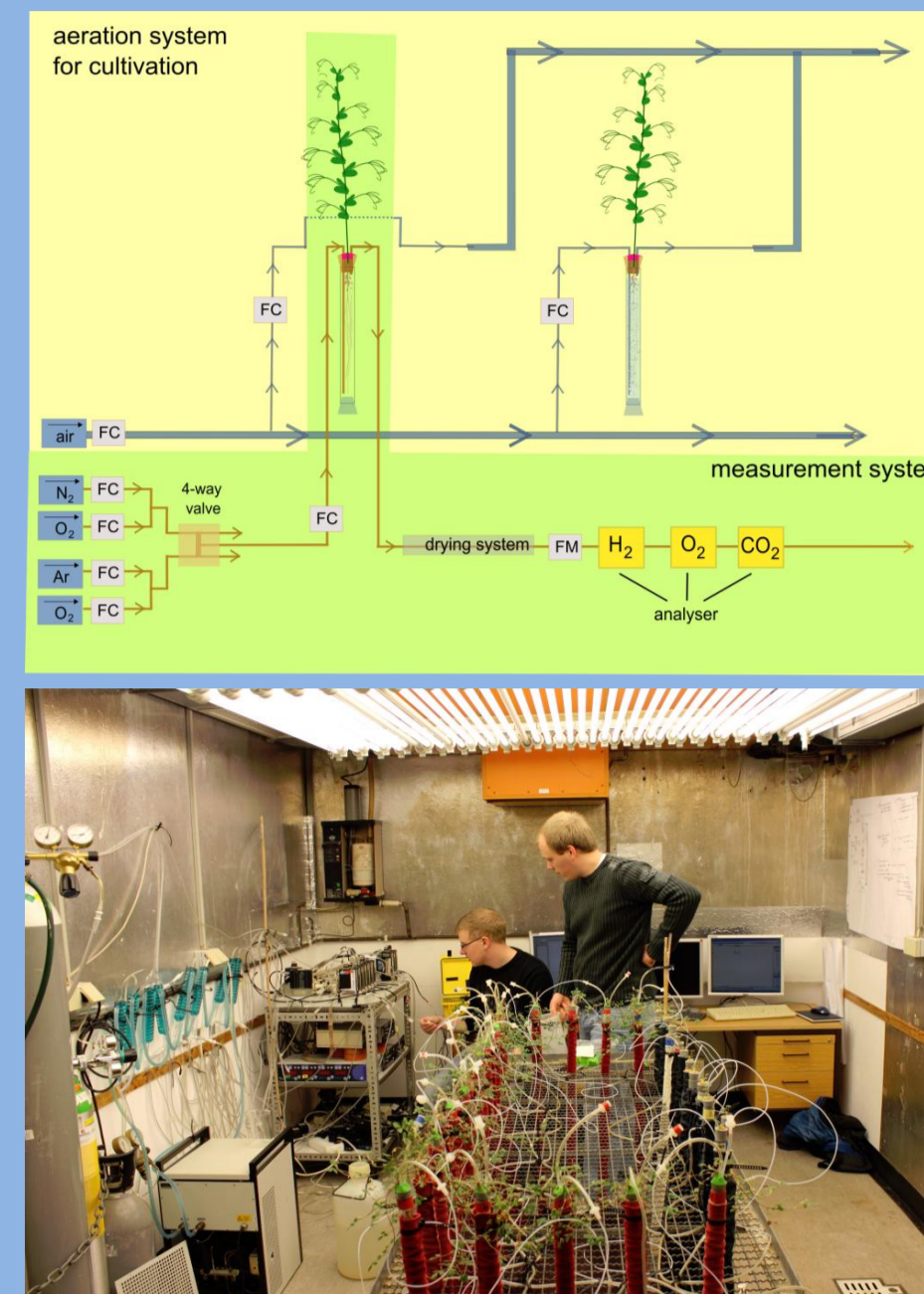


Die Rolle von Aminosäuren bei der Regulation der Aktivität von Leguminosenknöllchen

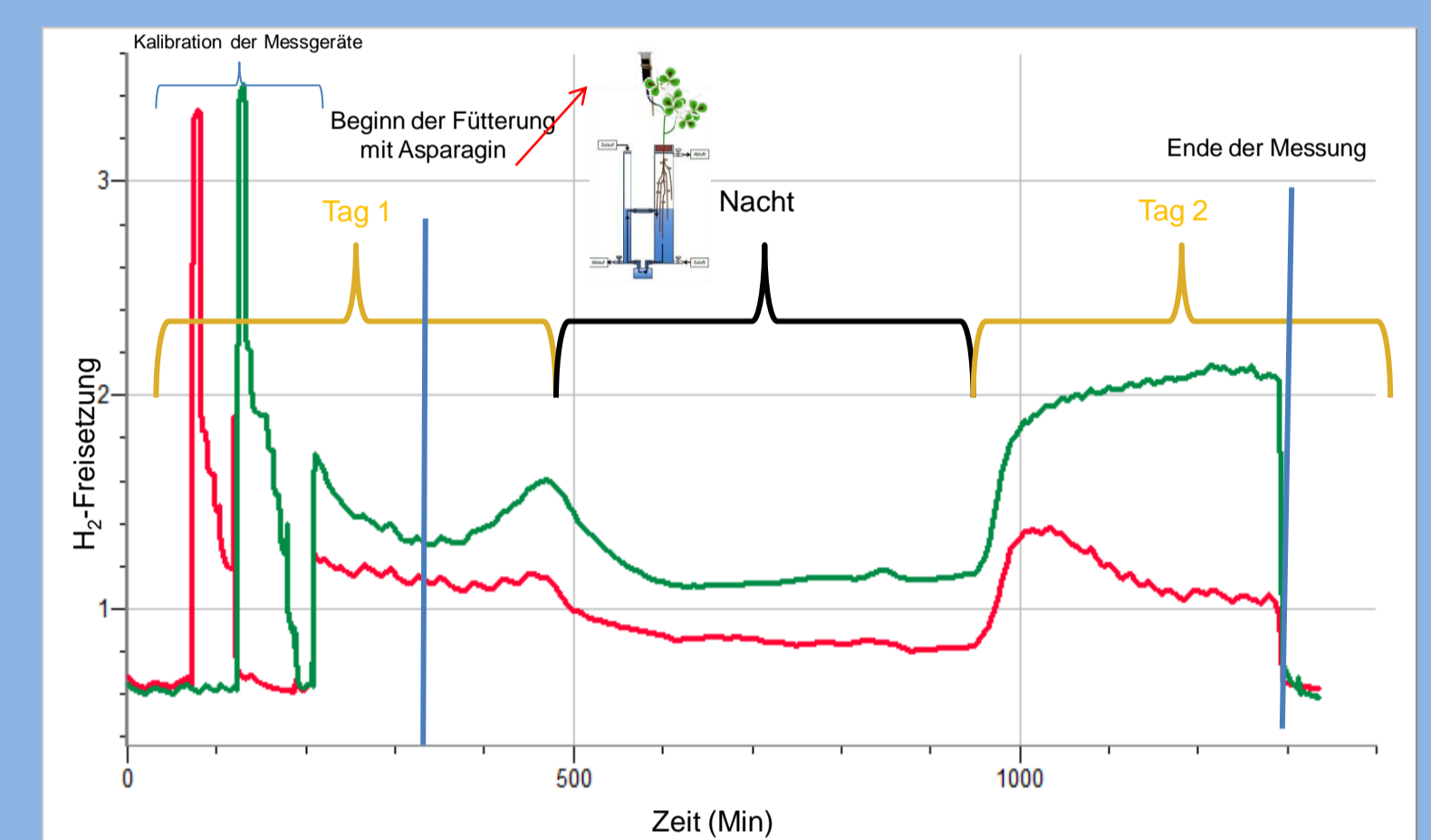
Methode: Gaswechsellmessanlage

Bei der enzymatischen Fixierung von Stickstoff wird auch Wasserstoff freigesetzt, wie die folgende Reaktionsgleichung zeigt:
 $N_2 + 8e^- + 8H^+ \rightarrow 2NH_3 + H_2$
Der Wasserstoff dient als indirektes Maß zur Erfassung der Knöllchenaktivität. Einen Tag vor der Phloemfütterung wird die Messung gestartet.
Eine Reaktion der Pflanze auf eine Aminosäure wird am PC sichtbar (Fischinger und Schulze 2012).



Ergebnis

In der untenstehenden Abbildung ist ein typischer Verlauf der Messung der N₂-Fixierungs-Aktivität (H₂-Freisetzung) dargestellt. Für eine spätere Umrechnung der Messwerte von H₂-Freisetzung in N-Fixierung ist eine Kalibration der Messgeräte notwendig. Die Messung erfolgte an 2 Pflanzen über 2 Tage und eine Nacht. Dargestellt mit der grünen und roten Linie ist die H₂-Freisetzung je einer Pflanze mit einer Messwertabnahme pro Minute. Nachdem sich ein konstantes Niveau eingestellt hat, wird an beiden Pflanzen eine „Phloemfütterung“ angeschlossen.



Eine Pflanze wird mit Wasser über das Phloem gefüttert (Kontrolle, grüne Linie), die andere mit Asparagin-säurelösung (rote Linie). Im Verlaufe des Nachmittages von Tag 1 nimmt die Aktivität der wassergefütterten Pflanze zu, während die mit Asparagin fütterung konstant bleibt. Mit einsetzenden Nachtbedingungen sinkt die Aktivität beider Pflanzen ab. Nach Tagesbeginn steigt die Aktivität der Pflanzen an. Nach einigen Stunden Lichtphase tritt ein deutlicher Abfall der Knöllchenaktivität der mit Asparagin gefütterten Pflanze ein, wobei das Niveau des Vortages unterschritten wurde.

Insgesamt zeigen diese Messungen einen deutlichen Einfluss einer Aminosäure (Asparagin)-Fütterung auf die Knöllchenaktivität!

Schlussfolgerung

1. Ein Rückfluss von Asparagin aus den Blättern in die Knöllchen reguliert deren Aktivität.
2. Der Mechanismus der Wirkung von Asparagin in den Knöllchen ist offen und stellt einen wichtigen weiterführenden Forschungsansatz dar.
3. Die eingesetzten Methoden haben sich für das Studium der aufgeworfenen Fragen als geeignet erwiesen. Allerdings waren die Ergebnisse nicht in allen Messungen so eindeutig, wie in der dargestellten. Es muss untersucht werden, ob dies zum Beispiel mit unterschiedlichen Aufnahmeraten der künstlichen Phloemfütterung im Zusammenhang steht.
4. Die Untersuchungen haben zum Verständnis der Regulation der Knöllchenaktivität beigetragen. Ein tiefergehendes Erfassen dieser komplexen Zusammenhänge kann einen Beitrag z.B. zur Züchtung von effizienter N-fixierenden Leguminosen leisten.
5. Ein denkbarer weiterführender inhaltlicher und methodischer Ansatz wäre ein Vergleich der gesamten Genexpressionsmuster (Transkriptomics) in den Knöllchen nach Wasser- gegenüber Asparagin-Fütterung ins Phloem.

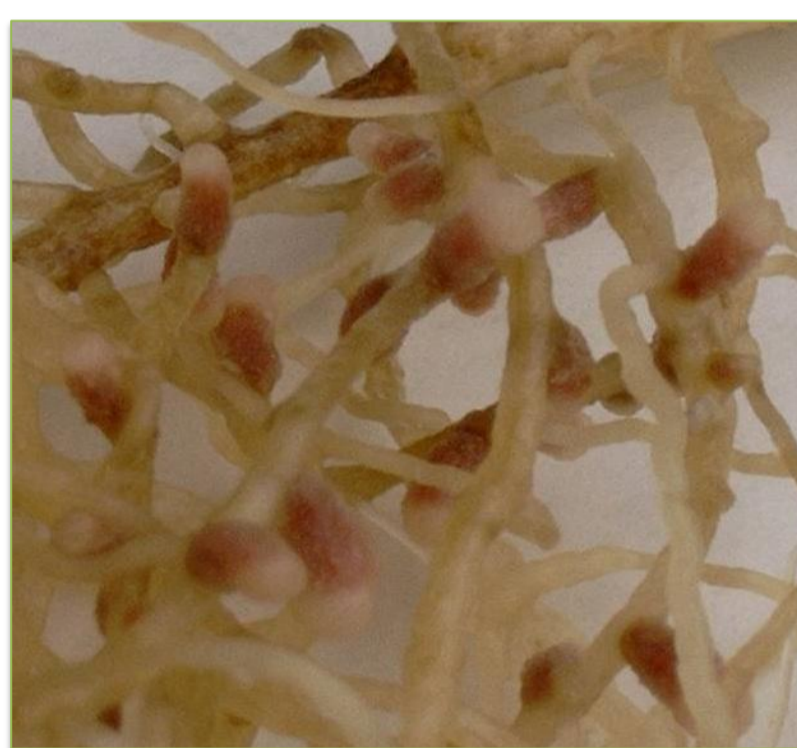
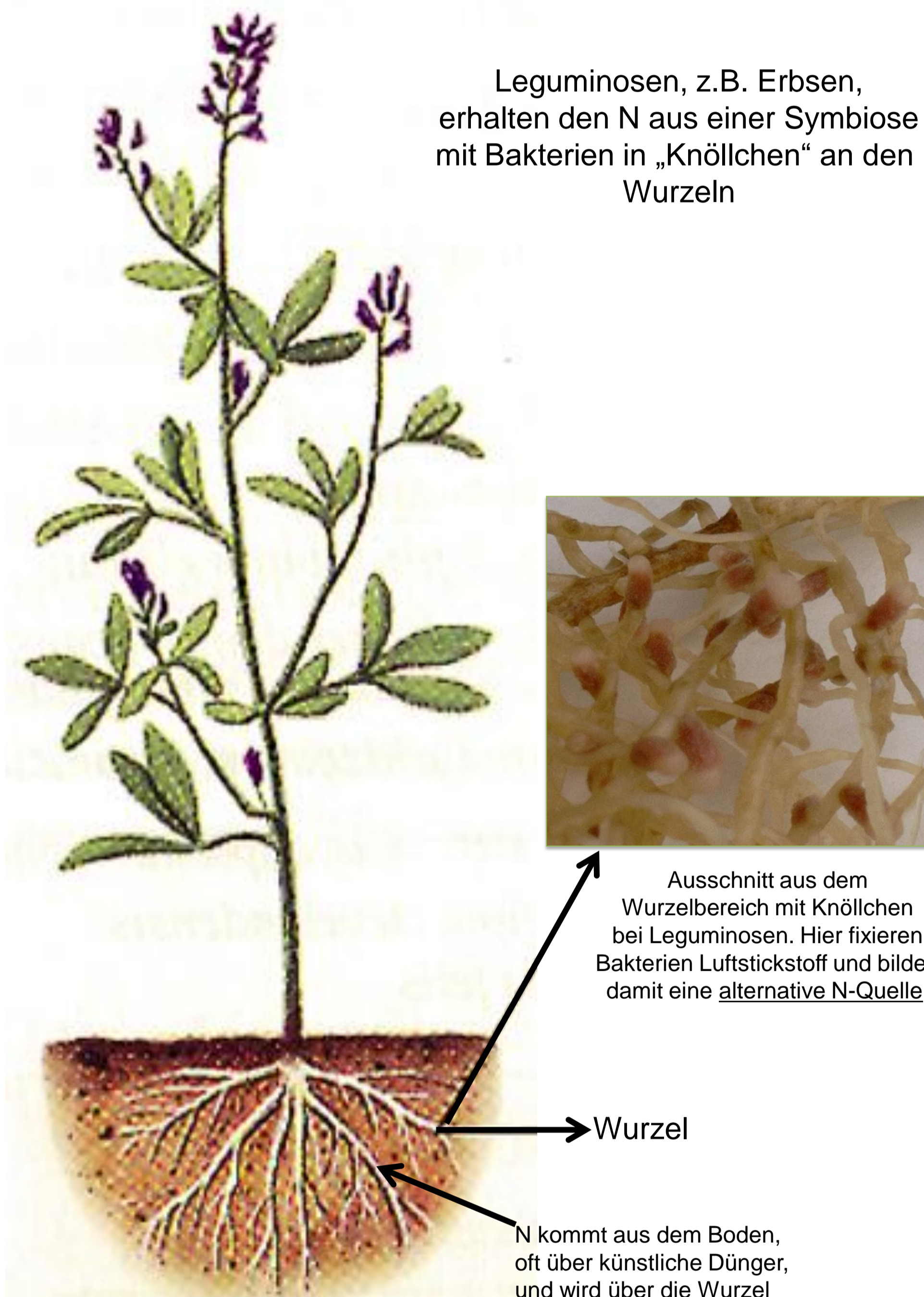
Methode: „Fütterung“



Um die Aminosäurelösung in das Phloem der Pflanze einzuspeisen, wurde an einem amputierten Seitenspross ein Lösungsreservoir über einen Schlauch angeschlossen (Lin et al. 2011). Durch die Schwerkraft fließt die Lösung in das Phloem. Die aufgenommene Menge kann an der Kanüle abgelesen werden. Auf diese Weise wurden Asparagin oder Wasser (Kontrolle) appliziert.

Pflanzen brauchen Stickstoff (N) z.B. zum Eiweißaufbau

Leguminosen, z.B. Erbsen, erhalten den N aus einer Symbiose mit Bakterien in „Knöllchen“ an den Wurzeln



Ausschnitt aus dem Wurzelbereich mit Knöllchen bei Leguminosen. Hier fixieren Bakterien Luftstickstoff und bilden damit eine alternative N-Quelle.

Wurzel

N kommt aus dem Boden, oft über künstliche Dünger, und wird über die Wurzel aufgenommen. Dies ist die einzige N-Quelle von Nichtleguminosen, z.B. Weizen.

Herangehensweise zur Prüfung der Hypothese

Um die Hypothese zu prüfen, haben wir uns in 2 grundsätzliche methodische Vorgehensweisen eingearbeitet, die es erlauben

1. Die Phloemzusammensetzung künstlich zu manipulieren, d.h. Aminosäuren in das Phloem zu „füttern“ und dadurch einen veränderten Ernährungszustand der Blätter zu simulieren.
2. Die Aktivität der Knöllchen einer Pflanze langfristig und kontinuierlich zu verfolgen.

Dadurch lässt sich dann prüfen, ob sich die Aktivität der Knöllchen in Abhängigkeit von der Phloemzusammensetzung ändert.

Hypothese

Die Stickstofffixierung der Knöllchen richtet sich nach dem Bedarf der Pflanze. Wenn die Pflanze viel Stickstoff benötigt, um Aminosäuren zu bilden, ist die Aktivität der Knöllchen hoch. Ein anschauliches experimentelles Beispiel dafür ist z.B. wenn man 50% der Knöllchen einer Pflanze abtrennt, verdoppeln die verbleibenden Knöllchen innerhalb kurzer Zeit ihre Aktivität (Herdina und Silsbury 1990). Wenn die Blätter gut und ausreichend mit Stickstoff versorgt sind, wird dieser bekanntermaßen in Form von Aminosäuren in den Leitbündeln der Pflanze (Phloem) wieder zurück in die Knöllchen transportiert (Fischinger et al. 2006). **Unsere Hypothese ist, dass dieser Aminosäurerückfluss die „Nachricht“ über den N-Ernährungszustand der Blätter trägt und regulativen Einfluss auf die Aktivität der stickstoff-fixierenden Knöllchen ausübt. Auf diese Weise wird deren Aktivität dem Bedarf der Blätter angepasst.**



Claas Steinhauer, Georg Bitter, Jan-Niklas Trösken, Jan Dirks, Juliane Schorling, Karsten Gremler, Ronja Hüppe, Stefan Kremer, Janice Neumann, Beke Köster, Vanessa Baumgarten, Klaus Dittert, Joachim Schulze

Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Abteilung Pflanzenernährung und Ertragsphysiologie, Fakultät für Agrarwissenschaften, Georg-August-Universität Göttingen

Literatur:

- Fischinger SA, Devron JJ, Claassen N, Schulze J. 2006. Nitrogen from senescing lower leaves of common bean is retranslocated to nodules and might be involved in a N-feedback regulation of nitrogen fixation. *Journal of Plant Physiology* 163, 987-995.
- Fischinger SA, Schulze J. 2010. The argon-induced decline in nitrogenase activity commences before the beginning of a decline in nodule oxygen uptake. *Journal of Plant Physiology*, available online: doi 10.1016/j.jplph.2010.1003.1014.
- Herdina J, Silsbury JH. 1990. The effect of reduction in the number of nodules on nodule activity of faba bean (*Vicia faba* cv. Fiord). *Annals of Botany* 65, 473-481.
- Lin YH, Lin MH, Grasshoff PM, Ferguson BJ. 2011. An efficient petiole-feeding bioassay for introducing aqueous solutions into dicotyledonous plants. *Nature protocols* 6, 36-45.