

UNTERSUCHUNG DER GESCHWINDIGKEIT DER PRIMÄREN AMINOSÄURESYNTHESE BEI JUNGEN REISPFLANZEN

Von
F. ZSOLDOS

Pflanzenphysiologisches Institut der József Attila Universität, Szeged, Ungarn
(Eingegangen am 15. Febr 1965)

Einleitung

Es ist bekannt, dass das Wurzelsystem sowohl in der Nährstoffaufnahme als auch in der Synthese der organischen Substanzen eine grosse Rolle spielt (5). Die Nährstoffaufnahme der Wurzel, welche aus zahlreichen literarischen Angaben bekannt ist, ist ein sehr rascher Prozess (2, 3, 4). Die meisten solcher Untersuchungen wurden mit Isotopentechnik durchgeführt. Diese Methode ist infolge ihrer ausserordentlichen Empfindlichkeit zum Studium der Geschwindigkeit der Ionenaufnahme sehr geeignet. Wir haben nur sehr wenige Angaben über die Geschwindigkeit der Stickstoffaufnahme, obwohl dieses Element eine wichtige Rolle im Pflanzenstoffwechsel spielt. Man kann das vielleicht damit erklären, dass Nitrogen keine entsprechenden strahlenden Isotopen hat, welche zu biologischen Versuchen geeignet wären. Zur Durchführung feinerer Versuche stehen uns nur wesentlich kompliziertere und kostspieligere N^{15} stabile Isotopentechnik zur Verfügung.

Früher wurde mit Hilfe von schwerem Stickstoff die Geschwindigkeit der Aufnahme der verschiedenen N-Verbindungen an Reispflanzen eingehend studiert (3). Laut unserer Ergebnisse erfolgt die N-Aufnahme überraschend schnell. Aber einen bedeutenden Unterschied erfuhren wir zwischen der Aufnahme von NH_4 -N und NO_3 -N, worauf auch andere literarische Angaben weisen (7).

Die Aufnahme des NH_4^+ geht so rasch vor sich, dass man nach Verlauf von 3–4 Minuten mit Massenspektrometer das N^{15} stabile Isotopen in der Wurzel gut registrieren kann. Demgegenüber kann man die Aufnahme der NO_3 -Ionen nur in wesentlich längerer Zeit feststellen.

Die Ergebnisse, die wir bei einer Reihe von Versuchen der Stickstoffaufnahme bekommen haben, unsere Aufmerksamkeit auf die Untersuchung der Frage des N-Einbaues gelenkt. Laut literarischer Angaben haben wir angenommen, dass auch dieser Ablauf ebenso rasch vor sich geht, wie die Ionenaufnahme (1, 2, 4). Da der Einbau des Nitrogens auf dem Wege der Aminierung von organischen Säuren zustande kommt (10), beobachten wir deshalb die Veränderung der primären Produkte in den Wurzeln.

Material und Methode

Zu unseren Untersuchungen verwendeten wir 2 Wochen alte Reispflanzen, welche im Glaushaus mit Wasserkultur gezogen wurden. Die Nährlösung bestand aus folgendem: $7,5 \times 10^{-4}$ Mol $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, $3,75 \times 10^{-4}$ Mol KH_2PO_4 , 5×10^{-4} Mol $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ Mol, 5×10^{-5} Mol FeEDTA und 1×10^{-5} Mol $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$.

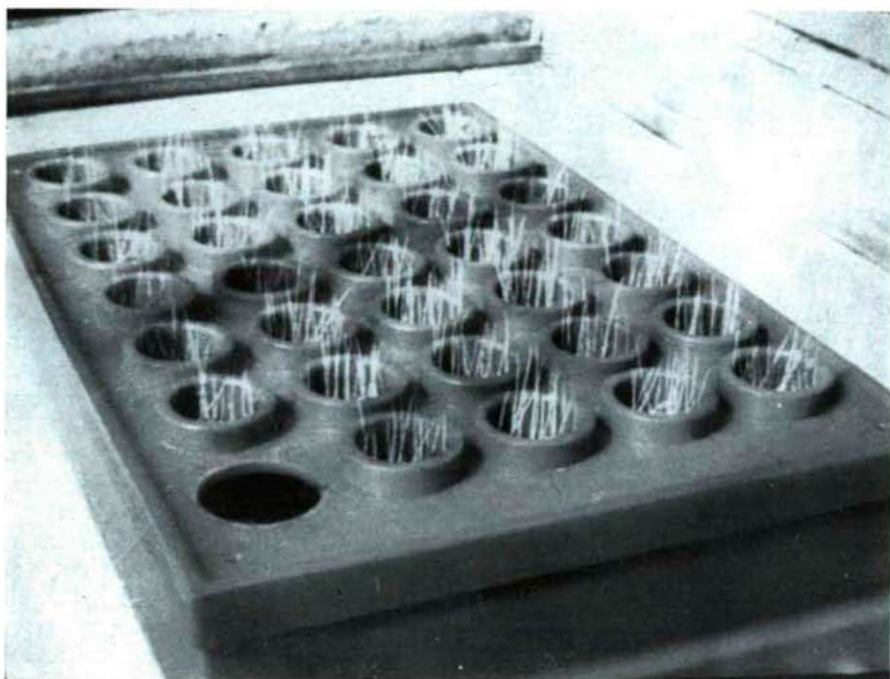


Abb. 1. Plastikgeschirr zu Wasserkultur—Experimenten.

Zur Pflanzenzüchtung bedienen wir uns eines speziell für diesen Zweck hergestellten Plastikgeschirrs (Abb. 1). Diese Pflanzenzüchtungsmethode ist besonders für Ionenaufnahme Untersuchungen gut geeignet. Die Pflanzen, die in einer solchen Nährlösung bzw. in einem Plastikgeschirr gezogen wurden, können wir unversehrt und sehr rasch in solche Versuchsbedingungen unterbringen, die unseren Experiment am besten entsprechen.

In den Plastikring, dessen unterer Teil ein rostfreies Stahlnetz ist, legen wir 50 Stücke vorgekeimte Reiskörner (Abb. 2). Unter solchen Umständen wuchsen unsere Pflanzen schön und erwiesen sich zu unseren Versuchen ausgezeichnet (Abb. 3.).

Als Nitrogenquelle in der Zeit unseres Versuches wurde teils $\text{NH}_4\text{-N}$, teils $\text{NO}_3\text{-N}$ verwendet. Das pH der Nährlösung war während der Ionenaufnahme 6,0 und die Temperatur schwankte zwischen 20–22 C°.

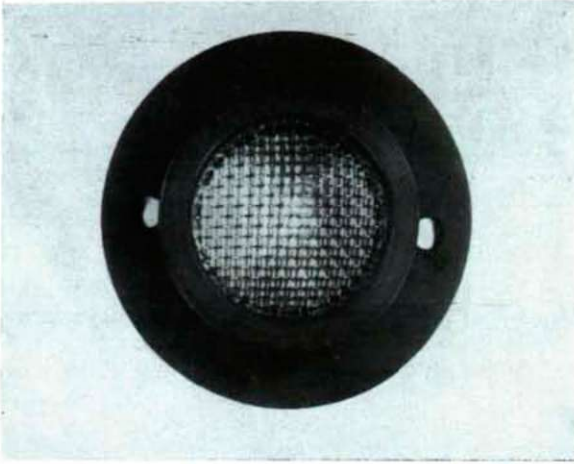


Abb. 2. Plastikring mit rostfreiem Stahlnetz.

Wir haben zur Auswertung der Aminosäuren die Papierchromatographische Methode angewendet. Die Methode wurde in einer früheren Arbeit schon ausführlich dargelegt, so sehen wir von einer Wiederholung ab (8).

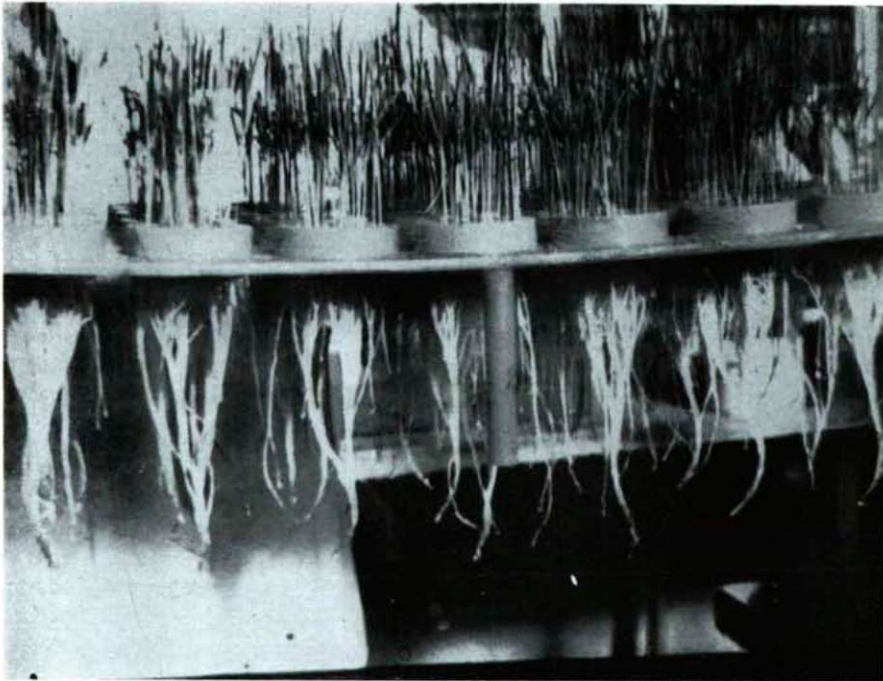


Abb. 3. 14 Tage alte Reispflanzen, in Wasserkultur gezogen.

Nachdem sich die oben beschriebenen Pflanzenzuchtmethoden sehr gut bewährt haben, ermöglichte es diese Methode, dass wir bei der Bearbeitung des Versuchsmaterials von der Bestimmung des Frisch- oder Trockengewichts absehen konnten. Zur Orientierung aber haben wir das Gewicht der einzelnen Pflanzenorgane bestimmt.

Versuchsergebnisse

Die Versuchspflanzen wurden in eine Lösung von 10^{-4} Mol $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 gestellt und nach Ablauf von 15, 30, 60 und 120 Minuten untersuchten wir in den verschiedenen Pflanzenorganen die Veränderung der freien Aminosäuren. Mit dieser Methode wurde also von dem organischen Einbau des Stickstoffs eine Zeitkurve aufgenommen. Die Ergebnisse zeigen die nachfolgenden Papierchromatogramme.

Die Abbildung 4. zeigt gut, dass wir einer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Lösung schon nach 15 Minuten die Vergrößerung der sogenannten Komplexflecke (Asparaginsäure und Glutamin) feststellen können. Jedoch bei anderen Aminosäuren ist keine wesentliche Veränderung eingetreten. Auch bei den späteren Zeitpunkten (nach 30, 60 und 120 Minuten) konnten wir nur bei den obenerwähnten Ami-

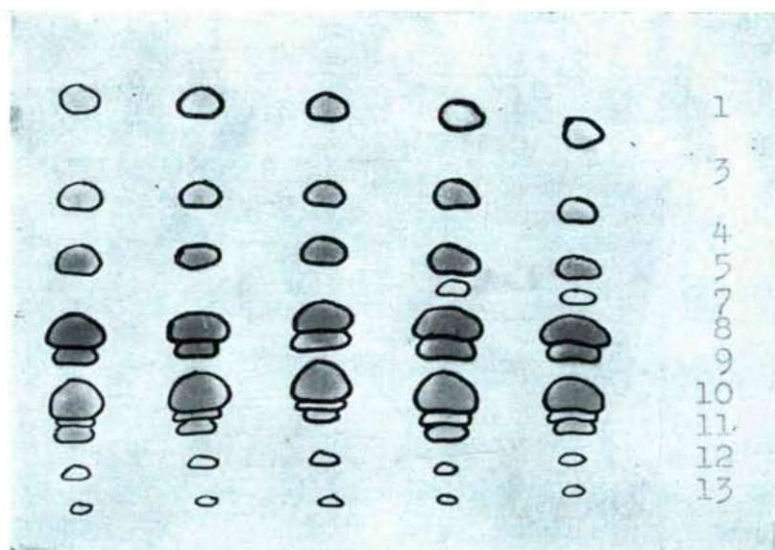


Abb. 4. Die Veränderung der freien Aminosäuren bei Reispflanzen, die mit NH_4 -Nitrogen ernährt wurden. (Von links nach rechts: Kontrolle, nach 15, 30, 60 und 120 Minuten).

- | | |
|--------------------------------|-------------------------------|
| 1 = Leucin | 8 = Glutaminsäure |
| 2 = Phenylalanin | 9 = Asparaginsäure + glutamin |
| 3 = Valin | 10 = Asparagin |
| 4 = γ -Aminobuttersäure | 11 = Histidin + Arginin |
| 5 = Tyrosin | 12 = Lysin + Ornithin (?) |
| 6 = Prolin + Unbekannt | 13 = Cyste(in) |
| 7 = Alanin | |

nosäuren sichtbare wesentlichere Veränderungen erfahren. Das Pflanzenmaterial wurde mit HCl hidrolisiert und zeigte, dass die Veränderung des Komplexfleckes von Glutamin stammt.

Wenn wir die Reispflanzen mit NO_3 -Nitrogen ernähren, dann erfahren wir einen bedeutenden Unterschied in der Geschwindigkeit des N-Einbaues. Bei Abbildung 5. können wir sehr gut feststellen, dass keine wesentliche Änderung nach 120 Minuten bei den freien Aminosäuren eingetreten ist. Dieses Ergebniss steht auch in Übereinstimmung mit den anderen Ionenaufnahme-Untersuchungen, wo keine wesentliche Nährstoffaufnahme in so kurzer Zeit zu beobachten war (3, 7).

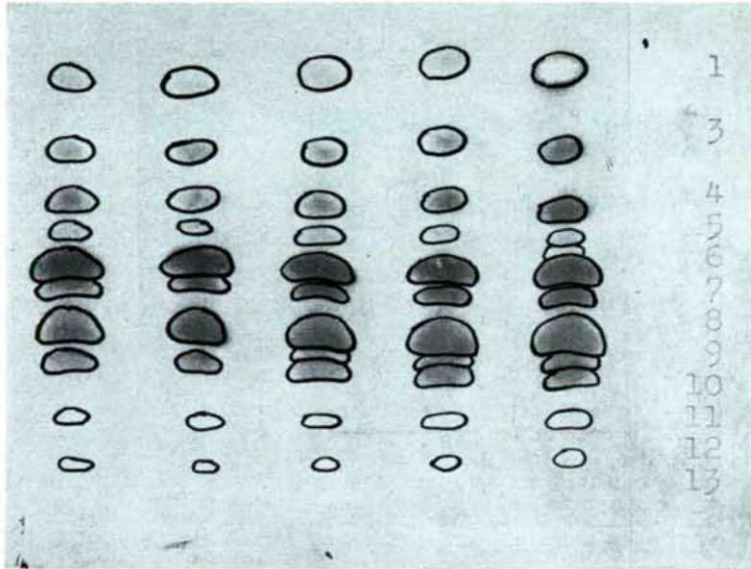


Abb. 5. Die Veränderung der freien Aminosäuren bei Reispflanzen, die mit NO_3 -Nitrogen ernährt wurden. (Von links nach rechts: Kontrolle, nach 15, 30, 60 und 120 Minuten).

Nach den Untersuchungen der freien Aminosäuren, welche im Spross zu finden sind, konnte der Transport der organischen (oder anorganischen) N-Verbindungen aus der Wurzel bei kurzfristigem Experiment nicht zustande kommen (Abb. 6).

Diskussion

Nach den Ergebnissen unserer Experiment bei jungen Reispflanzen — bei den von uns untersuchten Bedingungen — findet der N-Assimilation sehr schnell statt. Da man eintretende bedeutende Veränderung unter den freien Aminosäuren in erster Linie bei Glutamin erfahren kann, ist es anzunehmen, dass mit deren Hilfe die Synthese von primären Aminosäuren zustande kommt.

Nach der allgemeinen Auffassung spielen in der Synthese der Aminosäuren die Asparaginsäure, Glutaminsäure und Alanin die Hauptrolle. Laut der

meisten literatischen Angaben spielt die Glutaminsäure bei dieser Synthese die Hauptrolle (6, 9). Auch bei Gerstenkeimlingen fanden Cocking und Yemm, dass der N-Einbau mit Hilfe der Glutaminsäure stattfindet (2).

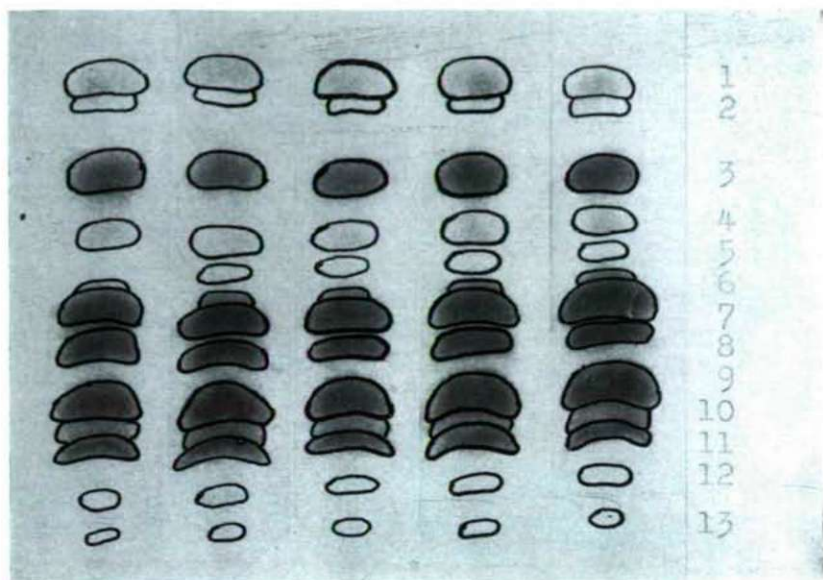


Abb. 6. Die freien Aminosäuren des Sprosses nach kurzfristigen Experimenten.

Bei unseren früheren Experimenten konnten wir noch nicht feststellen, ob die Glutamin in der Synthese der primären Aminosäuren eine wichtige Rolle gespielt hätte (11). Unsere jetzigen Ergebnisse können wir damit erklären, dass in den lichtarmen Wintermonaten gewisse N-Wechsel Veränderungen eintreten können. Auf die wichtige Rolle der äusseren Umstände verweisen auch die Untersuchungen von Naylor und Tobler, die feststellten, dass die Veränderung von Licht- oder Oxigenverhältnissen den Stoffwechsel von Glutaminsäure stark beeinflussten (8).

Auf die wichtige Rolle der äusseren Faktoren weisen weiter auch unsere Beobachtungen von der Veränderung des Alanins hin. In den Reispflanzen ist in den Wintermonaten nur ein schwacher Fleck von Alanin nachweisbar (Abb. 7). Am sonst findet sich allgemein das Alanin in bedeutender Menge vor (11). Unsere Meinung nach spielt das Alanin bei normalen Lichtverhältnissen sowohl in der primären Aminosäuresynthese, als auch in der N-Reserve eine sehr wichtige Rolle (12).

Das derzeitige niedrige Alanin-Niveau kann man wahrscheinlich mit den Lichtverhältnissen bzw. der ungünstigen Veränderungen der Photosynthese erklären. Unsere Vorstellungen stützen sich auch auf die literatische Angaben, nach welchen die Synthese der organischen N-Verbindungen im Wurzelsystem mit der Photosynthese zusammenhängt, die den Transport der N-freien Kohlenverbindungen aus den Blättern in die Wurzel regelt (4, 8).

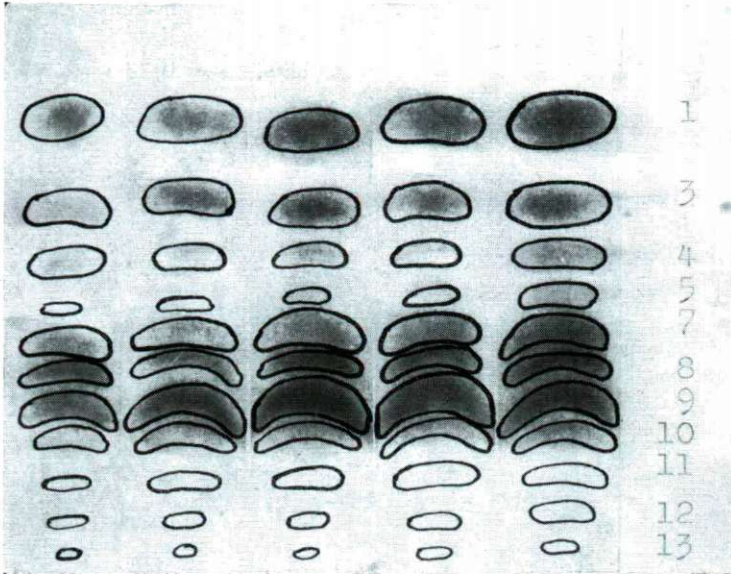


Abb. 7. Die Veränderung der freien Aminosäuren bei Reispflanzen, die in lichtarmen Wintermonaten gezüchtet wurden. (Von links nach rechts: Kontrolle, noch 15, 30, 60 und 120 Minuten).

Unsere Ergebnisse waren auch vom methodischen Standpunkt aus für uns sehr wichtig. Nämlich ohne Verwendung von N^{15} Isotopen bei kurzfristigen Versuchen ist es manchmal schwer zu entscheiden, was die Veränderung der Aminosäure hervorgerufen hat, die wir durch das Chromatogramm erfahren haben. In unseren Ergebnissen, die wir mit NO_3 bzw. NH_3 bekommen haben, sehen wir den Beweis, dass die Veränderung der freien Aminosäuren in so kurzer Zeit, wirklich die Aufnahme und der Einbau des Nitrogens hervorgerufen hat.

Zusammenfassung

Mit Hilfe von Wasserkulturversuchen haben wir festgestellt, dass die NH_4 -Nitrogen Aufnahme bzw. der Einbau von organischen Verbindungen ein sehr rascher Prozess ist. Bei Ernährung mit NH_4 -Stickstoff kann man schon nach 15 Minuten die eintretende Veränderung der freien Aminosäuren bestimmen. Bei NO_3 -Nitrogen Ernährung ist bei kurzfristigen Experimenten keine wesentliche Aminosäureveränderung zu erfahren. Auch im Spross waren keine Aminosäureveränderungen. An jungen Reispflanzen konnte man bei einem 120 Minuten dauernden Versuch nur bei Glutamin eine wesentliche Veränderung feststellen. Auf Grund dessen ist anzunehmen — bei den von uns untersuchten Bedingungen — dass die Glutamin in der Synthese der primären Aminosäure eine Hauptrolle spielt.

Literatur

1. AUSTIN, A.: Synthesis of amino acids and amides by nitrogenstarved wheat seedlings supplied with ammonium sulphate. *J. Ind. Bot. Sci.* 38. 76—83. 1959.
2. COCKING, E. C.—YEMM, E. W.: Synthesis of amino acids and proteins in barley seedlings. *New Phytologist*. 60. 103—116. 1961.
3. FRIED, M.—ZSOLDOS, F.—VOSE, P. B.—SHATOKIN, I. L.: Characterizing the NO_3 and NH_4 uptake process of rice roots by use of N^{15} labelled NH_4NO_3 . *Physiol. Plantarum. Physiol. Plant.* 18. 313—320. 1965.
4. KRETOVICS, V. L.—EVSTIGNEEVA, Z. G.: Die Assimilation des markierten Ammoniums durch das Wurzelsystem aus dem Boden. (In Russisch). *Biochemie, Moskau*. 25. 476—481. 1958.
5. KURSANOV, A. L.: The root system as an organ of metabolism. *Radioisotopes in scientific research*. London, Pergamon Press. 4. 494—509. 1958.
6. LOMIS, W. D.: The synthesis of amino acids in plants. *Handbuch der Pflanzenphysiologie VIII*. Berlin—Göttingen—Heidelberg, Springer Verlag. 224—248. 1958.
7. LYCKLAMA, J. C.: The absorption of ammonium and nitrate by perennial rye-grass. *Acta Bot. Neerlandica*. 12. 361—423. 1963.
8. NAYLOR, A. W.—TOLBERT, N. E.: Glutamic acid metabolism in green and etiolated barley leaves. *Physiol. Plantarum*. 9. 220—229. 1956.
9. STEWARD, F. C.—BIDWEL, R. G. S.—YEMM, E. W.: Nitrogen metabolism, respiration and growth of cultured plant tissue III. *J. Exp. Bot.* 9. 11—51. 1958.
10. WEBSTER, G. C.: Nitrogen metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 6. 43—70. 1955.
11. ZSOLDOS, F.: Changes of free amino acids in rice seedlings due to the effect of factors rendering them susceptible of the browning disease. *Acta Biol. Szeged*. 5. 71—76. 1959.
12. ZSOLDOS, F.—ZSOLT, J.: Synthesis of amino acids in the roots of rice plants. *Current Sci.* 31. 422—423. 1962.