

## **Beispielprotokoll**

Auf den nachfolgenden Seiten wird ein Beispielprotokoll aus der Biologie (Chemische Ökologie) gezeigt. Es ist mit Kommentaren versehen, die auf die wichtigsten Punkte eines Protokolls eingehen.

Name (Matrikelnummer)

Datum

**Kommentar [c1]:** Bitte immer angeben!

**Modul:**

## **Qualität von Pflanzen in Abhängigkeit von Umweltfaktoren: Gesamtproteinbestimmung**

### **Zusammenfassung**

Als Makronährstoff aller Organismen beeinflusst Stickstoff (N) in Form des Aminosäure-/Proteingehaltes pflanzlicher Organe maßgeblich Entwicklung und Wachstum pflanzenfressender Organismen (Herbivoren). Im vorliegenden Versuch wurden die Einflüsse verschiedener Umweltfaktoren sowie der Jahreszeit auf den Gesamtproteingehalt von Blättern der weitverbreiteten Wirtspflanze *Plantago lanceolata* (Spitzwegerich, Plantaginaceae) untersucht. Dazu wurden Blätter gemähter und ungemähter Pflanzen aus dem Freiland mit Blättern gewächshaus-kultivierter *P. lanceolata* verglichen. Hierbei waren die stark variablen Proteingehalte der Freilandproben signifikant höher als die der Proben der Gewächshauskultur. Die niedrigeren Proteingehalte gewächshauskultivierter *P. lanceolata*-Pflanzen werden unter Berücksichtigung eines potentiell geringeren Stresses durch Störung diskutiert. Unter naturnahen Bedingungen könnten auch Standorteinflüsse wie ein höherer UV-Anteil oder eine höhere N-Verfügbarkeit im Boden den Proteingehalt erklären. Das Fortschreiten der Jahreszeit hatte im Rahmen dieses Versuchs keinen dezimierenden Einfluss auf den Proteingehalt der Freilandpflanzen.

**Kommentar [c2]:**  
Eine Zusammenfassung der wesentlichen Inhalte des Protokolls (maximal 1/2 Seite).

**Kommentar [c3]:** Bei der zweiten Nennung darf der Gattungsname mit dem 1. Buchstaben abgekürzt werden

### **Einleitung**

Pflanzen benötigen für ihr Wachstum eine ausgewogene Menge verschiedener Nährstoffe. Man unterscheidet hierbei zwischen Hauptnährstoffen (Makronährstoffe) und Spurenelementen (Mikronährstoffe). Die Makronährstoffe werden von den Pflanzen in relativ großen Mengen benötigt. Zu diesen gehören Kohlenstoff, Sauerstoff und Wasserstoff als Hauptbestandteile pflanzlicher organischer Verbindungen. Stickstoff (N) ist ein weiterer essentieller Makronährstoff, dessen Verfügbarkeit im Boden das Wachstum, die Entwicklung und die Reproduktion der Pflanzen maßgeblich bestimmt (Marschner, 1995). Stickstoff ist zwar als Homodimer ( $N_2$ ) in hohen Mengen (78 %) in der Atmosphäre vorhanden, kann aber in dieser gasförmigen, kovalenten Form von Pflanzenwurzeln aufgenommen

**Kommentar [c4]:**  
Kurzer Überblick über die Thematik mit Zitieren der relevanten Literatur (vom Allgemeinen zum Speziellen und hin-führend zur Fragestellung).

**Kommentar [c5]:**  
Alle im Text zitierte Literatur erscheint in der Literaturliste. Bitte verwenden Sie ein einheitliches Format für alle Zitate.

werden zu können, müssen die N-Quellen erst zu Ammonium oder Nitrat umgewandelt werden. Einige u. a. im Boden lebende Bakterien können den molekularen Luftstickstoff fixieren und in Ammoniak umwandeln, welches dann zu Nitrat umgesetzt wird. Außerdem wird bei der mikrobiellen Zersetzung abgestorbener Biomasse N wieder in Form anorganischer Verbindungen freigesetzt (Campbell & Reece, 2009).

Stickstoff dient insbesondere als Baustein der Proteine, wird aber auch für die Synthese von Nukleinsäuren und anderer wichtiger organischer Moleküle benötigt. Er lässt sich durch verschiedene Methoden nachweisen, wobei man zwischen dem direkten Nachweis elementaren Gesamtstickstoffs und einem indirekten Nachweis eines Teils des Gesamtstickstoffs des Organismus in Form eines Proteinnachweises unterscheidet. Die in der Pflanze vorhandene Menge N ist ein universeller Indikator für die mineralische Versorgung und physiologische Fitness der Pflanze (Marschner, 1995) und gemessen am Aminosäureniveau speziell auch der Blattqualität für etwaige Konsumenten. Für herbivore Insekten ist daher neben kohlenstoffbasierten Stoffwechselprodukten insbesondere die Proteinmenge im konsumierten Pflanzengewebe ausschlaggebend für ihre Entwicklung und ihre Wachstumsgeschwindigkeit (Awmack & Leather, 2002). Insgesamt nimmt die Nährstoffqualität mit zunehmendem Entwicklungsstadium der Pflanze ab (Awmack & Leather, 2002). Aber auch durch Störung wie Mahd oder Herbivorie kann sich der N-Gehalt in den Blättern verändern (Quetier et al., 2007).

Im vorliegenden Versuch wurde der Proteingehalt der weit verbreiteten Art *Plantago lanceolata* (Spitzwegerich, Plantaginaceae) unter verschiedenen Kulturbedingungen im jahreszeitlichen Herbst untersucht. Dazu wurden die Proteingehalte der Blätter gemähter und ungemähter *P. lanceolata*-Pflanzen aus dem Freiland mit denen im Gewächshaus angezogener Pflanzen verglichen. In den gemähten Pflanzen wurde ein veränderter Proteingehalt gegenüber den ungemähten erwartet. Aufgrund der späten Jahreszeit zur Zeit des Versuches wurde weiterhin vermutet, dass bereits ein Großteil der Blattproteine von *P. lanceolata*-Pflanzen aus dem Freiland (gemäht und ungemäht) abgebaut waren. Demgegenüber sollte die Gesamtproteinmenge in den Pflanzen aus dem Gewächshaus höher sein, da diese unter konstanteren Bedingungen (Licht- und Temperaturregime, Nährstoffversorgung etc.) angezogen wurden und folglich keinem jahreszeitlichen Wechsel mit limitierenden Ressourcen ausgesetzt waren.

**Kommentar [c6]:**  
Bei drei und mehr Autoren wird im Allgemeinen nur der erste Autor geschrieben, die weiteren Autoren werden dann mit „et al.“ abgekürzt.

**Kommentar [c7]:**  
Kurze Beschreibung dessen, was untersucht wurde.

**Kommentar [c8]:** Erwähnen Sie am Ende der Einleitung in knappen Worten ihre Fragestellungen und Hypothesen zu erwarteten Ergebnissen.

## Material und Methoden

Zunächst wurden im Freiland Blätter gemähter und ungemähter *P. lanceolata*-Pflanzen gesammelt. Diese wurden ebenso wie Blattproben gewächshauskultivierter Pflanzen von *P. lanceolata* gefriergetrocknet. Anschließend wurden von jeder Probe ca. 100 mg in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß abgewogen und das genaue Trockengewicht notiert. Diese Proben wurden drei Minuten in einer Kugelmühle (Retsch, Haan, Deutschland) bei einer Frequenz von 24/s homogenisiert. Danach wurde das Blattmaterial dreimal mit je 400 µl Tris-EDTA-Puffer (200 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 5.5) extrahiert und zwischendurch jeweils fünf Minuten bei 13.200 rpm mit einer Mikrozentrifuge (Eppendorf 5415 R, Hamburg, Deutschland) abzentrifugiert. Der Aufschluss erfolgte auf Eis. Die Überstände wurden nach jeder Zentrifugation abpipetiert, in einem weiteren Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt und bis zur Proteinbestimmung auf Eis gelagert.

Die Proteinbestimmung erfolgte anhand der *Bradford*-Methode (Bradford, 1976). Hierbei wurde der Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue G-250* (*Bradford*-Reagenz, Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) zu den Proteinextrakten pipettiert und photometrisch gemessen. Der Farbstoff bindet an die Proteine, wodurch es zu einer Verschiebung (*Shift*) im Absorptionsspektrum des Farbstoffkomplexes von 465 zu 595 nm kommt. Die Quantifizierung der Proteinkonzentrationen in den Extrakten erfolgte anhand einer Eichreihe. Diese wurde aus einer Rinderserumalbumin-Stammlösung (1,4 mg BSA Fraktion V [Applichem, Deutschland]/ml Extraktionspuffer) in 8 Konzentrationsschritten erstellt. Die erste Konzentration stellte die Ausgangskonzentration der BSA-Stammlösung dar. Nach dem Prinzip der Verdünnungsreihe wurde die zweite Konzentration (0,7 mg/ml BSA-Lösung) durch Zusammenfügen von 60 µl BSA-Ausgangslösung und 60 µl Extraktionspuffer (50:50-Verdünnung) erreicht. Die folgenden Konzentrationen wurden jeweils durch Mischen von 60 µl der vorherigen Verdünnungsstufe mit 60 µl Extraktionspuffer erstellt. Die letzte Stufe (0 µg BSA) enthielt lediglich Extraktionspuffer. Je 20 µl der Eichreihe und der Proben sowie 20 µl einer 1:1 Verdünnung der Proben (10 µl der Probe und 10 µl Extraktionspuffer) wurden auf eine 96-Well-Multititerplatte (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) aufgetragen und mit 250 µl *Bradford*-Reagenz versetzt. Anschließend wurden noch etwaige Luftblasen mit einer Nadel zerstoßen. Von allen Proben sowie der Eichreihe erfolgte eine Doppelbestimmung. Dazu wurde die Platte dann fünf Minuten

**Kommentar [c9]:** Methoden werden in der Vergangenheit geschrieben. Eine verständliche und übersichtliche Darstellung der durchgeführten Experimente ist wichtig.

**Kommentar [c10]:** Bei Abschlussarbeiten:  
Hersteller der Chemikalien/ Materialien/ Geräte mit Herkunft anführen. (Bei Praktikumsprotokollen nicht unbedingt nötig)

im Photometer (Multiplate Reader Spectra MAX 340 PC, Molecular Devices Inc., Japan) bei 595 nm gemessen.

Die Daten der sechs PraktikumsteilnehmerInnen wurden gesammelt und zusammen ausgewertet. Hierbei wurden die ermittelten Proteingehalte mit dem Kruskal-Wallis-H-Test und anschließend mit dem Nemenyi-Test für multiple Vergleiche auf signifikante Unterschiede hin überprüft. Die Auswertung erfolgte mit R 2.11.1.

## Ergebnisse

Um zu untersuchen, ob die unterschiedlichen Behandlungen und Kulturbedingungen einen Einfluss auf den N-Status von *P. lanceolata* hatten, wurden die Proteingehalte der Blattproben bestimmt. Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Probengruppen von *P. lanceolata* lagen im Mittel zwischen 50 µg/ml und 430 µg/ml (Abb. 1) und unterschieden sich signifikant voneinander (Kruskal-Wallis-H-Test,  $H_{5, 5, 5} = 26,6$ ;  $p < 0,05$ ).

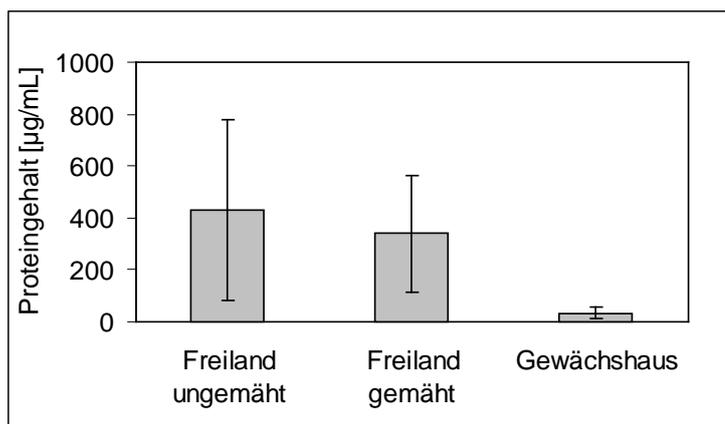


Abb. 1: Proteingehalt von Blättern gemähter (n=5), ungemähter (n=5) und im Gewächshaus angezogener (n=5) Pflanzen von *Plantago lanceolata*. Dargestellt ist der Mittelwert +/- Standardabweichung.

Ein multipler, paarweiser Vergleich ergab, dass sich der Proteingehalt zwischen den Freilandproben ungemähter und gemähter Pflanzen nicht signifikant unterschied (Nemenyi-Test,  $ND_{3, 5} = 8$ ,  $p \geq 0,05$ ). Allerdings war der Proteingehalt sowohl ungemähter (Nemenyi-Test,  $ND_{3, 5} = 44$ ,  $p < 0,05$ ) als auch gemähter Pflanzen (Nemenyi-Test,  $ND_{3, 5} = 36$ ,  $p < 0,05$ ) signifikant höher als der Proteingehalt von Pflanzen, die im Gewächshaus angezogen wurden.

**Kommentar [c11]:** Erwähnen Sie am Ende die verwendete Statistik und ggf. die benutzte Software.

**Kommentar [c12]:** Die im Versuch gewonnenen und für die Fragestellung wichtigen Resultate werden kurz beschrieben, also sachlich-neutral und wertfrei („Was? Wie? Wieviel?“). Das „Wieso? Weshalb? Warum?“ kommt in die Diskussion! Ergebnisse werden ebenfalls in der Vergangenheit verfasst.

**Kommentar [c13]:** Im Text auf die entsprechenden Tabellen und Abbildungen verweisen.

**Kommentar [c14]:** Die statistischen Tests nennen und dabei den berechneten kritischen Wert, den Stichprobenumfang und die Signifikanz mit angeben.

**Kommentar [c15]:** Tabellen mit Überschriften und Abbildungen mit Legenden (unter der Abbildung) helfen, wesentliche Daten übersichtlich zusammenzufassen, beispielsweise durch Darstellungen von Mittelwerten und Standardabweichungen (keine Rohdaten). Tabellenüberschriften und Abbildungsunterschriften müssen so verfasst sein, dass sie aus sich heraus weitestgehend verständlich sind.

## Diskussion

Die Ergebnisse konnten die anfangs aufgestellten Hypothesen nicht bestätigen, nach denen vermutet wurde, dass sich die Proteingehalte der Blätter gemähter und ungemähter *P. lanceolata*-Pflanzen unterscheiden und dass die Blätter der im Gewächshaus kultivierten Pflanzen insgesamt einen höheren Proteingehalt aufweisen als die Freilandpflanzen. Das Mähen hatte im vorliegenden Experiment keinen signifikanten Einfluss auf den Proteingehalt der Freilandpflanzen. Hierfür könnten unterschiedliche Gründe in Frage kommen. Zum einen ist nicht bekannt, wie lange die Beschädigungen der gemähten *P. lanceolata*-Pflanzen zum Zeitpunkt der Probenahmen zurücklagen. Potentielle anfängliche Unterschiede im Proteingehalt gemähter und ungemähter Pflanzen könnten so möglicherweise infolge einer sukzessiven Rückkehr auf ein gemeinsames Ausgangsniveau nicht mehr detektierbar gewesen sein. Da *P. lanceolata* keine proteinhaltigen, sondern kohlenstoffbasierte Abwehrstoffe synthetisiert (Bowers, 1991), könnte dies ebenfalls eine Erklärung für die ähnlich hohen Proteingehalte der unterschiedlich gestörten Freilandpflanzen sein. Stamp & Bowers (1994) konnten ebenfalls keine Unterschiede im N-Gehalt von fünf Wochen zuvor beschnittenen und unbeschnittenen Pflanzen nachweisen. Der N-Gehalt sollte mit dem Proteingehalt eng korreliert sein. Möglicherweise verhält sich *P. lanceolata* also anders als andere Pflanzenarten in Antwort auf Mahd (zu anderen Arten siehe Quetier et al., 2007).

In unseren Untersuchungen wurde bei *P. lanceolata* unter Gewächshausbedingungen eine signifikant geringere Proteinmenge in den Blättern als in Freilandpflanzen festgestellt. Die unterschiedliche Verfügbarkeit von Ressourcen wie z. B. eine geringere Stickstoffverfügbarkeit im Boden und ein Fehlen des ultravioletten Anteils der Sonneneinstrahlung im Gewächshaus könnten mögliche Ursachen für den geringeren Proteingehalt sein. Die Standortbedingungen haben demzufolge einen großen Einfluss auf den Proteingehalt. Zudem weisen die im Vergleich zu den Freilandproben geringen Standardabweichungen der im Gewächshaus angezogenen Pflanzen eher auf konstante Kulturbedingungen hin.

Insgesamt war die Stichprobenzahl mit jeweils  $n=5$  relativ gering und die Streuung der Messwerte insbesondere im Freiland sehr hoch. Möglicherweise müsste bei der Probenahme noch stärker auf das Sammeln von Blättern vergleichbaren Alters geachtet werden, da sich Proteingehalte in *P. lanceolata* in Abhängigkeit vom Blattalter

**Kommentar [c16]:** Zunächst sollen die zu diskutierenden Ergebnisse nochmals kurz beschrieben werden. Was wurde herausgefunden? Wurden die in der Einleitung erwähnten Hypothesen bestätigt?

**Kommentar [c17]:** Ist unser Ergebnis unerwartet oder gänzlich neu? Warum könnte das so sein? Sind derartige Befunde vielleicht schon bekannt? Was haben andere Untersuchungen zu dieser Thematik festgestellt? Wie verhält sich dieses Phänomen in anderen Organismen/ Systemen? Bestätigen oder widerlegen diese Untersuchungen die eigenen Befunde?

**Kommentar [c18]:** Was andere Untersuchungen zu dieser Thematik festgestellt haben, muss mit entsprechenden Literaturangaben belegt werden.

**Kommentar [c19]:** Was könnte man am Versuchsaufbau verbessern? Welche Experimente könnten sich anschließen oder wären zukünftig nötig, um die eigenen Resultate zu bestärken, verifizieren oder zu erweitern?

und damit vom Blattentwicklungsstatus stark unterscheiden können (Stamp & Bowers, 1994). Außerdem könnte die Störung jedes einzelnen Individuums im Freiland unterschiedlicher Intensität und/oder verschiedener Herkunft gewesen sein. **Unter** den gegebenen Bedingungen unseres Versuches weisen Freilandpflanzen höhere Proteingehalte auf als die Gewächspflanzen. Daraus lässt sich schließen, dass Standorteffekte einen maßgeblichen Einfluss auf den Gesamtproteingehalt von *P. lanceolata* ausüben.

**Kommentar [c20]:** Fassen Sie ihre Resultate abschließend in ein oder zwei Sätzen zusammen („Take home message“).

## **Literatur**

- Awmack, C.S., Leather, S.R., 2002.** Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annual Review of Entomology* 47, 817-844.
- Bradford, M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Bowers, M.D., 1991.** Iridoid glycosides. In: *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites*. G.A. Rosenthal & M.R. Berenbaum (eds). Academic Press, San Diego, USA, 297-325.
- Campbell, N.A., Reece, J.B., 2009.** *Biologie*. 8<sup>th</sup> ed., Pearson Studium, München, Germany.
- Marschner, P., 1995.** *Mineral nutrition of higher plants*. 2<sup>nd</sup> ed., Academic Press Inc., London, United Kingdom.
- Quetier, F., Thebault, A., Lavorel, S., 2007.** Plant traits in a state and transition framework as markers of ecosystem response to land-use change. *Ecological Monographs* 77, 33-52.
- Stamp, N.E., Bowers, D.E., 1994.** Effects of cages, plant age and mechanical clipping on plantain chemistry. *Oecologia* 99, 66-71.

**Kommentar [c21]:** Alle im Text zitierte Literatur erscheint in der Literaturliste. Bitte verwenden Sie ein einheitliches Format für alle Zitate.