

Beiträge zum Stickstoffmetabolismus grüner Pflanzen

II. Der Einfluss exogener Glucose auf die Aufnahme von Nitrat und Ammonium aus der Nährlösung und auf den Proteingehalt von *Spirodela oligorrhiza*

Zusätze von Glucose zur Nährlösung steriler Kulturen von *Spirodela oligorrhiza* bewirken, dass die Stickstoffquellen des Mediums, Ammonium und Nitrat, viel rascher verbraucht werden, als in glucosefreien Kulturen. Als Folge davon stellen sich an den Pflanzen Mangelzustände ein, die schliesslich zur Vergilbung führen. Ihre morphologische Äusserung ist ein auffallender Wandel der Chloroplastenfeinstruktur, der von einer Veränderung der Pigment- und Lipidzusammensetzung begleitet ist²⁻⁴. Da diese Phänomene letzten Endes auf den Stickstoffmangel allein zurückgeführt werden können¹, muss angenommen werden, dass die primäre Folge der Glucoseernährung eine Störung des Stickstoffhaushaltes ist, welche auf verschiedenen Wegen zustande kommen kann. Ein direkter Einfluss bestünde in der spezifischen Stimulation der Stickstoffassimilation durch Glucose, wie dies von gewissen C-Metaboliten bereits bekannt ist⁵. Andererseits wäre auch denkbar, dass Glucose, die von diesen Pflanzen metabolisiert wird^{2,6}, zu einem erhöhten Angebot an C-Metaboliten und dadurch zu einer generellen Beschleunigung der Syntheseprozesse und einem erhöhten Stickstoffbedarf führt. Ausserdem lassen die strukturellen Veränderungen der vergilbten Pflanzen auch Störungen auf der Stufe des Proteinstoffwechsels vermuten.

Um Anhaltspunkte über die Wirkungsweise der exogenen Glucose zu gewinnen, haben wir den zeitlichen

Ablauf der Stickstoffaufnahme aus der Nährlösung und den Proteingehalt in normalen und glucosestimulierten Kulturen verfolgt.

Material und Methoden. Kulturen von *Spirodela oligorrhiza* (Stamm 22'01'76) wurden in Erlenmeyerkolben auf steriler, glucosehaltiger Nährlösung, die als Stickstoffquellen 0,002 Mol/l Ammonium und 0,0044 Mol/l Nitrat in Form von Ammonium- und Calciumnitrat enthielt, angezogen⁴. Im Verlaufe des Wachstums wurde periodisch die Ammonium- und Nitratkonzentration der Nährlösung bestimmt. Die Analysen wurden mit einer einfachen Apparatur nach KJELDAHL-PARNASS^{7,8} durchgeführt, in dem einerseits Ammonium allein, andererseits nach Reduktion mit Devarda-Legierung der Gesamtstickstoff bestimmt und die Nitratmenge aus der Differenz errechnet wurde.

¹ I. TEIL, E. C. GROB UND W. EICHENBERGER, *Experientia* 29, (1973).

² J. RUFENER, Dissertation Bern 1966.

³ E. C. GROB UND J. RUFENER, *Proc. Int. Congr. Photosynth. Res.* (1969), vol. 1, p. 55.

⁴ E. C. GROB UND W. EICHENBERGER, *FEBS Lett.* 5, 335, (1969).

⁵ L. BEEVERS UND R. H. HAGEMAN, *A. Rev. Plant Physiol.* 20, 495 (1969).

⁶ E. C. GROB UND G. VON GLUTZ, unpublished.

⁷ W. LIEBI, Lizentiatsarbeit Bern 1970.

⁸ J. K. PARNASS, *Z. analyt. Chem.* 114, 261 (1938).

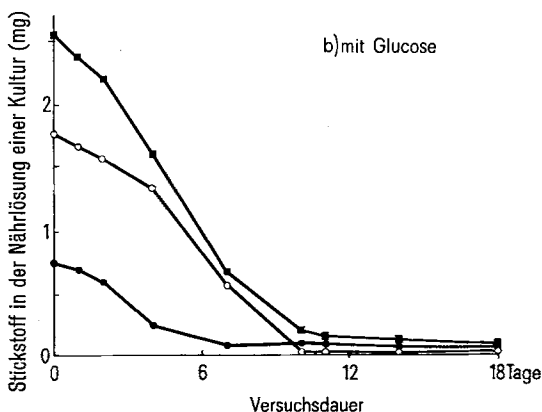
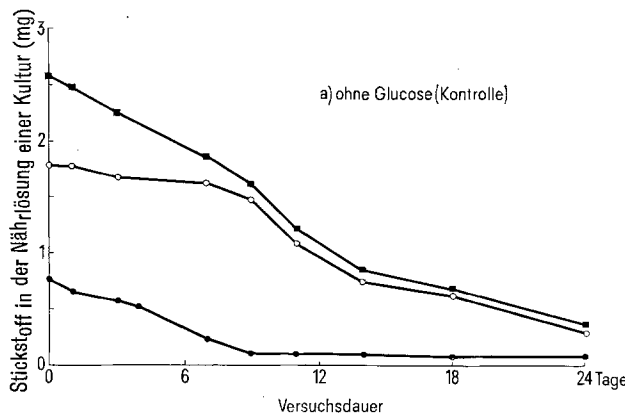


Fig. 1. Verbrauch von Gesamtstickstoff (■), Ammonium (●) und Nitrat (○) in der Nährlösung durch normale und glucosestimulierte Kulturen von *Spirodela oligorrhiza*.

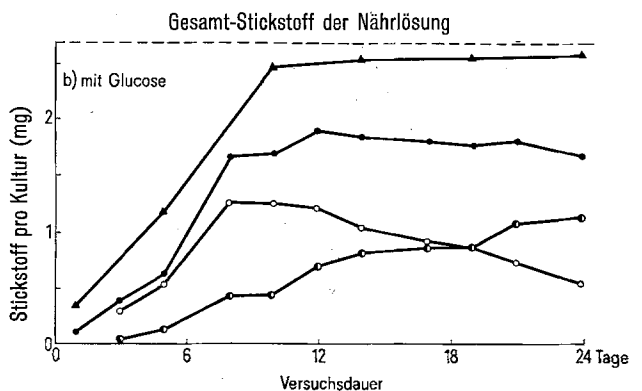
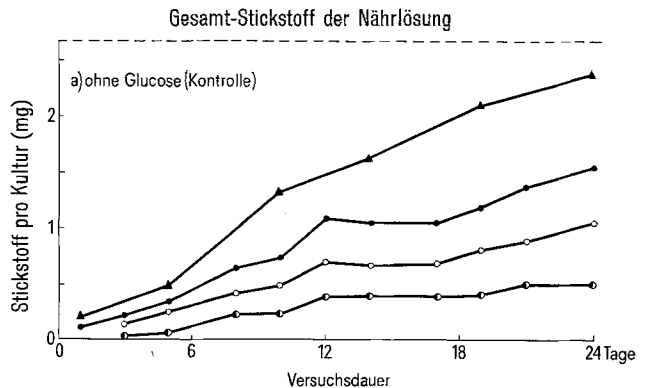


Fig. 2. Stickstoffaufnahme und Proteingehalt normaler und glucosestimulierter Kulturen von *Spirodela oligorrhiza*. Aufgenommener Gesamtstickstoff (▲), Protein-N aus Gesamtprotein (●), wasserlöslichen (○) und wasserunlöslichen Proteinen (◐).

Die Proteine wurden in eine wasserlösliche und eine wasserunlösliche Fraktion zerlegt. Zu diesem Zweck wurden ganze Erlenmeyer-Kulturen abgenutscht, gewaschen und mit destilliertem Wasser in einem Glashomogenisator zerrieben. Die unlöslichen Anteile wurden abzentrifugiert und einmal mit Wasser ausgewaschen. In den vereinigten Überständen wurden die löslichen, im Sediment die unlöslichen Proteine durch Fällung mit Trichloressigsäure, Veraschen und Photometrieren mit Nessler-Reagens bestimmt⁹. Alle Werte sind Mittelwerte aus 5–6 Bestimmungen und wurden auf ganze Erlenmeyer-Kulturen bezogen.

Resultate und Diskussion. Wie aus Figur 1a hervorgeht, nehmen normale Kulturen zuerst bevorzugt Ammonium auf, was darin zum Ausdruck kommt, dass in den ersten 10 Tagen 80% des Ammoniums, aber nur 20% des Nitrats verbraucht werden. Erst nach fast vollständigem Verbrauch des Ammoniums wird vermehrt Nitrat aufgenommen, was zu einem sigmoiden Verlauf des Nitratgehalts in der Nährlösung führt. Ein Rest von ungefähr 5% Ammonium wird von diesen Kulturen anscheinend nicht mehr resorbiert. Eine bevorzugte Aufnahme von Ammonium neben Nitrat ist in vielen Pflanzen festgestellt¹⁰ und auf eine Hemmung der Nitratreduktase durch Ammonium zurückgeführt worden¹¹.

In glucosestimulierten Kulturen werden, wie Figur 1b zeigt, sowohl Ammonium, als auch Nitrat schneller aufgenommen als in den Kontrollen. In bezug auf die Selektionierung zwischen Ammonium und Nitrat fällt jedoch auf, dass nach 3 Tagen bereits 20% des Nitrats aufgenommen sind, während im gleichen Zeitpunkt vom Ammonium erst 40% verbraucht sind. Dies bedeutet, dass in diesen Kulturen die Aufnahme von Nitrat gefördert wird. Ob Glucose selber diese Stimulierung hervorruft und ob sie, wie die meisten Regulatoren der Nitratassimilation⁵, auf der Stufe der Reduktion des Nitrats zum Nitrit (Nitratreduktase) angreift, wird anhand weiterer Versuche abzuklären sein.

Der zeitliche Verlauf von Stickstoffaufnahme und Proteingehalt geht aus Figur 2 hervor. In normalen Kulturen (Figur 2a) erfolgt die Aufnahme des Stickstoffs aus der Nährlösung nahezu linear mit der Zeit. Vom aufgenommenen Stickstoff werden zum gleichen Zeitpunkt etwa 60% in den Proteinen wiedergefunden, wovon ungefähr $\frac{2}{3}$ auf die wasserlöslichen und $\frac{1}{3}$ auf die wasserunlöslichen Proteinfractionen entfallen. Der Fehlbetrag in der Bilanz, der hier etwa 40% beträgt, dürfte zur Hauptsache auf resorbierte aber nicht metabolisierte N-Quellen, sowie auf niedermolekulare N-Verbindungen zurückzuführen sein.

In glucosestimulierten Kulturen (Figur 2b) folgt der Gesamtproteingehalt ebenfalls streng der Menge des aufgenommenen Stickstoffs. Allerdings erreichen hier beide Grössen nach 10 Tagen ein Plateau. Die unlöslichen Proteine nehmen über die ganze Versuchsdauer linear, aber rascher als in den Kontrollen, zu. Die Menge der löslichen Fraktion dagegen durchläuft nach einem anfänglichen steilen Anstieg ein Maximum und fällt nach dem

10. Tag wieder ab. Nach 20 Tagen liegt die Menge löslicher Proteine sogar unter derjenigen der unlöslichen, ein Zustand, der in normalen Kulturen nicht eintritt. Dies bedeutet, dass vom Moment an, da die Stickstoffquellen der Nährlösung erschöpft sind, das Verhältnis zwischen löslichen und unlöslichen Proteinen ständig abnimmt. Der Verlauf der Kurven lässt sogar vermuten, dass eine weitere Synthese von unlöslichen Proteinen durch einen Abbau löslicher Proteine wettgemacht wird. Bereits aus dieser groben Zerlegung der Zellproteine in zwei Fraktionen geht hervor, dass die einzelnen Proteine vom Stickstoffmangel sehr unterschiedlich betroffen werden, was eine quantitative Veränderung des Protein- und Enzymmusters dieser Pflanzen zur Folge haben muss. Da 70% der Zellproteine in den Plastiden lokalisiert sind¹², werden diese durch den Vorgang besonders stark betroffen. Der Abbau des Lamellarsystems ist eine sichtbare Folge davon und zeigt, dass auch Membranproteine davon erfasst werden. Wir schliessen aus diesen Ergebnissen, dass ein teilweiser oder vollständiger Verlust wichtiger Enzymproteine die primäre Ursache der strukturellen Veränderungen und der Einstellung der Photosynthesetätigkeit dieser Pflanzen während der Vergilbung darstellt.

Summary. The uptake of ammonium and nitrate by normal and glucose-stimulated *Spirodela oligorrhiza* plants was investigated. Nitrate is used more rapidly by plants grown on glucose than by controls, suggesting a stimulation of nitrate assimilation by glucose. In plants growing on a normal nutrient, the contents of both water-soluble and water-insoluble proteins linearly increase with time and nitrogen uptake. In glucose-stimulated cultures soluble protein increases rapidly during the first 10 days of cultivation, but declines thereafter, while insoluble protein rises continuously over the whole period of time. The decreasing ratio of soluble and insoluble protein reflects an alteration of the protein and enzyme pattern, which is suggested to be the primary reason for the change of plastid ultrastructure and the loss of photosynthetic activity.

E. C. GROB†, M. HODLER und W. EICHENBERGER¹³

Institut für organische Chemie der Universität,
Länggassstrasse 7, CH-3012 Bern (Schweiz),
19. September 1972.

⁹ W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS und J. F. STAUFFER, *Manometric Techniques* (Burgess, Minneapolis 1957).

¹⁰ A. R. FERGUSON und E. G. BOLLARD, *Planta* 88, 344 (1969).

¹¹ A. R. FERGUSON, *Planta* 88, 353 (1969).

¹² M. ZUCKER und H. T. STINSON, *Arch. Biochem. Biophys.* 96, 637 (1962).

¹³ Die Arbeiten wurden vom Schweizerischen Nationalfonds unterstützt.

Succinic Dehydrogenase Activity During Starvation of a Terrestrial Pulmonate *Ariophanta* sp.

Metabolism of molluscan tissues during starvation and aestivation has been widely studied. These studies have revealed that many molluscs have lipid oriented metabolism, while others are carbohydrate-oriented. Terrestrial pulmonate *Helix pomatia*, for example, is carbohydrate-oriented¹. Even though carbohydrate is the major energy

source, considerable quantities of protein and lipid are utilized during starvation and aestivation. Similar observations have been made in fresh-water pulmonate *Planorbis corneus*², and in terrestrial snail *Ariophanta* sp.³. In *Thias lamellosa* there is an increase in oxygen consumption at 53 days of starvation⁴. Pulmonate snails, however,