



Klaus-Peter Götz (Autor)

Untersuchungen zur Aufnahme und Verteilung von Stickstoff bei Körnerleguminosen

Klaus-Peter Götz

**Untersuchungen zur Aufnahme und Verteilung
von Stickstoff bei Körnerleguminosen**



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2126>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

1. Einleitung

In der Pflanzenernährung liegt für Stickstoff ein besonders hoher Bedarf vor. Durch Stickstoff-Düngung, die sich aus den pflanzenbaulichen Ansprüchen ergibt, wird der Ertrag am stärksten beeinflusst. Die Effektivität der N-Düngung ist u. a. von den Standortbedingungen, der Form Düngers und dem Zeitpunkt der Applikation, der Kulturart und den Wasserverhältnissen abhängig (Geisler 1988).

Die im Vergleich zu den Getreidearten in den Samen von Leguminosen vorhandenen höheren Gehalte an Proteinen stellen bedeutende Eiweissquellen für die menschliche Ernährung und für die Erzeugung tierischer Proteine dar. Allerdings sind die Erträge bei Leguminosen im Durchschnitt weltweit niedriger als bei Getreide und durch abiotische und/oder biotische Einflussfaktoren größeren Schwankungen unterworfen.

In verschiedenen Gebieten in Asien, Afrika, Ozeanien, Nordamerika und Europa treten Niederschläge zunehmend seltener oder periodisch auf, und da auch Böden mit niedriger Wasserspeicherkapazität weit verbreitet sind, ist Wassermangel ein häufig auftretender abiotischer Stressfaktor mit reduzierender Wirkung auf Wachstum und Ertrag.

Die N-Akkumulation ist bei Leguminosen eng mit der Biomasse- und Samenentwicklung korreliert. Eine bessere Charakterisierung sensitiver Phasen während der Entwicklung sollte dazu beitragen, Handlungsweisen abzuleiten, um Erträge zu stabilisieren bzw. zu steigern, aber auch um den Einfluss von Stress zu verringern. Dazu ist es auch notwendig, neue Informationen zum N-Haushalt der Pflanzen zu gewinnen.

Die Erweiterung der Kenntnisse des Verhaltens bezüglich des N-Haushaltes der Sojabohne (*Glycine max* (L.) Merr.), einer der bedeutendsten Pflanzen für die Gewinnung von Öl und Protein, und der Kuhbohne (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), einer wichtigen Leguminose in der Sub-Sahara-Region Afrikas, ist Gegenstand der vorliegenden Zusammenfassung von eigenen Arbeiten.

Für die quantitative Bestimmung der Aufnahme, der Verteilung und Verwertung des Stickstoffs innerhalb der Pflanze und unter verschiedenen Umweltbedingungen fand dabei die ¹⁵N-Tracertechnik Anwendung.

2. Zielstellung

Zunächst sollte die N-Aufnahme, N-Verteilung und N-Verwertung in Abhängigkeit von mineralischer N-Versorgung bei der Sojabohne bestimmt werden. Anhand von ^{15}N sollte außerdem ein einfacher Ansatz genutzt werden, um Veränderungen der Stickstoff-Fixierung zu quantifizieren.

Ein weiteres Ziel war es, eine Applikationsmethode zu entwickeln, die es ermöglicht, sehr geringe Mengen an ^{15}N in den Stängel ausgewählter Leguminosen zu injizieren, um die Translokation zu beliebigen Entwicklungsphasen der Pflanzen in die jeweils vorhandenen Organe (Blätter, Stängel, Wurzeln, Hülsen, Samen), bei optimaler Bewässerung und unter dem Einfluss von restriktiver Bewässerung oder Dürre, zu bestimmen. Diese Methode sollte unter kontrollierten Bedingungen, aber auch im Feldversuch anwendbar sein.

Bisher stehen kaum Informationen bei Sojabohnen zur N-Aufnahme und deren Verteilung aus tieferen Bodenschichten zur Verfügung, die für die Nährstoffversorgung bei Austrocknung oberer Bodenschichten von Bedeutung sein kann. Daher wurde nach Tiefenapplikation von ^{15}N die Wiederfindung und die Verlagerung in den oberirdischen Sprossbereich bei optimaler Bewässerung und bei Wasserdefizit untersucht. Für derartige Untersuchungen sollten außerdem Empfehlungen hinsichtlich der zu wählenden ^{15}N -Menge und ^{15}N -Konzentration, sowie für die Probensammlung abgeleitet werden.

Der Effekt von Wassermangel auf die Zusammensetzung verschiedener Pflanzenorgane der Sojabohne und auf die Verdaulichkeit im Wiederkäuerorganismus ist bisher in der Literatur nicht beschrieben. In einem Experiment sollte der Einfluss eines Bodenwasserdefizits auf die Ertragsstruktur untersucht werden, und anschließend der in situ Abbau von Trockenmasse und Stickstoff von Blättern, Hülsen und Samen quantifiziert werden.

Außerdem sollte erreicht werden, die für diese Art der Untersuchungen notwendigen Mengen an ^{15}N -Tracern - bei der Analyse von ^{15}N mittels Emissionsspektrometrie - zu minimieren, um die Kosten für hoch angereicherte und damit teure ^{15}N -Verbindungen zu verringern.

3. Literaturübersicht zu Techniken für die N-Quantifizierung

3.1. Einsatz von ^{15}N -markierten Düngemitteln und von ^{15}N -markierten Pflanzen

Eine Optimierung der Produktion von Nahrungs- und Futtermitteln lässt sich nur mit erweiterten Kenntnissen über die Prozesse im System Pflanze - Boden fortführen. Die ^{15}N -Isotopen-Technik ist dazu ein geeignetes und effektives Forschungsmittel, denn es ermöglicht Untersuchungen und Kalkulationen von N-Transformationsraten (Mineralisation, Nitrifikation, Immobilisation), N-Bilanzen, der Verlagerung von Düngemittelstickstoff im Boden, der gasförmigen N-Emission vom Boden in die Atmosphäre, der N-Aufnahme von Düngemitteln unterschiedlicher Stickstoffformen, Pflanzenrückständen und Exkrementen aus der Tierhaltung, der N_2 -Fixierung und N-Verteilungsdynamik in Pflanzen in Feld und Laborexperimenten (Abb. 1).

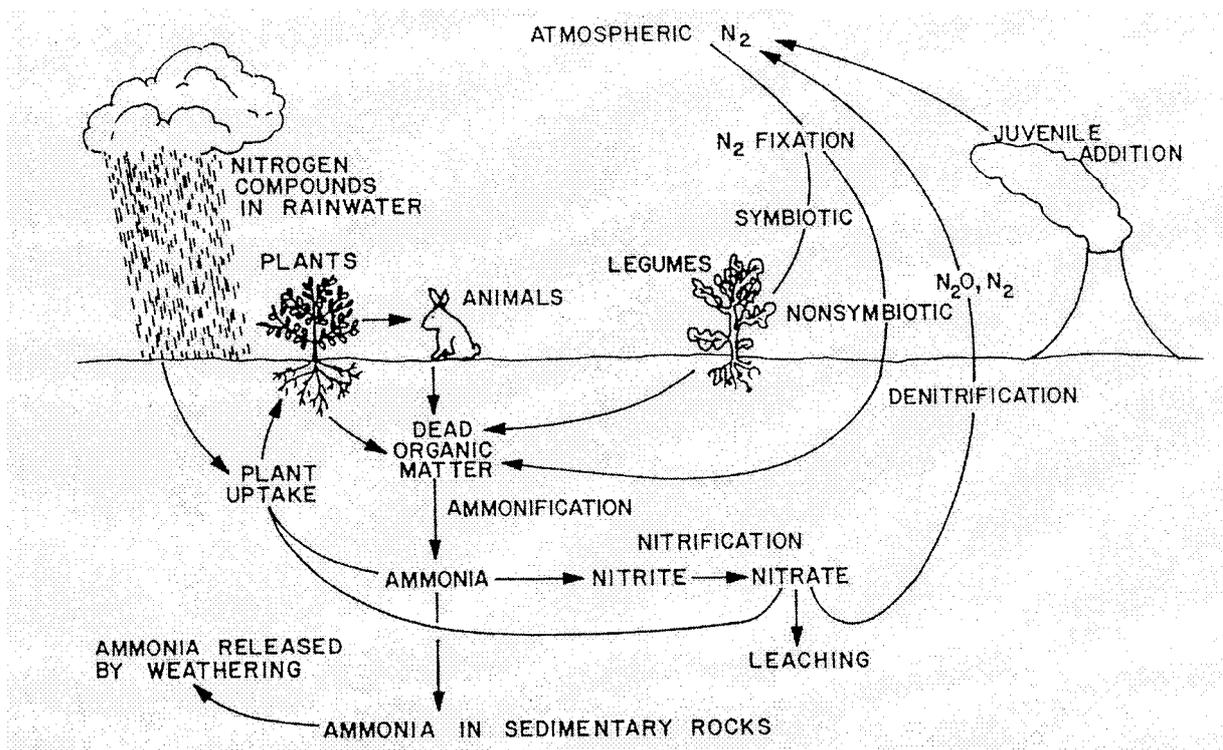


Abbildung 1: Stickstoff-Kreislauf-Kompartimente (Jackson & Row, 1973).

Für die Bearbeitung der jeweiligen Fragestellung stehen verschiedene Verbindungen, wie z.B. $^{15}\text{NH}_3$ und $^{15}\text{N}_2$ als Gase (Merbach et al., 2000), sowie am Ammonium ($^{15}\text{NH}_4^+$) (George und Singleton, 1992, Pausch et al., 1996, Viera-Vargas et al., 1995) und/oder am Nitrat markierte Verbindungen ($^{15}\text{NO}_3^-$, $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$) (Blankenau et al., 2000, Bradbury et al., 1993, Clough et al., 1999, Crozier et al., 1998, Tan et al.,

2000), aber auch ^{15}N -Harnstoff (Chotte et al., 1998) und ^{15}N -markierte Aminosäuren zur Verfügung. Die ^{15}N -Anreicherung kann von 1 Atom-% bis zu 99 Atom-% betragen. Die Eignung verschiedenster ^{15}N -Applikations-Methoden-und Formen ist dabei oft ebenso Inhalt von Forschungsarbeiten, wie z. B. der N-Metabolismus.

Bei der ^{15}N -Verdünnungsmethode, mit der z. B. Chalk (1996) die N_2 -Fixierung verschiedener Leguminosen kalkulierte, setzt man dem Boden eine bekannte Menge einer ^{15}N -markierten Substanz zu, und analysiert die Pflanzen auf den Gehalt des aufgenommenen ^{15}N . Die ^{15}N -markierte Substanz wurde nun durch den Anteil an unmarkiertem ^{14}N in ihrer Häufigkeit ‚verdünnt‘. Bei dieser Vorgehensweise ist zu beachten, dass eine zu große Verdünnung zu einer Abnahme der ^{15}N -Markierung bis zu dem Bereich der natürlichen Häufigkeit führt, und zuverlässige Messungen dann nur mittels Massenspektrometrie möglich sind. Im Boden kann die ^{15}N -Verdünnungsmethode durch biologische und chemische Reaktionen beeinflusst werden. Ihre Genauigkeit basiert auf geringen Unterschieden in der räumlichen und zeitlichen Verteilung von ^{15}N im Boden.

Im Gegensatz zu den kommerziell gehandelten ^{15}N -markierten chemischen Verbindungen sind ^{15}N -markierte Pflanzen, oder deren Organe nicht erhältlich.

Die in den Tracer-Studien anfallenden ^{15}N -markierten Pflanzen und Organe können wiederum genutzt werden, um Prozesse wie Mineralisierung (Bottner et al., 1998), Aufnahme und Immobilisierung von N organischer Herkunft zu verfolgen, aber auch um Vergleiche mit den Ergebnissen bei mineralischer ^{15}N -Applikation anzustellen (Breland und Hansen, 1998, Khan et al., 2002, Viera-Vargas et al., 1995).

3.2. ^{15}N -Markierung von Pflanzen durch Sprossapplikation

Eine direkte Möglichkeit der ^{15}N -Markierung von Pflanzen besteht in der Sprossapplikation von in Lösung befindlichem ^{15}N . Hierbei kann zwischen der Aufnahme über das Blatt oder über den Stängel unterschieden werden.

3.2.1. Blatt-Applikations-Techniken

Bei der Blatt-Applikation wurden die Lösungen mittels Sprühflasche (*Glycine max*) (Vasilas et al., 1980), oder durch das Auftragen weniger Mikroliter (20 μl bis 100 μl) in Form mehrerer Tropfen auf die Blattoberfläche (*Glycine max*, *Solanum tuberosum*) (Morris und Weaver, 1983, Witte et al., 2002), aber auch durch ‚Vernebeln‘ (5 bis 20 ml) innerhalb eines ‚Polyethylenfolien-Zeltes‘ verabreicht, und so die Pflanzen mit ^{15}N aber auch mit ^{13}C markiert (*Zea mays*) (Schmidt und Scrimgeour, 2001).

‚Verwehungen‘ während des Sprühvorgangs, unkontrolliertes Auftreten flüchtiger Anteile, die Kontamination des Bodens, Verluste durch Niederschläge und ‚Verbrennungen‘ des Blattgewebes bei zusätzlich hoher Temperatur und Einstrahlung sind einige Faktoren, die bei Applikationen dieser Art in unterschiedlichem Maß auftreten können.

MacKown und Sutton (1995) modifizierten z. B. eine ‚Reverse-flap-technique‘ zur Infusion über die laterale Blattvene bei *Nicotica tabacum*, um den Kontakt der ¹⁵N-haltigen Lösung mit dem Blattgewebe zu verhindern.

Eine weitere Form der ¹⁵N-Aufnahme über das Blatt besteht durch das Eintauchen des natürlich gewachsenen Blattes, oder einer durch Schnittform erzeugten ‚Spitze‘ aus der Blattfläche (mit oder ohne Blattvene), oder des Blattstieles in ein ¹⁵N vorrätig haltendes Reservoir. Diese Technik wurde an verschiedenen Kulturarten wie *Vicia faba*, *Vigna radiata*, *Cajanus cajan*, *Cicer arietinum*, *Triticum arvestivum*, *Trifolium repens*, *Trifolium pratense*, *Lolium perenne* praktiziert (Høgh-Jensen und Schjoerring, 2000, Khan et al., 2002).

In Abhängigkeit von der Anreicherung der ¹⁵N-Lösung, der Häufigkeit der ‚Blatt-Fütterung‘ und der vorhandenen Isotopenmeßtechnik kann bei dieser Methode nicht nur der interne ¹⁵N-Status, sondern auch die Exkretion N-haltiger Metaboliten und deren Wechselwirkungen mit dem die Wurzeln umgebenden Raum bestimmt werden.

3.2.2. Stängel-Applikations-Techniken

Die Methode der Injektion von Flüssigkeiten in den Stängel wurde primär für Untersuchungen mit Mikronährstoffen metallischer Herkunft angewandt. Es konnte dabei nachgewiesen werden, dass die Zusammensetzung von markiertem Zink oder Kupfer in Proteinfractionen aus Weizen nach der Stängel-Injektion im Vergleich zu den Kontrollpflanzen und Pflanzen, die hydroponisch kultiviert wurden, sehr ähnlich war (Grusak, 1997).

Bei der Injektion in den Stängel kommt es durch den aufwärtsgerichteten Transpirationsstrom über das Xylem zur Verlagerung zu den Pflanzenorganen, oder durch Diffusion oder Transport zum Erscheinen im Phloem, dem abwärtsgerichteten Assimilatstrom. Die chemische Form und die Injektionsmenge, die begrenzt ist, beeinflussen den Erfolg der Anwendung der Stängel-Injektion bei einmaliger ‚Puls-Markierung‘.

Beim Implantieren eines Doctes aus saugfähigem Material in die Sprossbasis, der sogenannten ‚Baumwoll-Docht-Methode‘, in enger Verbindung mit einem Reservoir mit gelöstem ^{15}N , kommt es dagegen zu einem kontinuierlichen Einstömen in den Stoffkreislauf der Pflanzen. Durch diese Methode wurden auch neue und bemerkenswerte Kenntnisse zur Rhizodeposition von Stickstoff bei Leguminosen erlangt (Russel und Fillery, 1996).

Serraj et al. (1999) nutzten eine Infusionspumpe (Flussrate: 0.5 ml h^{-1}) mit drei Kanülen, die in den oberen drei Internodien des Hauptsprosses fixiert waren, um gelöste Ureide über einen mehrtägigen Zeitraum in den Pflanzenorganismus zu infundieren.

Bei der Auswahl der Applikationsmethode ist es in jedem Fall erforderlich, die Mechanismen und Kreisläufe des interessierenden Nährstoffs im Zusammenhang mit den zu untersuchenden Pflanzen zu berücksichtigen

4. Angewandte Methoden der ^{15}N -Applikation und Untersuchungstechniken

Stickstoff wird von Leguminosen unabhängig von der Form, in der er aufgenommen wurde (NO_3^- , NH_4^+ , N_2), zu NH_4^+ bzw. NH_3 reduziert (Abb. 2), und innerhalb der Pflanze dann in Form von Aminosäuren, Amiden, Aminen, organischen N-Verbindungen, aber z. T. auch als Peptide und Alkaloide transportiert. Über weitere Synthesewege entstehen hieraus hoch molekulare Fraktionen, wie Proteine (Baustoff, Reserve- und funktionelles Eiweiß), Nucleinsäuren und Vitamine.

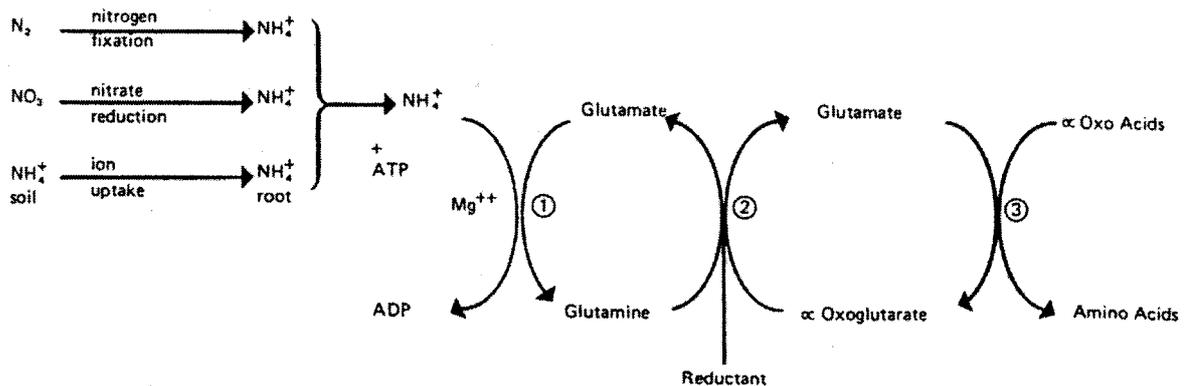


Abbildung 2: Die Assimilation von Ammonium aus verschiedenen N-Quellen. Enzyme: 1 Glutamin-Synthetase, 2 Glutamat-Synthetase (GOGAT), 3 Transaminase (nach Mifflin, 1975, in Clark & Rosswall, 1981).

Diese zentrale Stellung des Ammoniums im N-Metabolismus war der Grund für die Auswahl von ^{15}N markierten Ammonium-Salzen für die durchgeführten Untersuchungen. Anwendung fand $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ mit 96.4 Atom-% ^{15}N und $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ mit 95.0 Atom-% ^{15}N (Chemotrade GmbH, Leipzig).

Eine Auswahl an Begriffen, Symbolen und Einheiten (Faust et al., 1981), die bei der ^{15}N -Tracertechnik verwendet werden, sind in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1: Begriffe, Symbole und Einheiten in der ^{15}N -Tracertechnik.

Symbol	Bezeichnung	Einheit
a	^{15}N -Häufigkeit	1
a'	^{15}N -Exzeshäufigkeit	1
a ₀	natürliche ^{15}N -Häufigkeit (0.366 Atom-%)	1
m	Masse eines Elementes oder einer Verbindung	g
m (15)	^{15}N -Masse	g
m (15)'	^{15}N - Exzessmasse	g
m _N	Stickstoffmasse	g
M	Molmasse	g pro Mol
z	Anzahl der N-Atome (markiert)	1

Um die Aufnahme von ^{15}N markiertem Ammonium über die Wurzeln in Abhängigkeit von der N-Versorgung (2, 4 und 8 mM N), die Verlagerung in die Organe, aber auch um die N_2 -Fixierung anhand von ^{15}N zu quantifizieren (siehe Kapitel 5.1), erhielten die Pflanzen einmalig 7, 14 bzw. 28 mg ^{15}N in Form von $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ mit 96.03 Atom-% ^{15}N . Da die Zone der ^{15}N -Anreicherung mit zunehmender Tiefe unter Feldbedingungen abnimmt (siehe Abb. 6a-c), wurde die Tracermenge in 500 ml Flüssigkeit verabreicht, um zum Zeitpunkt der Pulsmarkierung eine gleichmäßige Verteilung über den gesamten durchwurzelteten Raum zu erzielen. Dazu wurden 156.5, 313.0 bzw. 626.0 mg $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ in 2 L deionisiertem Wasser gelöst.

Die interne Bedeutung des die Sprossbasis ‚erreichenden Stickstoffs‘ und von hier aus in verschiedene Organe translozierten N lässt sich anhand von Spross-Applikationen bewerten. Dazu wurden 1.509 g $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ mit 94.63 Atom-% ^{15}N mit deionisiertem Wasser im Meßkolben auf 10 ml aufgefüllt (siehe Kapitel 5.2 bis 5.4). Nach der Einteilung in 2 ml Portionen wurden diese bei $-18\text{ }^\circ\text{C}$ bis zum Verbrauch aufbewahrt. Die Injektion von 25 μl entsprach dann einer Applikationsmenge von 1 mg ^{15}N . Sie erfolgte mittels Mikroliterspritze (Nadeldurchmesser: 330 μm) lateral in die Stele im Bereich der Sprossbasis.

Um von Wurzeln die Kapazität der N-Aufnahme aus tieferen Bodenschichten zu bestimmen, wurden für Tiefen-Applikationen (siehe Kapitel 5.5) 0.961 g (500 ppm ^{15}N ; 10 mg ^{15}N pro 20 ml) bzw. 3.846 g (2000 ppm ^{15}N ; 40 mg ^{15}N pro 20 ml) $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ mit 94.63 Atom-% ^{15}N in jeweils 0.5 L deionisiertem Wasser gelöst. 20 ml dieser Lösung wurden mit einer Injektionsspritze aufgenommen und horizontal in der Mitte von Röhrengefäßen über den gesamten Durchmesser (16 cm) gleichmäßig verteilt.

Nach der Probenahme wurden die Organe aller Untersuchungen 48 h bei $60\text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, mit einer Kreuz-Schlagmühle (Fa. Culatti, Typ DFH 48) gemahlen (Siebfraktion $\leq 0.5\text{ mm}$) und der Stickstoff nach dem Kjeldahl-Verfahren bestimmt. Nach dem Aufschluss mit konzentrierter Schwefelsäure (plus Katalysator) zu Ammonium, wird nach Alkalisierung durch Wasserdampfdestillation das freigesetzte Ammoniak überdestilliert, in 20 ml einer Vorlage mit Borsäure und Tashiro-Indikator aufgefangen und durch Titration mit Salzsäure quantitativ bestimmt. Nach dem Einengen der Vorlage im Trockenschrank bei $60\text{ }^\circ\text{C}$ konnte die ^{15}N - Bestimmung erfolgen.

Die Bestimmung der relativen Häufigkeit des stabilen Stickstoffisotops ^{15}N wird bei der Isotopenanalyse mit dem Massenspektrometer oder mit optischen Geräten an molekularem Stickstoff vorgenommen.

Die emissionsspektrometrische ^{15}N -Analyse beruht auf einem optischen Isotopieeffekt, d. h. auf der Wellenlängenverschiebung von Emissionsbanden des Elektronenschwingungsspektrums der isotopen Stickstoffmoleküle. Dieses Spektrum entsteht, wenn im Hochvakuum befindlicher gasförmiger Stickstoff durch Hochfrequenz bei einer Betriebsspannung von 680 V zur Lichtemission angeregt wird. Das Stickstoffmolekül nutzt dabei die ihm zugeführte Energie zum Anheben von Elektronen auf Orbitale höheren Energiegehalts. Beim Übergang des Moleküls von diesem angeregten (energiereichen) Zustand in den ursprünglichen Energiezustand wird Licht emittiert, dessen Anteil an Schwingungsenergie stark von der Masse der beteiligten Atome abhängt.

Die ^{15}N -Analysen wurden mit dem ^{15}N -Analysator ISONITROMAT, Modell 5200, Fa. Statron, Fürstenwalde, Spree, durchgeführt. Dieses Gerät arbeitet nach dem Prinzip der emissionsspektrometrischen Isotopenanalyse mit chemischer Aufarbeitung im Gerät.

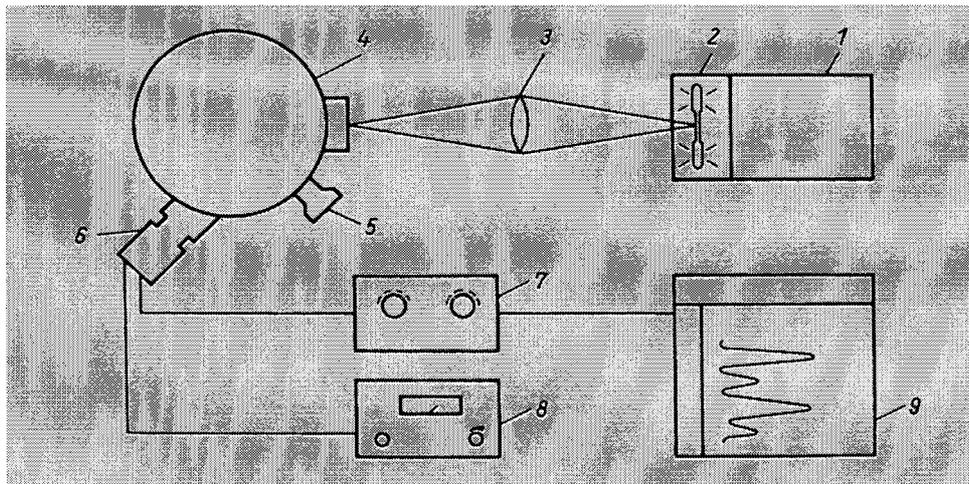


Abbildung 3: Prinzip der emissionsspektrometrischen Analyse von ^{15}N (Krumbiegel und Bornhak, 1983).

Der in Form einer Ammoniumchloridlösung (pH-Wert 1 bis 7) vorliegende Stickstoff der Messprobe, mit einer Konzentration zwischen 200 und 1000 $\mu\text{g N ml}^{-1}$ (Optimum 400 $\mu\text{g N ml}^{-1}$), wird durch Oxydation mit Natriumhypobromit in alkalischer Lösung zu N_2 umgesetzt. Das Gas wird mittels Hochfrequenz-Generator (1) (Abb. 3) im Entladungsröhrchen (2) zur Lichtemission angeregt. Anschließend wird das Licht nach Passieren einer Kondensierlinse (3) im Spiegel-Monochromator (4) in seine Spektralanteile zerlegt. Der interessierende Spektrenausschnitt wird bei 297,07 und 297,68 nm abgetastet, den dann ein Sekundärelektronen-Vervielfacher (6) in ein analoges elektrisches Signal umsetzt, welches mittels Rechner zum Endergebnis (Atom-% ^{15}N) (9)