

DAS PROLIN, DIE DEM WASSERMANGEL DER PFLANZEN ANZEIGENDE AMINOSÄURE

G. PÁLFI

Pflanzenphysiologisches und Mikrobiologisches Institut der Attila József Universität, Szeged

(Eingegangen am 2. November 1968)

Einleitung

Im Spektrum der freien Aminosäuren der Pflanzen sind auf den Einfluss der Veränderung der ökologischen Faktoren grosse Abweichungen zu verzeichnen. Diese Abweichungen manifestieren sich hauptsächlich im quantitativen Verhältnis der Aminosäuren zueinander: einzelne sind in grösseren, und andere in kleineren Mengen nachweisbar. Die Gesamt-Aminosäurenmenge weist dabei oft Differenzen von 100—300 % auf (Pálfi, 1965; 1968a). Die qualitativen Unterschiede kommen meistens in der Anwesenheit oder dem Fehlen der Amide, insbesondere des Asparagins zum Ausdruck. Aus dem Vorhandensein der Amide kann aber nicht mit Sicherheit auf den physiologischen Zustand der Pflanzen geschlossen werden. Die Amide gelangen nämlich nicht nur im Falle einer guten Nährmittelversorgung bzw. reicher Stickstoffzufuhr, sondern auch infolge ungünstiger Bedingungen der Eiweissynthese (Phosphormangel, hohe oder niedrige Temperaturen, Lichtmangel, hoher Salzgehalt des Bodens, pflanzliche Krankheiten usw.) zur Anreicherung. In den vorliegenden Untersuchungen wird im Aminosäurespektrum einiger Pflanzen nach einem Indikator gesucht, der typisch bei Wassermangel der Pflanzen in Erscheinung tritt.

Material und Methode

Die Extraktion der bei 65° C fixierten und ausgetrockneten Blätter erfolgte nach Zerreiben mit Quarzsand mit 50 %-igem Ethanol. Nach dem Zentrifugieren wurden die Extrakte mit ansteigender ein- und zweidimensionaler Papier- bzw. Dünnschichtchromatographie entwickelt. Solvens war ein Gemisch von Butanol-Eisessig-Wasser (2:1:1) bzw. Phenol-Wasser (4:1). Zur Identifizierung dienten ausser den Rf-Werten Gemische bekannter Aminosäuren. Die Methode wurde von Szalai (1957) und Hartmann (1965) eingehend beschrieben. Bei quantitativen Bestimmungen wurde die mit Ninhydrin entwickelten und mit Kupfersalz fixierten Flecke eluiert und spektrophotometrisch ausgewertet. Im Falle des Prolins wurde der blaue Fleck der Isatinreaktion eluiert.

Ergebnisse

Zunächst wurden die Aminosäuren des in Kulturgefäßen gezüchteten Weizens (Besostaja 1) studiert. Aus Abbildung 1 geht hervor, dass von den Aminosäuren bei Wassermangel das Prolin die grössten quantitativen Veränderungen aufweist. In den der Trockenheit ausgesetzten Varianten war bereits einen Tag nach Weglassen der eintägigen Wasserdosis der Prolingehalt auf ein Mehrfaches des in den begossenen Kontroll-Varianten registrierten gestiegen. Diesen hohen Prolingehalt behielten die nicht begossenen Varianten bis zum Austrocknen bei. Es ist auch feststellbar, dass die Gesamtmenge der freien Aminosäuren auf die Wirkung des Wasserentzuges erhöht war.

Nun wurde das Aminosäuren-Spektrum der an Wassermangel leidenden *Solanum laciniatum* Ait., Paprika (*Capicum annum* L.) und Weizen- (Besostaja 1) Pflanzen mit den normal mit Wasser versorgten Varianten vergleichend untersucht. An Abbildung 2 ist ersichtlich, dass bei Wassermangel das Prolinniveau bei allen drei Pflanzenarten wesentlich erhöht war. Die Trockenheit hatte den Prolingehalt bei *Solanum laciniatum* auf das Sechsfache, beim Paprika auf das Fünffache und bei Weizen auf das Vierfache des bei den begossenen Kontrollen ansteigen lassen.

Es wurde auch untersucht, welche wesentlicheren Veränderungen im Aminosäurenspektrum der von den Trieben isolierten Blätter der drei Pflanzen zustandekommen, wobei sich zeigte, dass auch in der Aminosäurezusammensetzung der isolierten, anwelkenden Blätter der hohe Anstieg des Prolingehaltes den Hauptcharakterzug darstellt.

Abbildung 3 zeigt einerseits die Aminosäurezusammensetzung bei den unmittelbar nach dem Abschneiden, und andererseits bei den 1, 3, 5, 9 bzw. 15 Tage nach dem Abschneiden fixierten, gewelkten *Solanum laciniatum*-Blättern. Wie ersichtlich, war die Prolinmenge während des fünftägigen Welkens (auf das Fünffache der Kontrollwerte) gestiegen, um dann 15 Tage fast unverändert zu bleiben. In gleichem Sinne war auch der Gesamt-Aminosäurespiegel verändert, und zwar in typischer Weise der Asparagingehalt. Die Zusammensetzung der Aminosäuren in den abgeschnittenen, welkenden Blättern erinnert stark an die bei infizierten, kranken Pflanzen (Engelbrecht, 1961; Pálfi, 1964), unterscheidet sich aber davon durch ihre aussergewöhnlich hohe Prolinkonzentration.

Bei Weizen und Gerste ist bereits auch von anderen festgestellt worden, dass bei Wassermangel hohe Prolinkonzentrationen zu verzeichnen sind Coic et al., 1963; Küdrew und Tjankowa, 1966; Barnett und Nayrol, 1966). Aus den Befunden dieser Autoren und unseren eigenen Beobachtungen folgt, dass der primäre schädigende Faktor, der an den Blättern auftritt, der Wassermangel ist.

Singh et al. (1960) wies nach, dass das meiste Prolin in den alten, absterbenden Blättern zu finden ist; die Prolinanreicherung deutet demnach auf eine Degradation hin. Isotopen-Versuche mit C^{14} (Barnett

und Naylor, 1966) haben gezeigt, dass die Transformation des Prolins bei Wassermangel verzögert ist, seine Synthese aus Glutaminsäure aber unverändert weiterläuft. Wahrscheinlich fungiert das Prolin im Falle von Wassermangel als Reserve-C-N-Quelle.

Unsere Eiweisshydrolysen-Versuche ergaben, dass das viele freie Prolin nicht unmittelbar von Eiweissen abstammt, denn die Zusammensetzung der Eiweisse in den abgeschnittenen, welken Blättern stimmt auch hinsichtlich des Prolins vollkommen mit dem Aminosäurenspektrum der sofort nach dem Abschneiden fixierten Blätter überein. Somit ist das Prolin der welkenden Blätter *de novo* entstanden. An Hand der Untersuchungen an drei verschiedenen Pflanzenarten konnten wir nachweisen, dass im Falle von Wassermangel unter den freien Aminosäuren der Blätter das Prolin dominiert. Hieraus folgt, dass bei den untersuchten Pflanzen der Prolingehalt hinsichtlich der Wasserversorgung als Indikator des physiologischen Zustandes der Pflanzen dienen kann.

Ein grosser Salzgehalt des Giesswassers oder des Bodens kann bei den Pflanzen auch einen Wassermangel verursachen. Wir haben in Kulturgefässen Mais-, Sonnenblumen- und Erbsenpflanzen gezogen und im Alter von 30 Tagen einzig (Varianten) davon 10 Tage lang mit einer stark salzhaltigen Wasser-Lösung (2 % Gesamtsalzgehalt aus Na_2SO_4 , NaCl , KCl , CaCl_2 , MgSO_4 und MgCl_2) begossen. Bei anderen Varianten wurde durch verringertes Begiessen ein Wassermangel herbeigeführt, während die Kontrollpflanzen auch weiterhin optimal begossen wurden.

Abbildung 4 zeigt ein mit Isatin entwickeltes Chromatogramm, an dem die grossen, dunkelblauen Prolinflecke aufscheinen. Es zeigt sich, dass auch das salzige Giesswasser einen starken Wasserdefizit hervorrief, ist doch der Prolingehalt auch hier ausserordentlich gestiegen, ebenso wie bei der wenig begossenen Variante. Bei den optimal begossenen Kontrollen erschien Prolin nur in Spuren.

Bei insgesamt acht gezüchteten Pflanzenarten haben wir den Einfluss des Wassermangels auf die Zusammensetzung der freien Aminosäuren studiert. Abbildung 5 veranschaulicht einige davon. Die grössten und intensivsten Flecke im Chromatogramm zeigt das Prolin. Das Chromatogramm lässt auch feststellen, dass der Wassermangel einen Anstieg des Prolins auf das 20—50-fache veranlassen kann. Diese Erscheinung äusserte sich in sämtlichen Entwicklungsphasen der untersuchten Pflanzen.

Wie aus Abb. 1, 2, 4 und 5 ersichtlich, erschien bei Weizen-, Erbsen- und Tabakpflanzen auf die Wirkung des Wasserdefizits auch die Pipecolinsäure. Wir teilten bereits mit (Pálfi, 1968a; Pálfi und Dézsi, 1968), dass die Pipecolinsäure der Indikator des geschwächten physiologischen Zustandes ist und auch (Stewart et al., 1966; Pálfi, 1968b; 1968c), dass die infolge des Wasserdefizits entstandenen grossen Prolinmengen nicht Ergebnis einer Eiweisszersetzung sind, sondern durch Aminierung von Kohlenhydraten entstehen.

Zusammenfassung

Es wird festgestellt, dass der Wassermangel der Pflanzen durch eine hochgradige Vermehrung des Prolins angezeigt ist. Der abnormal grosse Prolingehalt der Blätter tritt auch bei einem hohen Salzgehalt des Giesswassers bzw. des Bodens auf. Die Prolinvermehrung zeigt ausserdem empfindlich auch das Wasserdefizit der von den Trieben isolierten, welkenden Blätter an.

Bei denselben Pflanzen nimmt proportional dem steigenden Wassermangel die Prolinmenge zu, mit dem Aufhören des Wasserdefizits geht auch die hohe Prolinkonzentration auf das normale Niveau zurück, allerdings erst 6—7 Tage nach Beginn der optimalen Wasserversorgung.

Die durch den Wassermangel bedingte Störung der Eiweiss-synthese zeigt unter den freien Aminosäuren fallweise auch das Erscheinen der Pípecolinsäure an.

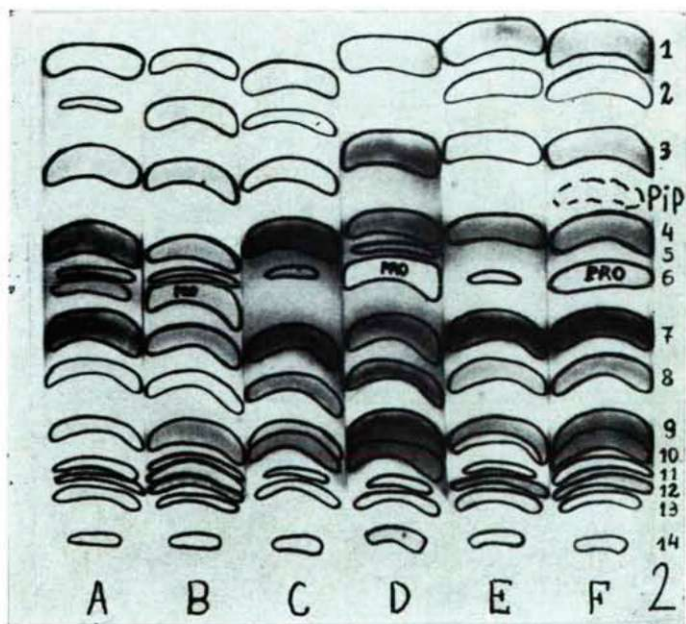
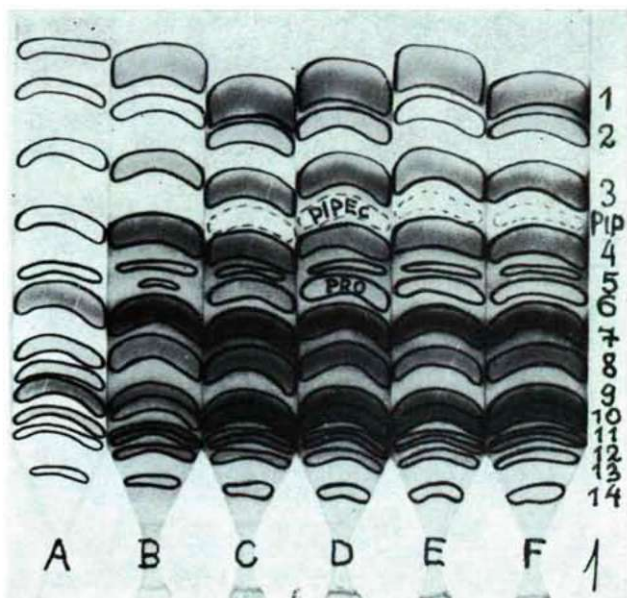
Literatur

- Barnett, N. M. — Naylor, A. W. (1966): Amino acid and protein metabolism in Bermuda grass during Water stress. — *Plant Physiol.* 41, 1222—1230.
- Coic, Y. — Fauconneau, G. — Pion, G. — Busson, F. — Lesaint, Ch. — Labonne, F. (1963): Influence de l'alimentation minérale sur la composition des protides des graines de céréales. — *Ann. physiol. végét.* 5, 281—292.
- Engelbrecht, L. (1961): Beiträge zum Problem der Akkumulation von Aminosäuren in Blattzellen. — *Flora* 150, 73—86.
- Hartmann, T. (1965): Über das zeitliche Auftreten flüchtiger Amine und freier Aminosäuren in wachsenden, saprophytischen Kulturen von *Claviceps purpurea*. — *Planta (Berlin)* 66, 27—43.
- Küdreu, T. G. — Tjankowa, L. A. (1966): Wlijanie IUK i2,4-D na sodernisanie swobodnych aminokislot psenicü posle wosdejstwija kratkowremennoj sasuchi. — *Fisiol. Rastenij.* 13, 988—995.
- Pálfi, G. (1964): Eine neue, ninhydrin- und isatinpositive, aminosäureähnliche Verbindung aus Reisblättern, die das Mass der Stickstoffversorgung anzeigt. — *Naturwissenschaften* 51, 489.
- Pálfi, G. (1965): Relations between abundant N-supply and the amino acid concentration of various leaf levels of rice plants. — *Plant and Soil* 23, 275—284.
- Pálfi, G. (1968a): Relationship between the pípecolic acid content of the leaves and the physiological condition of the rice plant. — *Il Riso.* 17, 13—22.
- Pálfi, G. (1968b): Die Wirkung von Kinetin, 2,4-DNP und Antimetaboliten auf die Veränderungen im Aminosäuregehalt welkender Pflanzenblätter. — *Planta (Berlin)* 78, 196—199.
- Pálfi, G. (1968c): Changes in the amino acid content of detached wilting leaves of *Solanum laciniatum* Ait. in the light and in the dark. — *Acta Agronomica Acad. Sci. Hung.* 17, 381—388.
- Pálfi, G. — Dézsi, L. (1968): Pípecolic acid as an indicator of abnormal protein metabolism in diseased plants. — *Plant and Soil* 29, 1—7.
- Singh, M. — Kumasawa, K. — Mitsui, S. (1960): Asparagine test in relation with the nitrogen nutritional status of crop plants. V. Rice. — *Soil and Plant Food.* 6, 86—90.
- Stewart, C. R. — Morris, C. J. — Thompson, J. F. (1966): Changes in amino acid content of excised leaves during incubation. II Role of sugar in the accumulation of proline in wilted leaves. — *Plant Physiol.* 41, 1585—1596.
- Szalai, I. (1957): Photometrische Bestimmung des Gesamtaminosäurespiegels im Kartoffelsaft mittels der Ninhydrinreaktion. — *Acta Biol. Szeged.* 3, 33—40.

Address of the author:

Dr. G. Pálfi
 Pflanzenphysiologisches und Mikrobiologisches
 Institut der A. J. Universität, Szeged, Ungarn

- Abb. 1. Freie Aminosäuren der Blätter von mit Wasser versorgten und an Wassermangel leidenden Weizenpflanzen. A=Gemisch bekannter Aminosäuren B=Begossene Weizenpflanzen C,D,E,F=1, 2, 3 bzw. 4 Tage nicht begossene Weizenpflanzen. 1=Leu; 2=Phe; 3=Val+Met; Pip=Pipecolinsäure; 4= γ -Amb; 5=Tyr; 6=Pro; 7=Ala; 8=Glu+Thr; 9=Ser+Gly; 10=Glu-NH₂+Asp; 11=Asp-NH₂; 12=Arg; 13=Lys; 14=Cys.
- Abb. 2. Freie Aminosäuren der Blätter von mit Wasser versorgten und an Wassermangel leidenden Pflanzen. A=*Solanum laciniatum*, begossen; B=*Solanum laciniatum*, mit Wassermangel; C=Paprika, begossen; D=Paprika, mit Wassermangel; E=Weizen, begossen; F=Weizen, mit Wassermangel; 1-14= wie in Abbildung 1; Pip=Pipecolinsäure.
- Abb. 3. Freie Aminosäuren der unmittelbar nach dem Abschneiden fixierten und der nicht sofort fixierten, welkenden *Solanum laciniatum*-Blätter. A= gleich nach dem Abschneiden fixiert; B=1 Tage nach dem Abschneiden fixiert, welkend; C=3 Tage nach dem Abschneiden fixiert, welkend; D=5 Tage nach dem Abschneiden fixiert, welkend; E=9 Tage nach dem Abschneiden fixiert, welkend; F=15 Tage nach dem Abschneiden fixiert, welkend; 1-14=wie in Abbildung 1.
- Abb. 4. Zusammensetzung der Aminosäuren in den Blättern der in mit Salzwasser bzw. mit Leitungswasser begossenen (Kontroll) und nicht begossenen Kulturgefäßen gezogenen Pflanzen. Entwicklung mit Isatin. A=Mais, B= Sonnenblumen, C=Erbsen. Index₁= mit Salzwasser begossen; Index₂= mit Leitungswasser begossen; Index₃=nicht begossen; 1-14=wie in Abbildung 1. Pip=Pipecolinsäure.
- Abb. 5. Die freien Aminosäuren von an Wassermangel leidenden Pflanzen. A,B, C=ein Gemisch bekannter Aminosäuren mit einem Prolingehalt von 20 (A), 40 (B) und 60 (C) μ g.; D=Sonnenblumen; E=Erbsen; F=Tabak; G=*Capsicum annuum* L.; H=Spinat. 1-14=wie in Abbildung 1; Pip=Pipecolinsäure.



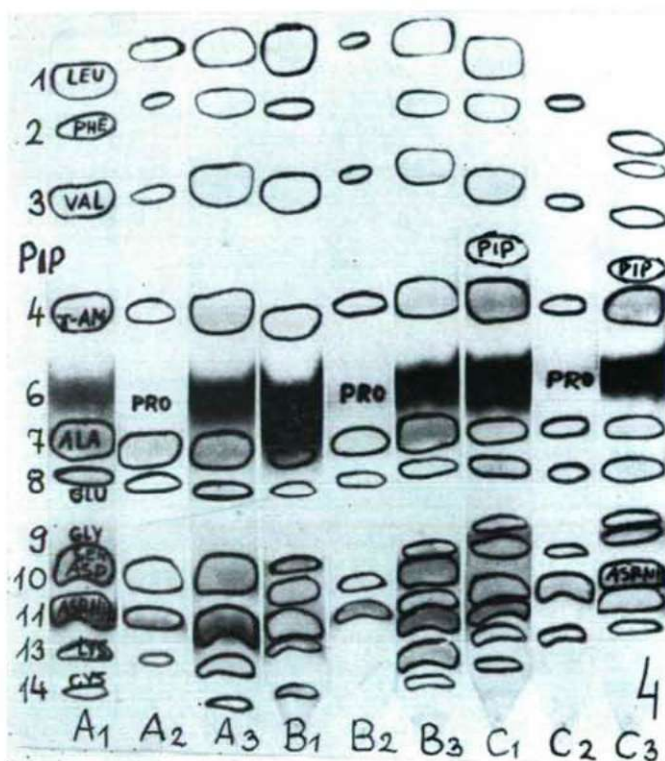
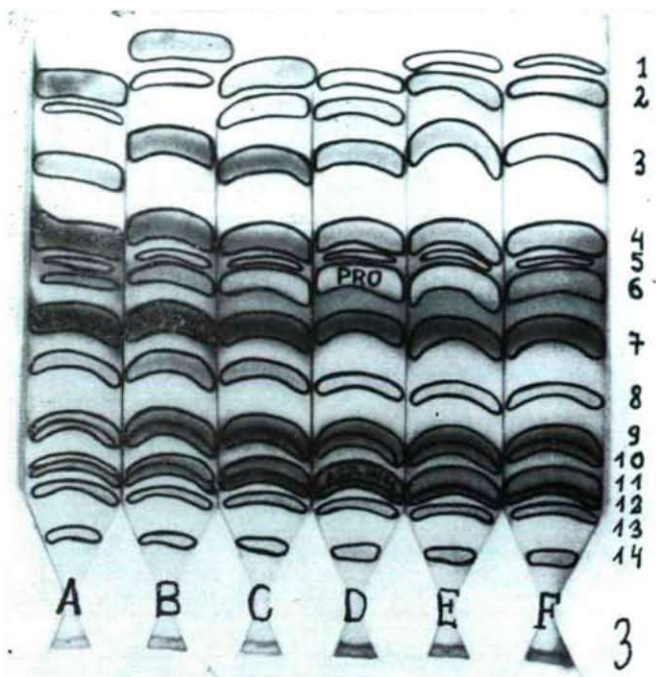


PLATE III

