

POOL-AMINOSÄUREN WÄHREND DES WACHSTUMS UND DER ENTWICKLUNG EINIGER WEIZENSORTEN—I.

POOL-AMINOSÄUREN IN KEIMENDEN SAMEN, IN BLÄTTERN MEHRERER ENTWICKLUNGSSTADIEN, SOWIE IM WACHSENDEN UND REIFENDEN KORN

F. SCHEFFER und H. LORENZ*

Institut für Bodenkunde der Universität Göttingen

(Received 19 October 1967, in revised form 21 February 1968)

Abstract—Dormant seeds of five winter wheat varieties contain only a few pool amino acids in considerable quantity, whereas seeds of one spring wheat contain more pool amino acids in relatively high concentration. During germination, almost all pool amino acids increase although there is an initial decrease of most of them in some winter wheat varieties. In winter wheat varieties the relative amount of glutamic acid within the pool decreases during germination more than in the spring wheat. Incubation at 2° for 3 weeks of seeds germinated for 2 days at 24° results in a multifold increase of free amino acids with outstandingly high concentration of proline. In spring wheat, proline does not increase that much as in the winter wheat varieties. Young leaves of winter wheat varieties grown at constant temperature of 24° contain relatively high concentrations of free amino acids, except proline. In the spring wheat variety, the proline concentration is fairly high. In leaves of plants of all varieties grown outside proline is present in considerable quantity. Proline concentration is discussed in view of its role in protein metabolism, especially with regard to vernalization. The pool of free amino acids is depleted as the plants grow older. Apparently soluble nitrogen compounds are translocated to the growing regions. In later stages asparagine disappears entirely pointing to its role in the translocation of organic nitrogen. Young kernels contain many ninhydrin positive compounds in high concentration, which gradually decrease during the course of development. Glutamic acid is present in relatively small amounts compared to the other members of the pool in early stages. It increases later and becomes one of the prominent pool amino acids. In spring wheat, glutamic acid is higher in concentration from the beginning. Aspartic acid and asparagine decrease as glutamic acid increases. Glutamic acid concentration is discussed in view of its role in protein metabolism and as the "gate" for inorganic nitrogen. During the process of ripening, aspartic acid and asparagine increase again and become prominent members of the pool, whereas glutamic acid decreases. Tryptophan seems to be a typical metabolite of ripening wheat caryopses. It increases to a certain level and remains more or less constant. In spring wheat, tryptophan concentration is lower than in winter wheat varieties. Tryptophan may serve as a precursor of indolyl acetic acid during germination. γ -Aminobutyric acid is one of the most prominent amino acids in the early stages of development and decreases during ripening. Serine and threonine behave similarly. In young kernels ninhydrin positive compounds are found, which seem to be specific for groups of varieties differing in their bread-making quality. Presumably these are peptides of low molecular weight.

EINLEITUNG

BIOCHEMISCHE Reaktionen, die während des Wachstums der Pflanzen ablaufen und die Voraussetzung für die Ertragsbildung sind, spiegeln sich in ihren Produkten und Substraten wider. Es ist bekannt, daß in der Zelle Pools existieren aus denen heraus die biochemischen Reaktionsketten gespeist werden können. Poolbildung ist nicht bei allen Metaboliten anzutreffen; ja, es gibt, besonders bei den hier zur Diskussion stehenden Aminosäuren, solche, die bevorzugt der Speicherung von leicht verfügbarem Stickstoff dienen und die

*Gegenwärtige Adresse: Institut für Pflanzenernährung der Technischen Hochschule 3 Hannover Herrenhäuserstr. 2.

mitunter für bestimmte Pflanzen und Pflanzenfamilien charakteristisch sind,^{1,2} während andere, vor allem die Glieder in Reaktionsketten, unter optimalen Bedingungen selten in nennenswerten Konzentrationen auftreten.

Hier soll zunächst nicht zwischen mehreren Pools unterschieden werden, die auf Grund der Kompartimentierung der Zelle vorhanden sind^{3,4} und auch der Messung zugänglich.^{5,6} Da die freien Aminosäuren ein Umschlagplatz für den Stickstoffwechsel in der Pflanze sind, lag es nahe, Informationen über ihr Verhalten während der Entwicklung zu erarbeiten, die Richtlinien für Fragen der Stickstoffernährung aufzeigen können mit dem Ziel der Erhöhung des Proteingehalts in den Körnern.

Durch Gegenüberstellung verschiedener Varietäten sollte nach konstitutionell bedingten Eigenschaften der Poolbildung gesucht werden, die wirtschaftlich interessant werden können, wenn sie mit der Fähigkeit verbunden sind, hochwertiges Samenprotein zu erzeugen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In Abb. 1, 2 und 3 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt. Es wurde eine kreisförmige Grundlinie angenommen, auf der im Uhrzeigersinn in der Reihenfolge ihres Erscheinens im Chromatogramm die Konzentrationen der bisher gefundenen 33 Ninhydrin positiven Komponenten in logarithmischem Maßstab aufgetragen sind. Diese Art der Darstellung scheint uns aus Gründen der Platzersparnis und der Übersichtlichkeit besonders bei einer Vielzahl von Substanzen geeignet zu sein.

KEIMENDE SAMEN

In den ruhenden Samen der untersuchten Winterweizensorten findet sich der größte Teil des löslichen Stickstoffs in so charakteristischen N-Speichern wie dem Asparagin (Nr. 8) und der Asparaginsäure (Nr. 6). Aber auch im Tryptophan (Nr. 32), das bisher nicht als Speicher löslichen Stickstoffs bekannt ist, wird ein beachtlicher Teil deponiert, insbesondere in den Sorten "Carstens VI", "Rabe" und "Gudin". Im Sommerweizen ist der Stickstoff des Pools auf eine größere Anzahl von Komponenten verteilt. Threonin (Nr. 7) und Serin (Nr. 9), die in den Winterformen nur in Spuren nachweisbar waren findet man in nennenswerten Konzentrationen. Tryptophan ist nicht so stark vertreten wie in den Winterweizen.

Nach zwei Tagen Keimung tritt zunächst eine Erniedrigung der Konzentration freier Aminosäuren ein. Das gilt besonders für die im Saatgut stark vertretenen, wie Asparaginsäure und Asparagin. Im Sommerweizen wird der Rückgang nur bei Asparagin besonders deutlich. Threonin und Serin steigen in allen untersuchten Varietäten an.

Aktivierung und Synthese von Enzymen während der Keimung führen zu einer Verteilung des löslichen Stickstoffs auf eine größere Zahl von Aminosäuren auf Kosten der im Saatgut zunächst vorhandenen wenigen Komponenten. Die einsetzende Proteinsynthese verbraucht die Pool-Aminosäuren, sodaß in einigen Fällen, besonders in den Sorten "Hanno" und "Gudin" eine Verringerung des Pools beobachtet wird. Verstärkte Anlieferung freier Aminosäuren aus Reserveproteinen wie auch Synthesen in Verbindung mit dem Einsetzen

¹ H. REINBOTHE, *Ergeb. Biol.* **25**, 33 (1962).

² K. MOTHES, *Naturwissenschaften* **53**, 317 (1966).

³ F. C. STEWARD, R. G. S. BIDWELL und E. YEMM, *J. Exptl. Botany* **9**, 11 (1958).

⁴ R. G. S. BIDWELL, R. A. BARR und F. R. S. STEWARD, *Nature* **203**, 367 (1964).

⁵ A. OAKS, *Plant Physiol.* **40**, 142 (1965).

⁶ J. M. HOLLEMAN und J. L. KEY, *Plant Physiol.* **42**, 29 (1967).

der Nitratassimilation sind offenbar der Grund für die Ausweitung des Pools im weiteren Verlauf der Keimung. Der Aufbau des Pools erfolgt demnach mit einer Art "lag-Phase".

In den untersuchten Stadien wird die Glutaminsäure (Nr. 10) besonders intensiv genutzt, wie ihr Anteil am Pool während der Keimung verglichen mit den Ausgangswerten anzeigt, der besonders in den Winterformen zurückgeht. Beim Sommerweizen ist diese Tendenz nicht so ausgeprägt. Die Glutaminsäure ist die erste, leicht faßbare Verbindung bei der Assimilation anorganischen Stickstoffs, wie aus Untersuchungen mit ^{15}N hervorgeht.⁷⁻⁹ Sie ist Ausgangspunkt von Synthesketten und wird wie auch ihr Abkömmling, die γ -Aminobuttersäure (Nr. 27), in Transaminierungsreaktionen bevorzugt genutzt.¹⁰ Daher scheint der Anteil der Glutaminsäure am Pool der freien Aminosäuren ein Indikator für die Intensität des Stickstoffwechsels und der Stickstoffversorgung zu sein. Ob der beim Sommerweizen beobachtete höhere Glutaminsäureanteil eine intensivere Stickstoffassimilation anzeigt und für Sommerformen charakteristisch ist, müssen weitere Untersuchungen klären. Ein wesentlich geringerer Verbrauch der Glutaminsäure ist kaum denkbar.

Das in den Samen zunächst in vergleichsweise hoher Konzentration vorhandene Tryptophan verschwindet bereits nach zwei Tagen bis auf Spuren. Es ist unwahrscheinlich, daß Tryptophan als Speicher löslichen Stickstoffs fungiert. Als Substrat für die Synthese von Indolylessigsäure kann es in Erwägung gezogen werden. Da Indolylessigsäure auf der Ebene der Nukleinsäuren in die Proteinsynthese eingreift,^{11,12} indem sie die Abgabe von Kern-RNS stimuliert, kann mit einem hohen Bedarf während der Keimung gerechnet werden, der aus freiem Tryptophan relativ schnell gedeckt werden könnte. Allerdings scheint die Biosynthese von Indolylessigsäure aus Tryptophan noch strittig zu sein.¹³

Durch Inkubation von 2 Tage bei 24° gekeimten Samen bei 2° wird bereits nach kurzer Zeit eine deutliche Anreicherung aller Pool-Aminosäuren festgestellt (Sorte "Werla"). Nach drei Wochen ist die Vervielfachung der Gehalte beträchtlich. Insbesondere fällt die Anhäufung des Prolins (Nr. 11) in den Winterweizensorten auf. Beim Sommerweizen findet man schon bei 24° ein kontinuierliches Ansteigen der Prolinkonzentration. Der Effekt des Kälteeinflusses ist hier deutlich geringer. Die Vernalisierung ist mit Veränderungen von Enzymaktivitäten verbunden.^{14,15} Während der Einwirkung niedriger Temperaturen werden solchen Bedingungen angepaßte Enzyme aktiv. Die von Devay unter anderem untersuchte Ribonuklease, die während der Vernalisierung wirksam wird, deutet auf die Zerstörung vegetativer Matritzen-RNS und damit auf die Umstellung der RNS-Synthese. Mit der Umstimmung des Stoffwechsels werden die Konzentrationen verschiedener Inhaltstoffe verändert und zwar durchlaufen sie oft ein Maximum.¹⁶ In unserem Fall, der gekeimten Samen, können wir feststellen, daß durch eine Temperaturerniedrigung eine Ausweitung des Pools freier Aminosäuren eintritt, sodaß für Synthesen, die mit der Umstimmung des Stoffwechsels verbunden sind ein umfangreicheres Substrat zur Verfügung steht. Hierbei kommt offenbar die Wirkung von Enzymen und Enzymsystemen zum Ausdruck, die während der Vernalisierung aktiv werden. Darauf deutet unter anderem das außerordentlich starke

⁷ R. MACVICAR und R. H. BURRIS, *Biol. Chem.* **176**, 511 (1948).

⁸ F. S. EBERTS, JR., R. H. BURRIS und A. J. RIKER, *Plant Physiol.* **29**, 1 (1951).

⁹ E. C. COCKING und E. W. YEMM *New Phytologist* **60**, 103 (1961).

¹⁰ W. L. KRETOVICH, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **16**, 141 (1965).

¹¹ A. DATTA und B. B. BISWAS, *Experimentia* **21**, 633 (1965).

¹² R. ROYCHOUDHURY, A. DATTA und S. P. SEN, *Biochim. Biophys. Acta* **107**, 346 (1965).

¹³ M. H. ZENK, *Fortschr. Botan.* **28**, 86 (1966).

¹⁴ M. DEVAY, *Acta Agri. Hung.* **14**, 276 (1965).

¹⁵ M. DEVAY, *Acta Agri. Hung.* **15**, 367 (1966).

¹⁶ M. DEVAY, *Sympos. Genetics and Wheat Breeding, Martonvásár, Hungary* (1962).

ABB. 1. NINHYDRIN POSITIVE VERBINDUNGEN IN KEIMENDEN SAMEN.

Konzentration (Mol/g Trockensubstanz, mit 5×10^{-8} Mol beginnend) der bisher gefundenen 33 Ninhydrin positiven Verbindungen in logarithmischem Maßstab in der Reihenfolge ihres Erscheinens im Chromatogramm auf einer kreisförmigen Abszisse aufgetragen. Bisher nicht identifizierte Verbindungen sind in Norleucinäquivalenten angegeben. In geringen Mengen vorkommende Komponenten sind mit "+" gekennzeichnet. "—" bedeutet nicht nachweisbar.

Verbindungen	
Nr.	Nr.
1 X ₋₃₅ Unbekannte erscheint 35 Min vor Asparaginsäure	18 Methionin
2 X ₋₃₀ Unbekannte 30 Min vor Asparaginsäure	19 X ₁₁₅ Unbekannte 115 Min nach Asparaginsäure
3 X ₋₂₅ Unbekannte 25 Min vor Asparaginsäure	20 X ₁₂₅ Unbekannte 125 Min nach Asparaginsäure
4 X ₋₁₀ Unbekannte 10 Min vor Asparaginsäure	21 Isoleucin
5 X ₋₅ Unbekannte 5 Min vor Asparaginsäure, evtl. Methioninsulfoxid	22 Leucin
6 Asparaginsäure	23 Tyrosin
7 Threonin	24 Phenylalanin
8 Asparagin, möglicherweise geringe Mengen Glutamin enthaltend	25 X ₁₈₅ Unbekannte 185 Min nach Asparaginsäure
9 Serin	26 X ₁₉₀ Unbekannte 190 Min nach Asparaginsäure
10 Glutaminsäure	27 γ -Aminobuttersäure
11 Prolin	28 Ornithin
12 X ₄₅ Unbekannte 45 Min nach Asparaginsäure	29 X ₂₄₅ Unbekannte erreicht 245 Min nach Asparaginsäure
13 Glycin	30 Lysin
14 Alanin	31 Histidin
15 X ₈₀ Unbekannte 80 Min nach Asparaginsäure, möglicherweise α -Aminobuttersäure	32 Tryptophan
16 Valin	33 Arginin
17 X ₉₅ Unbekannte 95 Min nach Asparaginsäure	

Entwicklungsstadien

Saatgut	im Handel erhältliches Hochzuchtsaatgut (Ernte 1965).
2 Tage	Die Samen wurden 2 Tage bei 24° gekeimt.
4 Tage	4 Tage bei 24° gekeimt.
2 Tage 24°	
3 Tage 2°	Nach 2 Tagen Keimung bei 24° wurden die Samen 3 Tage bei 2° inkubiert.
2 Tage 24°	
21 Tage 2°	Nach 2 Tagen Keimung bei 24° wurden die Samen 21 Tage bei 2° inkubiert.

Ansteigen des Prolins im Vergleich zu den anderen Komponenten des Pools. Die Relation zwischen Prolin und den anderen Aminosäuren verändert sich im Sommerweizen am wenigsten.

Es ist nicht anzunehmen, daß die Erhöhung der Konzentration der Pool-Aminosäuren eine Folge erhöhter hydrolytischer Aktivität auf Reserveproteine des Endosperms ist, die einen hohen Anteil an Glutaminsäure enthalten.^{17,18} Die Glutaminsäurekonzentration bleibt auch bei 2° relativ niedrig. An Hand des Verhaltens der Glutaminsäure kann angenommen werden, daß unter den herrschenden Bedingungen eine recht intensive Umwandlung der aus Reserveproteinen frei werdenden Aminosäuren erfolgt, in deren Verlauf besonders Glutaminsäure verbraucht wird. Dabei scheinen Transaminierungsreaktionen zu überwiegen.^{19,20}

AMINOSÄUREN IN BLÄTTERN VERSCHIEDENER ENTWICKLUNGSSTADIEN

Wie aus Abb. 2 ersichtlich, nimmt der Aminosäurepool mit fortschreitender Entwicklung ab. Die Abnahme erfolgt jedoch nicht bei allen Komponenten gleichsinnig. Das Asparagin verschwindet während des Wachstums der Pflanze entweder vollständig oder bis auf Spuren. Auch das Prolin wird intensiv genutzt. Tryptophan tritt zu Anfang in den Blättern der Winterweizensorten auf und läßt sich später nur in Spuren nachweisen, wie es beim Sommerweizen von Anfang an der Fall ist. Glycin (Nr. 13) nimmt während der Vegetationsperiode deutlich ab, während sich die Konzentration des Alanins (Nr. 14) viel weniger ändert. Man ist geneigt, das Verhältnis dieser beiden Aminosäuren in den Blättern als eine charakteristische Größe für den jeweiligen Entwicklungszustand zu betrachten.

In allen untersuchten Entwicklungsstadien wird ein relativ hoher Glutaminsäurewert gefunden. Die Blätter lassen demnach keinen besonders starken Verbrauch der Glutaminsäure erkennen. Die vorliegenden Ergebnisse betreffen Pflanzen, die entweder noch nicht in der Phase intensiven Streckungswachstums waren oder das Streckungswachstum weitgehend abgeschlossen hatten. Es ist denkbar, daß während des Schossens eine intensivere Nutzung des Glutaminsäurepools erfolgt und ein anderes Bild erhalten wird.

Ein Vergleich der Pool-Aminosäuren in Blättern vernalisierter und nicht vernalisierter Pflanzen macht wiederum die Bedeutung des Prolins bei Vernalisierungsprozessen offenkundig. Abgesehen von höheren Konzentrationen fast aller Komponenten des Pools, insbesondere von Asparagin, in den eine Woche alten Pflanzen fällt das sehr unterschiedliche Auftreten von Prolin in vernalisierten und nicht vernalisierten Pflanzen auf. Entsprechend seinem geringen oder nicht vorhandenen Vernalisationsbedürfnis weicht die Konzentration des Prolins in vernalisierten und nicht vernalisierten Blättern des Sommerweizens am wenigsten von einander ab. Die Untersuchungen von Trione *et al.*²¹ ergaben ähnliche Ergebnisse wie die hier beschriebenen. Die Auswirkung der Vernalisierung auf die Konzentration des Prolins in den Blättern war beim Winterweizen viel stärker als beim Sommerweizen.

Das Prolin ist für den Stoffwechsel wachsender Pflanzen von besonderer Bedeutung. Steward und Bidwell²² unterschieden bei Untersuchungen mit Gewebekulturen zwischen aktiven Zytoplasmaproteinen ("active moiety"), die einem intensiven Umsatz unterliegen

¹⁷ T. B. OSBORNE, *Vegetable Proteins*, 2. Aufl. Longmans, Green, New York.

¹⁸ R. BLOCK und D. BOLLING, *The Amino Acid Composition of Proteins and Foods*, 2. Aufl. Springfield, Ill. (1951).

¹⁹ W. E. SPLITSTOESSER, *Plant Cell Physiol.* 7, 711 (1966).

²⁰ W. E. SPLITSTOESSER, *Phytochem.* 6, 933 (1967).

²¹ E. J. TRIONE, J. L. YOUNG und M. YAMAMOTO, *Phytochem.* 6, 85 (1967).

²² F. C. STEWARD und R. G. S. BIDWELL, *J. Exptl Botany* 9, 285 (1958).

und inerten Zytoplasmaproteinen ("inactive moiety"), die wenig oder gar nicht metabolisiert werden und reich an Prolin und Oxyprolin sind. Prolin wird demnach in Strukturproteine eingebaut und möglicherweise in situ zu Oxyprolin hydroxyliert. Solche Proteine können mit dem Kollagen tierischen Gewebes verglichen werden.^{23, 24}

Shvedskaya und Kruzhilin²⁵ konnten in verschiedenen Objekten eine Akkumulation von freiem Prolin während der Vernalisierung feststellen. Während des anschließenden Wachstums wurde das Prolin weitgehend verbraucht. Die Bedeutung des Prolins bei der Befruchtung (Wachstum von Pollenschläuchen) kann gleichfalls in diesem Zusammenhang erwähnt werden.²⁴

Die Blätter der im Frühjahr ausgesäten Pflanzen der Sorte "Werla" haben einen ähnlich niedrigen Prolinspiegel wie die der unter konstanten Bedingungen bei 24° gezogenen Pflanzen. Bei der Probenahme waren die Pflanzen 5 Wochen alt. Die Konzentration aller Aminosäuren ist gegenüber den jungen Freilandpflanzen sehr viel niedriger. Die Amidkomponente ist nur in Spuren nachweisbar. Auch bei vegetativem Wachstum wird demzufolge der zunächst recht umfangreiche Pool verbraucht. Die im Herbst ausgesäten Pflanzen derselben Sorte waren zur Zeit der ersten Probenahme etwa 6 Monate alt, hatten aber, verglichen mit den 5 Wochen alten Pflanzen der Frühljahrsaussaat, einen mehrfach höheren Gehalt aller Komponenten des Pools. Während der Einwirkung niedriger Temperaturen wird offenbar auch in den Blättern, ähnlich wie in den keimenden Samen, der Aminosäurepool ausgeweitet, um während des anschließenden Wachstums genutzt zu werden.

Die Amidkomponente in den Blättern besteht hauptsächlich aus Asparagin. Bei der chromatographischen Bestimmung der Säureamide erscheinen Glutamin und Asparagin in einem "peak".²⁶ Aus dem Verhältnis der gemessenen maximalen Extinktionen bei 440 nm und 570 nm kann der Anteil der beiden Säureamide errechnet werden.²⁷ Die Berechnung wird allerdings schwierig, wenn der "Amid-peak" gegenüber den übrigen Gliedern des Pools klein ist. Daher wird in solchen Fällen am besten nicht zwischen Asparagin und Glutamin unterschieden. Kleine Mengen an Glutamin in einem überwiegend aus Asparagin bestehenden "peak" sind gleichfalls schwer zu erfassen. Möglicherweise ist in allen Proben mit der Anwesenheit geringer Mengen an Glutamin zu rechnen.

Wie schon erwähnt, betrifft die Nutzung des Pools in den Blättern das Asparagin in hervorragendem Maße. Schon frühzeitig (Piria, Pasteur, Boussingoult, Pfeffer) fand man das Asparagin bevorzugt in jungen Pflanzen,²⁸ während es in älteren nicht nachzuweisen war. Es lag daher nahe, das Asparagin als die Transportform organischen Stickstoffs anzusehen. Die Tatsache, daß es vor allen anderen Komponenten der Pools so intensiv genutzt wird spricht sicher für seine Bedeutung bei der Verlagerung des Stickstoffs aus den Blättern in die wachsenden Pflanzenteile. Ob es aber unverändert dorthin gelangt oder ob die Amidgruppe während des Transports in Leitungsbahnen bei Umsetzungen, die in diesem Zusammenhang erfolgen können, auf andere Transportmetaboliten übertragen wird, ist ungewiß.

²³ F. C. STEWARD, J. K. POLLARD, A. A. PATELETT und B. WITKOP, *Biochim. Biophys. Acta* **28**, 308 (1958).

²⁴ E. A. BRITIKOV, S. A. VLADIMITSEVA und N. A. MUSATOVA, *Soviet Plant Physiol.* (engl. Übersetzg.) **12**, 839 (1965).

²⁵ Z. M. SHVEDSKAYA und A. S. KRUSHILIN, *Soviet Plant Physiol.* (engl. Übersetzg.) **13**, 748 (1966).

²⁶ H. LORENZ, *J. Chromatog.* **27**, 267 (1967).

²⁷ H. W. HOLY, 4th Amino Acid Colloq. Technicon Instruments Co. Ltd. p. 40. Chertsey, Surrey (1966).

²⁸ K. MOTHES, in W. RUHLAND, *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, VIII, 716. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1958).

AMINOSÄUREN IM WACHSENDEN UND REIFENDEN KORN

Die in Abb. 3 dargestellten Werte für die einzelnen Komponenten des Pools lassen die in jungen Körnern zunächst sehr hohe Konzentration einer Vielzahl Ninhydrin positiver Verbindungen erkennen, die im Lauf des Wachstums und der Reife abnimmt. Als Bezugsbasis wurde auch hier das Trockengewicht gewählt, um die Konzentrationsunterschiede während der Entwicklung deutlich zu machen.

Nicht bei allen untersuchten Sorten ist die höchste Konzentration der freien Aminosäuren im ersten Stadium zu finden. Die Sorte "Hanno" weist die höchsten Werte erst am 1.7. auf, wo bei den übrigen Varietäten bereits ein Abklingen zu erkennen ist. "Hanno" hat am 1.7. noch einen relativ niedrigen Glutaminsäurewert, der in den Sorten "Rabe" und "Werla" zu dieser Zeit höher liegt. In der Sorte "Gudin" steigt der relative Anteil der Glutaminsäure am Pool vom 21.6. zum 1.7. nur geringfügig.

Auf die Bedeutung der Glutaminsäurekonzentration im Vergleich zu den anderen Komponenten des Pools wurde bereits eingegangen. Die Situation in den jungen Körnern ähnelt der in den Keimungsstadien. Neben der Umsetzung vor allem in Transaminierungsreaktionen, könnte man auch an einen bevorzugten Verbrauch der Glutaminsäure in der einsetzenden Samenproteinsynthese denken, die reich an Glutaminsäure sind.^{17, 18} Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß die Entnahme von Glutaminsäure für die Synthese von Samenproteinen in frühen Stadien sehr viel intensiver sein soll als in den folgenden. Wir neigen daher eher zu der Annahme, daß die verstärkte Nutzung des Glutaminsäurepools vor allem durch Transaminierungsreaktionen oder Umwandlungen in andere Glieder des Pools während Phasen der "Poolbildung" bedingt ist.

Der Verbrauch an Glutaminsäure wird in den frühen Entwicklungsstadien offensichtlich nicht durch Stickstoffnachlieferung kompensiert. Im weiteren Verlauf der Kornbildung steigt ihr Anteil am Pool in den meisten Fällen beträchtlich. Der Bedarf ist anscheinend nicht mehr so hoch wie zu Anfang. Sie wird zeitweilig neben Alanin zu der stärksten Komponente. Währenddessen deutet die Abnahme der anderen Poolkomponenten auf deren stärkeren Verbrauch. Erst gegen Ende der Vegetationsperiode fällt der Glutaminsäureanteil.

In diesen Stadien werden Asparagin und Asparaginsäure zu den hervorragenden Pool-Aminosäuren, die sich wie typische Speicher löslichen Stickstoffs verhalten. Zu Beginn der Kornentwicklung, während des "Poolaufbaus" sind sie in hoher Konzentration vertreten, zwischenzeitlich tritt eine deutliche Abnahme ein während des Ansteigens der Glutaminsäurekonzentration; mit deren Rückgang nimmt ihre Konzentration wieder zu. Sie machen im reifen Korn den Hauptanteil löslichen Stickstoffs aus.

Auch in den sich entwickelnden Körnern wird die Bedeutung des Prolins für junge, wachsende Gewebe deutlich. Der zu Anfang sehr umfangreiche Pool freien Prolins wird während der Ausbildung des Korns intensiv genutzt. Offenbar wird Prolin beim Aufbau von Strukturproteinen, aber auch von Reserveproteinen im Endosperm verbraucht, die reich an Prolin sind.

Nach Steward und Bidwell²² wird Prolin im Gegensatz zu anderen Aminosäuren (Glutaminsäure, Asparaginsäure, Threonin) direkt in Proteine eingebaut. Jedoch wurden nicht mit allen Pflanzenorganen und Geweben übereinstimmende Befunde erzielt.²⁹

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß der direkte Einbau von Pool-Aminosäuren in Proteine von ihrer Stellung in Stoffwechsel abzuhängen scheint. Endglieder von Biosyntheseketten (z.B. Valin, Isoleucin, Leucin wie auch Prolin) werden unmittelbar bei der

²⁹ F. C. STEWARD und R. G. S. BIDWELL in J. F. HOLDEN (editor) *Amino Acid Pools*, p. 667. Elsevier, Amsterdam (1962).

Synthese von Proteinen genutzt, während die Anfangsglieder von Syntheseketten (z.B. Glutaminsäure, Asparaginsäure) zu einem großen Teil im intermediären Stoffwechsel metabolisiert werden.^{5, 30, 31}

Die zu Anfang sehr hohe, gegen Ende der Vegetationsperiode aber fast verschwindende Konzentration von γ -Aminobuttersäure läßt auf ihre besondere Rolle in jungen Geweben schließen. Steward *et al.*³² fanden diese Aminosäure in wachsenden Gewebekulturen in erhöhter Konzentration im Vergleich zu ruhenden Geweben. Cocking und Yemm⁹ schreiben der γ -Aminobuttersäure eine wichtige Funktion bei der Assimilation von Stickstoff zu. Sie scheint jedoch, nach der Verteilung von ¹⁵N zu urteilen, ein Abkömmling der Glutaminsäure zu sein. Die Aktivitätsverhältnisse bei der Verwendung von ¹⁴C Glutamin legen den umgekehrten Syntheseweg nahe.^{3, 33} Demnach ist γ -Aminobuttersäure sowohl als Kohlenstoffdonator als auch als Aminogruppendonator zu betrachten.

Ähnlich wie γ -Aminobuttersäure verhalten sich auch Serin und Threonin. Insbesondere Serin tritt zu Anfang in hoher Konzentration auf, während es im reifen Korn nur in geringer Menge nachweisbar ist.

In den jungen Körnern findet sich eine Reihe von Komponenten vor der Asparaginsäure (Nr. 1–5), die bisher nicht identifiziert werden konnten. Ihr sehr frühes Erscheinen im Chromatogramm deutet auf ihren relativ sauren Charakter. Möglicherweise sind phosphorylierte Ninhydrin positive Verbindungen darunter. Produkt X₋₅ (Nr. 5) ist eventuell mit Methioninsulfoxid identisch, das an derselben Position liegt.

Tryptophan ist zu Anfang gar nicht (Sommerweizen) oder nur in Spuren nachzuweisen (Winterweizen) und steigt im Laufe des Wachstums und der Reife des Kornes. Die in der späten Milchreife erreichte Konzentration bleibt auch im voll ausgereiften Korn mehr oder weniger erhalten. Ansteigende Tryptophanwerte sind offensichtlich charakteristisch für die Reifungsprozesse in dem untersuchten Material. Auf den hohen Tryptophangehalt im Saatgut und seine mögliche Bedeutung als Ausgangssubstrat für die Indolylessigsäuresynthese wurde bereits hingewiesen.

In späteren Entwicklungsstadien fällt das Ansteigen des Isoleucins (Nr. 21) vor allem in den Sorten "Carstens VI" und "Werla" auf. In den übrigen Varietäten, bei denen die letzten Stadien nicht untersucht wurden, ist das relative Ansteigen von Isoleucin noch nicht so erkennbar. Im Saatgut war Isoleucin in weitaus geringerem Umfang vertreten. Es scheint während "Nachreifeprozessen" nach der Ernte abgebaut zu werden.

Ähnlich wie Isoleucin verhält sich Produkt X₋₅ (Nr. 5) in denselben Sorten. Zunächst vermindert sich seine Konzentration, um mit zunehmender Reife anzusteigen.

Wenn auch in allen Sorten ein mehr oder weniger ähnliches Verhalten der Pool-Aminosäuren während des Wachstums und der Reife des Kornes festgestellt werden konnte, so finden sich doch zwischen den untersuchten Sorten Konzentrationsunterschiede. Darüber hinaus treten im Breich zwischen Valin und Isoleucin Ninhydrin positive Komponenten auf, die für bestimmte Sortengruppen typisch zu sein scheinen. X₉₅ (Nr. 17) wurde nur in den ersten Entwicklungsstadien von "Rabe" und "Gudin" und in "Opal" am 1.7. gefunden. Diese drei Sorten werden zu einer besonderen Qualitätsgruppe gerechnet ("A_{II}"). "Hanno" und "Werla" (Qualitätsgruppe B_I) besitzen eine andere Komponente in diesem Bereich (X₁₁₅, Nr. 19), die regelmäßig in Spuren auftritt, in den ersten Stadien der Kornbildung aber

³⁰ K. W. JOY und B. F. FOLKES, *J. Exptl Botany* **16**, 646 (1965).

³¹ O. K. DONGALL, *Plant Physiol.* **40**, 891 (1965).

³² F. C. STEWARD, J. F. THOMPSON und J. K. POLLARD, *J. Exptl Botany* **9**, 1 (1958).

³³ F. C. STEWARD, R. G. S. BIDWELL und E. W. YEMM, *Nature* **178**, 734 (1956).

insbesondere in der Sorte "Werla" in größeren Mengen nachgewiesen werden kann. Wie weit diese Verbindungen, die möglicherweise alkohollösliche Peptide sind, da sie durch saure Hydrolyse abgebaut werden, ursächlich an einer unterschiedlichen Samenprotein-synthese beteiligt sind, müssen weitere Untersuchungen klären.

Andere bisher nicht identifizierte chromatographische Produkte liegen vor der γ -Aminobuttersäure (X_{185} , X_{190}). Vermutlich handelt es sich hier auch um alkohollösliche Peptide, die aber kaum in nennenswertem Umfang auftreten. Zwischen Ornithin und Lysin wird nur ab und zu ein "peak" registriert.

Neben den bereits erwähnten sortentypischen Unterschieden soll noch auf einige Abweichungen des Sommerweizens von den Winterweizensorten hingewiesen werden: Glutaminsäure gehört im Sommerweizen von Anfang an zu den stärksten Gliedern des Pools. Die vergleichsweise recht hohe Glutaminsäurekonzentration legt, ähnlich wie bei den keimenden Samen, den Schluß nahe, daß der Verbrauch der Glutaminsäure in Syntheseketten und Transaminierungsreaktionen durch eine intensivere N-Assimilation kompensiert wird.

Die Tryptophankonzentration ist im Sommerweizen niedriger als in den Winterweizensorten. Zu Anfang kann es gar nicht nachgewiesen werden. Umgekehrt verhält sich das Arginin. Während es in den Winterweizen fast kontinuierlich abnimmt, steigt es im Sommerweizen an und übertrifft dort in den letzten Stadien das Tryptophan.

Wie bereits bei den Versuchen mit keimenden Pflanzen und Blättern festgestellt wurde, wird im Verlauf der Entwicklung in Situationen, die vor dem Beginn besonders intensiven Wachstums liegen, der Pool freier Aminosäuren ausgeweitet, sodaß während des Wachstums ein erhöhtes Angebot für Synthesen zur Verfügung steht. In den jungen, sich entwickelnden Karyopsen ist der Pool zu Anfang umfangreich und vielgestaltig. Die einzelnen Komponenten werden aber im Laufe der Kornentwicklung nicht gleichmäßig abgerufen. Während des "Poolaufbaus" finden wir eine relativ niedrige Glutaminsäurekonzentration. Später nehmen die meisten der übrigen Pool-Aminosäuren in unterschiedlichem Maße ab. Die Verteilung des organischen Stickstoffs von der Glutaminsäure, dem zentralen Stickstoffwechselmetaboliten zur Synthese anderer Aminosäuren läßt nach und in den reifen Körnern treten nur noch wenige freie Aminosäuren in nennenswertem Umfang auf.

Eine Stickstoffzufuhr mit dem Ziel erhöhter Proteinsynthese muß demnach eine Ausweitung des Pools in den jungen Körnern anstreben, damit für die dort einsetzenden Synthesen ein möglichst umfangreiches Substrat zur Verfügung steht. Daher werden sich die weiteren Untersuchungen mit der Ausweitung des Pools durch geeignete Stickstoffzufuhr befassen und seine Auswirkung auf die Samenproteinsynthese.

Späte Stickstoffzufuhr wurde bereits von Selke³⁴ vorgeschlagen und ist heute in der landwirtschaftlichen Praxis bereits üblich. Das Verhalten der Pool-Aminosäuren, insbesondere der Glutaminsäure, scheint eine Erklärung für die praktischen Erfahrungen zu bieten und einen Ansatzpunkt für kommende Untersuchungen.

METHODISCHES

Untersucht wurden folgende Weizensorten: Winterweizen: "Carstens VI", "Gudin", "Hanno", "Rabe" und "Breustedts Werla". Sommerweizen: "Opal". Es wurde im Handel erhältliches Hochzuchtsaatgut verwendet.

Anzucht des untersuchten Materials

Für die Keimungsstadien wurden gebeizte Samen 2 bzw 4 Tage bei 24° auf Filterpapier, das mit Hoagland-Nährlosung angefeuchtet wurde, gekeimt. Bei Kältebehandlung wurden 2 Tage gekeimte Samen anschließend

³⁴ W. SELKE, *Z. Bodenk. Pflanzenern* 9, 506 (1938).

bei 2° im Kühlschrank 3 bzw. 21 Tage inkubiert. Eine Woche alte Pflanzen wurden auf Nylonnetzen, die über Gefäße mit Hoagland-Nährlösung gespannt waren, in einem 12-Stundentag angezogen. Als Lichtquelle dienten 6 Leuchtstoffröhren unterschiedlicher Lichtqualität, die im Abstand von 1 m über den Pflanzen angebracht waren.

Pflanzenmaterial, das während der Vegetationsperiode geerntet wurde, wurde in einer Vegetationshalle in Mitscherlichgefäßen kultiviert. Die Gefäße wurden zur Hälfte mit Quarzsand und Lößboden beschickt (pH 6,8 schlecht mit Kalium und Phosphat versorgt) und erhielten eine entsprechende Düngung (1,5 g N als NH_4NO_3 , 1,5 g K_2O als K_2SO_4 , 2,0 g P_2O_5 als Superphosphat) Proben wurden zu den in Abb. 2 und 3 angegebenen Daten jeweils zur gleichen Tageszeit (vormittags) entnommen und wurden ebenso wie das Material der Keimungsstadien in einem Eisschrank bei -25° aufbewahrt (nicht länger als 3 Wochen), wenn es nicht sofort gefriergetrocknet werden konnte.

Aufarbeitung

Das gefriergetrocknete Material wurde im Starmix homogenisiert und mit 80%igem Methanol extrahiert (Soxhlet 24 Std.). Die Rohextrakte wurden nach Einengung im Rotationsverdampfer in 20%igem Aceton aufgenommen, filtriert und auf eine Kationenaustauschersäule (Dowex 50; $0,8 \times 20$ cm) gegeben. Die Säule wurde mit 50–100 ml 20%igem Aceton gewaschen und anschließend mit 2 n Triäthylamin in 20%igem Aceton eluiert.³⁵ Sowohl dem fertigen Rohextrakt als auch der Wasch- und Extraktionslösung wurden 5% Thiodiglycol zugesetzt.³⁶ Bei der Herstellung des Rohextrakts aus Blättern war die Abtrennung von Chlorophyll und sonstigen lipophilen Stoffen erforderlich.

Das Sauleneluat wurde nach Einengen im Rotationsverdampfer in kleinen Bechergläsern mit Hilfe eines Heizlüfters annähernd zur Trockene gebracht (höchstens 40°). Die Proben kamen anschließend 24 Std. über P_2O_5 in einen Vakuumexsikkator und wurden dann in 10 ml NH_4 -freier 0,1 n HCl aufgenommen und im Kühlschrank aufbewahrt.

Aminosäureanalyse

Die Bestimmung der löslichen Ninhydrin positiven Verbindungen wurde in einem automatischen "Technicon"-5-Säulengerät durchgeführt. Hierbei wurde der von der Firma Technicon vorgeschlagene Puffergradient für ein 6-Stundenchromatogramm verwendet (Säulen: $0,63 \times 75$ cm, Füllung "Chromobeads" Type B). Norleucin diente als interner Standard. Folgende Modifikationen des Gradienten waren jedoch erforderlich: Der Pufferdurchsatz wurde auf 0,7 ml/min. eingestellt (ursprünglich 0,8). Dadurch verlängert sich das Chromatogramm um 15 Minuten. Statt des Zusatzes von Methanol zum ersten Puffer des Gradienten (pH 2,75) wird Isopropanol verwendet (10%). Regenerierungspuffer pH 3,1 enthält 5% Isopropanol. Zur Trennung der Säureamide von Threonin und Serin wurde ein geeigneter Gradient entwickelt.²⁶

Normalerweise wurden die Analysen nur einmal durchgeführt. Stichproben ergaben eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse im Bereich $\pm 10\%$.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung der Untersuchungen.

³⁵ C. K. HARRIS, E. TIGHANE und C. S. HAINES, *Can. J. Biochem. Physiol.* **39**, 439 (1964).

³⁶ W. G. ARMSTRONG, 4th Amino Acid Colloq. Technicon Instruments Co. Ltd., p. 45. Chertsey, Surrey (1966).