

Die freien Aminosäuren im Endosperm von *Raphanus sativus* L. bei 4x·4x- und 4x·2x-Kreuzungen *

E. CLAUSS

Institut für Pflanzenzüchtung Quedlinburg
der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin

Free Amino Acids in Endosperm of *Raphanus sativus* L. after 4x × 4x and 4x × 2x Crosses

Summary. The amino acid pool in the endosperm of ovules of *Raphanus sativus* var. *sativus* from 4x × 4x and 4x × 2x crosses was studied. There are striking differences between the two types of endosperm. In a normally functioning 6x endosperm (4x × 4x) the amino acid concentrations decrease sharply, though temporarily, especially between the 12th and 15th day after pollination. In 5x endosperm (4x × 2x) the amino acid concentrations are high and remain relatively unchanged. We assume this to be a metabolic anomaly and a possible cause for the degeneration of the embryo.

Bei verschiedenen Pflanzenarten, die ein Endosperm besitzen, führen Valenzkreuzungen, z. B. zwischen 2x- und 4x-Pflanzen, normalerweise zu keinem Samenansatz. Obwohl bei derartigen Kreuzungen die Befruchtung und eine gewisse Anfangsentwicklung des Embryos erfolgt, kommt es dennoch zur baldigen Degeneration der Samenanlage. Erst vor kurzem wies SKIEBE (1967) in einer zusammenfassenden Darstellung darauf hin, daß die genetische Konstitution des Endosperms, d. h. ein sogenanntes funktionierendes Endosperm, von vorrangiger Bedeutung für die Entstehung lebensfähiger Samen ist.

Über die Physiologie der sich entwickelnden Nährgewebe ist bis jetzt relativ wenig bekannt. Die Ursache dafür ergibt sich vor allem aus der Schwierigkeit, mit den meist minimalen Substanzmengen zu experimentieren. Eine Modifizierung der Dünnenschichtchromatographie gab uns die Möglichkeit, die Aminosäure-Pools in den nukleären Endospermen von *Raphanus sativus* var. *sativus* bei den Kreuzungen 4x · 4x (funktionierend) und 4x · 2x vom 10. Tag nach der Bestäubung bis zum 19. Tag, dem Zeitpunkt weitgehender Degeneration der 4x · 2x-Samenanlagen, zu untersuchen.

Material und Methodik

Die Versuche wurden mit der 2x-Sorte 'Feuerkugel' und dem 4x-Stamm 1091 im Freiland durchgeführt. Zur Ausschaltung individueller Besonderheiten erfolgten beide Kreuzungen parallel auf jeder 4x-Pflanze. Das flüssige Endosperm wurde vom 10. Tag an nach der Bestäubung (früher war es technisch nicht möglich) mit Kapillaren den Samenanlagen entnommen, gesammelt und sofort zu je 2 µl auf Dünnenschichtplatten aufgetragen.

Chromatographie: Mit 15 g Cellulose MN 300 + 0,5% Carboxymethylcellulose wurden 16 Platten zu 12 × 12 cm beschichtet. 1. Lauf (3 h) in t-BuOH/Essigsäure/H₂O (3:1:1); das Laufmittel bewährt sich durch seine unbegrenzte Verwendbarkeit und die ausgezeichnete Trennfähigkeit auch bei Pflanzensaften und Rohextrakten. 2. Lauf (doppelt, je 70 min) in s-BuOH/MeEtCO/NH₃/H₂O (5:3:1:1); es empfiehlt sich, das Gemisch nur für einen doppelten Lauf zu benutzen. Die kritischen Aminosäuren Leucin und Isoleucin sowie Methionin und Valin werden in diesem Laufmittel klar getrennt. Die Platten wurden durch dreimaliges kurzes Tauchen in 0,5% Ninhydrin in

Aceton (Cd(NO₃)₂-haltig) gefärbt. Die Aminosäuren sind noch zu 0,02 µg nachweisbar. Die minimalen Endospermengen gestatteten nur einen visuellen Vergleich der Größe und Farbintensität der Ninhydrinflecken mit denen von Standardverdünnungen.

Ergebnisse und Diskussion

In den *Raphanus*-Endospermen fanden wir mengenmäßig dominierend die Aminosäuren und Amide Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glutamin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin, Serin, S-Methylcysteinsulfoxid (SMeCySO), Threonin und Valin. Weiterhin ließen sich in geringen Spuren und z. T. nur kurzfristig Asparagin, γ-Aminobuttersäure, Glycin, Histidin, Lysin, Methionin (inkl. Methioninsulfoxid), Tyrosin sowie Äthanolamin nachweisen, die aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur begrenzt berücksichtigt werden können, da die geringeren Konzentrationen nur sehr vorsichtige Deutungen erlauben.

Die sich aus den beiden Kreuzungen ergebenden Endospermtypen unterscheiden sich im Aminosäuregehalt in quantitativer Hinsicht sehr deutlich voneinander. Während im 5x-Endosperm (4x · 2x-Kreuzung) die Konzentrationen relativ hoch sind und

Tabelle 1. Aminosäuregehalt des 6x-Endosperms in Prozent des 5x-Endosperms

| | 10. | 11. | 12. | 13. | 14. | 15. | 17. | 19. Tag nach der Bestäubung |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------------------------------|
| GluNH ₂ | 50 | 20 | 10 | 10 | 10 | 10 | 70 | 60 |
| SMeCySO | 50 | 40 | 20 | 10 | 10 | 10 | 70 | 90 |
| Glu | 50 | 40 | 40 | 20 | 20 | 30 | 50 | 120 |
| Ser | 100 | 80 | 90 | 50 | 20 | 30 | 40 | 40 |
| Ala | 200 | 200 | 200 | 100 | 70 | 50 | 100 | 500 |
| Asp | 30 | 30 | 10 | 10 | 10 | 30 | 40 | 70 |
| Val | 60 | 30 | 30 | 10 | 20 | 30 | 90 | 120 |
| Leu | 50 | 50 | 0 | 0 | 40 | 40 | 100 | 100 |
| Ileu | 50 | 50 | 0 | 0 | 40 | 40 | 100 | 180 |
| Phe | 40 | 50 | 0 | 0 | 30 | 40 | 100 | 150 |
| Arg | 50 | 50 | 50 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 |
| Thr | 0 | 0 | — | — | — | 0 | 0 | 100 |

0 = unter den gegebenen Bedingungen im 6x-Endosperm nicht mehr nachweisbar; — = auch im 5x-Endosperm nicht nachweisbar. Reihenfolge nach der Konzentration: GluNH₂ max. 1 µg — Thr. ca. 0,02 µg/µl 5x-Endosperm.

* Quedlinburger Beiträge zur Züchtungsforschung Nr. 82.

bis zur Degeneration der Samenanlagen ohne wesentliche Schwankungen annähernd gleichbleiben, liegen sie im 6x-Endosperm ($4x \cdot 4x$) bereits am 10. Tag nach der Bestäubung (bis auf die von Alanin und Serin) ganz erheblich unter denen des 5x-Endosperms (Tab. 1). Im Laufe der folgenden Tage sinken die Werte noch weiter ab, um schließlich etwa vom 15. zum 19. Tag wieder anzusteigen. Dabei werden teilweise die Konzentrationen im 5x-Endosperm überschritten. Auch die nur zeitweilig in geringen Spuren nachweisbaren Aminosäuren Tyrosin, γ -Aminobuttersäure und Methionin sowie Äthanolamin sind im 5x-Endosperm in höheren Konzentrationen enthalten als im 6x-Endosperm. Eine gewisse Ausnahme bildet Alanin, dessen Konzentrationen im 6x-Endosperm vom 10. bis 12. Tag etwa doppelt so hoch sind wie im 5x-Endosperm und am 19. Tag sogar den 5fachen Wert erreichen. Die Tendenz einer vorübergehenden Konzentrationsverringerung ist aber auch hier deutlich.

Die bemerkenswerten Veränderungen des Aminosäure-Pools im 6x-Endosperm sind zweifellos Ausdruck eines normal funktionierenden Stoffwechsels. Die freien Aminosäuren werden hier wahrscheinlich für die Proteinsynthese verbraucht, die zwischen dem 12. und 15. Tag nach der Bestäubung eine auffallende Steigerung erfährt. Eine zeitweilig erhöhte energetische Nutzung der Aminosäuren im Atmungsstoffwechsel, wie sie z. B. von LINSKENS u. TUPÝ (1966) in bestäubten *Petunia*-Griffeln nachgewiesen wurde, wird durch den hier beobachteten gleichzeitigen Schwund des Glutamins sowie durch das unveränderte, nur spurenweise Auftreten des Asparagins nicht unterstrichen. Der weitgehend gleichbleibende

Aminosäure-Pool im 5x-Endosperm läßt vermuten, daß in diesem Falle das Aminosäure-Angebot nicht genutzt werden kann. Auf dieser Stoffwechselanomalie beruht möglicherweise der alsbaldige Abort des Embryos.

Interessanterweise deuten erste Versuche mit Valenzkreuzungen an *Brassica pekinensis* Rupr. im wesentlichen auf gleiche Verhältnisse im Aminosäure-Stoffwechsel hin. Die von uns mitgeteilten Beobachtungen dürften daher keinesfalls nur für *Raphanus sativus* spezifisch sein.

Zusammenfassung

Es wurde der Aminosäure-Pool im Endosperm der Samenanlagen von *Raphanus sativus* var. *sativus* bei den Kreuzungen $4x \cdot 4x$ und $4x \cdot 2x$ untersucht. Zwischen beiden Endospermtypen bestehen auffallende quantitative Unterschiede. Im normal funktionierenden 6x-Endosperm ($4x \cdot 4x$) sinken die Konzentrationen der Aminosäuren vor allem zwischen dem 12. und 15. Tag nach der Bestäubung vorübergehend stark ab. Im 5x-Endosperm ($4x \cdot 2x$) sind die Konzentrationen der Aminosäuren hoch und bleiben weitgehend unverändert, so daß hier eine Stoffwechselanomalie vermutet werden kann, auf der möglicherweise die Degeneration des Embryos beruht.

Literatur

1. LINSKENS, H. F., and J. TUPÝ: The amino acid pool in the style of self-incompatible strains of *Petunia* after self- and crosspollination. *Der Züchter* **36**, 151–158 (1966). — 2. SKIEBE, K.: Über die genetischen Ursachen der Samenbildung. *Der Züchter* **37**, 75–82 (1967).