University of Minnesota (USA), „Institute of Soil, Water, and Climate“ bei Prof. Dr. Michael Sadowsky

Tagungen / Workshops

- 14.02/2003 Symposium „Klimawandel und Politik im Klimaschutz“, Universität Hohenheim, Stuttgart
Stöber, S., W. Claupein, M. Sadowsky & N. von Wirén:
„Einfluss von 10 Jahren Freiland-CO₂-Begasung auf die N₂-fixierende Symbiose zwischen *T. repens* und *R. l. bv. trifolii*“
- 24.07. – 27.07/2004 6th European Nitrogen Fixation Conference, Toulouse, Frankreich
Stöber, S., M. Sadowsky, G. Neumann & N. von Wirén:
„The impact of elevated atmospheric CO₂ on root exudation of signalling compounds in the Clover-*Rhizobium* symbiosis“
- 28.07/2004 Workshop: „Genomics of Nitrogen Fixation Organisms“, INRA, Frankreich
- 12.09. – 17.09/2004 International Rhizosphere Congress, München
Stöber, S., M. Sadowsky, G. Neumann & N. von Wirén:
„The impact of elevated atmospheric CO₂ on root exudation of signalling compounds in the Clover-*Rhizobium* symbiosis“
- 26.09. – 28.09/2006 Konferenz „Plant Nutrition meets Plant Breeding“, Universität Hohenheim, Stuttgart