1. Einleitung

1.1 Stickstoff als pflanzliches Nährelement

Über die Fixierung von Kohlendioxid (CO_2) in der Photosynthese sind Pflanzen in der Lage, ihren Bedarf an Kohlenstoff (C) aus der Luft zu decken. Die Aufnahme aller weiteren zum Aufbau organischer Substanz und zur Aufrechterhaltung ihrer biologischen Funktionen benötigten Nährelemente erfolgt dagegen fast ausschließlich über die Wurzel aus der Bodenlösung. Nach dem quantitativen Bedarf der Pflanze an diesen Elementen werden sie in Makronährelemente (in der Reihenfolge der benötigten Mengen: N, K, Ca, Mg, P, S) und Mikronährelemente (Cl, B, Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, Mo) eingeteilt. Die Elemente Na, Si, und Co sind in geringen Mengen wachstumsfördernd, aber nicht (oder nur für einige Spezies) essentiell („beneficial elements“) (Marschner 1995). Stickstoff (N) ist das quantitativ bedeutendste Makronährelement und stellt in den meisten natürlichen Ökosystemen den wachstumslimitierenden Faktor dar (Ellenberg 1977, Foyer & Ferrario 1994). Dagegen sorgt in intensiv bewirtschafteten Agrarsystemen der Mensch durch hohe Gaben mineralischer Stickstoffdünger für eine weitgehende Stickstoffsättigung des pflanzlichen Stoffwechsels, um maximale Erträge zu erwirtschaften. Diese anthropogenen N-Einträge gelangen letztlich in globale Stoffkreisläufe und führen zu erheblichen Schädigungen vieler Ökosysteme, z.B. durch Nährstoffungleichgewichte (Schulze 1989), Rückgang der Biodiversität (Ellenberg 1986), Stickstoffausträge ins Grundwasser (Durka *et al.* 1994) und verstärkte Freisetzung des Treibhausgases N_2O aus Böden (Granli & Bøckman 1994).

Im Boden tritt Stickstoff hauptsächlich anorganisch als Nitrat (NO_3^-) und Ammonium (NH_4^+) auf, aber auch in organischen Verbindungen, z.B. Aminosäuren. Nitrat ist leicht löslich, wogegen Ammonium meist in gebundener Form vorliegt. Pflanzen können alle diese Stickstoff-Formen nutzen, wobei in der Regel Nitrat die hauptsächliche N-Quelle darstellt. Ammoniumaufnahme dominiert in Böden, in denen durch einen niedrigen pH-Wert oder Staunässe die Nitrifikation gehemmt ist, z.B. in Nadelwäldern, Reisfeldern und der arktischen Tundra. Die Aufnahme organischer Stickstoffverbindungen spielt wahrscheinlich nur bei Pflanzen borealer und arktischer Regionen eine quantitative Rolle in der Stickstoffversorgung (Chapin *et al.* 1993, Näsholm *et al.* 1998). Transportproteine für die Aufnahme all dieser Stickstoffverbindungen aus dem Boden wurden inzwischen charakterisiert (Williams & Miller 2001, Desimone *et al.* 2002, Glass *et al.* 2002, Liu *et al.* 2003). Neben der Aufnahme aus dem Boden sind weitere Möglichkeiten der Stickstoffbeschaffung für eine Pflanze u.a. die

Symbiose mit N_2 reduzierenden Bakterien (Mylona *et al.* 1995), Carnivorie (Ellison & Gotelli 2002) oder Parasitismus (Taylor & Bruns 1997).

1.2 Assimilation von anorganischem Stickstoff

Im pflanzlichen Organismus wird Stickstoff als Bestandteil von Aminosäuren und Proteinen, Nukleotiden und Nukleinsäuren, sowie zahlreichen Sekundärstoffwechsel-Produkten benötigt. Der überwiegend in anorganischer Form aus dem Boden aufgenommene Stickstoff muß dazu unter Energieaufwand assimiliert, d.h. reduziert und in organische Verbindungen eingebaut werden. Nitrat wird in zwei Stufen zunächst zu Ammonium reduziert. Im ersten Schritt wird Nitrat durch eine Zwei-Elektronen-Übertragung zu Nitrit reduziert. Dies geschieht im Zytoplasma durch den Enzymkomplex Nitratreduktase (NR) (Solomonson & Barber 1990). Nitrit wird danach durch die Nitritreduktase (NiR) in einer Sechs-Elektronen-Übertragung in Ammonium überführt (Siegel & Wilkerson 1989). Die benötigte Reduktionsenergie stammt in den Chloroplasten grüner Blätter aus der Lichtreaktion der Photosynthese und wird über Ferredoxin übertragen. In den Leukoplasten der Wurzel stellt der oxidative Pentosephosphatweg die benötigten Reduktionsäquivalente zur Verfügung.

Aus dem Boden aufgenommenes sowie bei der Nitratreduktion oder der Photorespiration gebildetes Ammonium (Leegood *et al.* 1995) wird durch die Enzyme Glutamin-Synthetase (GS) und Glutamat-Synthase (= Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase, GOGAT) in Aminosäuren eingebaut: Die GS synthetisiert Glutamin unter ATP-Verbrauch aus freiem Ammonium und Glutamat. Glutamat wird in der GOGAT-katalysierten Reaktion durch Übertragung einer Aminogruppe von Glutamin auf α -Ketoglutarat (= Oxoglutarat) regeneriert. Insgesamt entsteht so aus je einem Molekül α -Ketoglutarat und NH_4^+ ein Molekül Glutamat. Dieses steht als Aminogruppen-Donor weiteren Synthesewegen zur Verfügung. Isoformen sowohl der GS als auch der GOGAT finden sich im Zytosol und in den Plastiden (Lam *et al.* 1996).

Obwohl die Assimilation von Ammonium wesentlich weniger metabolische Energie verbraucht, als die von Nitrat, ist eine N-Versorgung ausschließlich oder überwiegend mit NH_4^+ für die meisten Pflanzen problematisch. Ammonium ist bereits in geringen Konzentrationen zytotoxisch, möglicherweise weil es im Gleichgewicht mit freiem Ammoniak (NH_3) steht, der als Entkoppler von Protonengradienten an Membranen wirkt (Kleiner 1981). Es wird deshalb bereits in der Wurzel assimiliert (Givan 1979) und seine Konzentration im Zytosol liegt in der Regel unter 15 μ M. Höhere Konzentrationen können in der Vakuole auftreten, wo der saure pH-Wert die Bildung von NH_3 verhindert (Roberts &

Pang 1992). Ausschließliche Ammonium-Ernährung führt zu einer massiven Umstellung des Kohlenhydratstoffwechsels zugunsten der Versorgung der Wurzel mit C-Skeletten, sowie Ungleichgewichten in der Versorgung mit anderen Nährstoffionen. Daraus resultieren schwere physiologische und morphologische Störungen in der Osmo- und pH-Regulation, die als "Ammonium-Syndrom" bezeichnet werden (Chaillou *et al.* 1986, Mehrer & Mohr 1989). Im Gegensatz zu Ammonium kann dagegen Nitrat sowohl in der Wurzel als auch im Sproß assimiliert und problemlos in der Vakuole gespeichert werden (Miller & Smith 1992).

Das bei der Nitratreduktion auftretende Nitrit wirkt mutagen (Desaminierung von Adenin zu Hypoxanthin und von Cytosin zu Uracil) und darf wie Ammonium nicht in der Zelle akkumulieren (Becker *et al.* 1992). Die NR stellt deshalb den langsamsten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der gesamten N-Assimilation dar. Da außerdem Nitrat als anorganische Stickstoffquelle meistens überwiegt, kann die Nitratreduktase-Aktivität (NRA) als Maß für die N-Assimilationsaktivität der Pflanze insgesamt betrachtet werden (Lee & Steward 1978). Aufgrund des hohen Energiebedarfs der Nitratreduktion (bis zu 25 % der Energieausbeute der Lichtreaktion, Champigny 1995) und der engen Kopplung von C- und N-Metabolismus über den Bedarf an Kohlenstoffgerüsten, ATP und Reduktionsäquivalenten wird die NRA sehr genau reguliert. Dies geschieht auf Ebene der Transkription, des Proteinabbaus und der reversiblen Enzyminaktivierung durch Phosphorylierung (Solomonson & Barber 1990, Kaiser & Spill 1991). Die NR wird durch Nitrat, Licht und Kohlenhydrate induziert und durch Glutamin inhibiert, die mRNA- und Proteinkonzentration sowie die Enzymaktivität zeigen diurnale Rhythmen (Solomonson & Barber 1990, Becker *et al.* 1992, Lillo 1994).

1.3 Ferntransport von Assimilaten und Ionen in der Pflanze

Für den Ferntransport von Nährstoffen und organischen Verbindungen besitzt die Pflanze zwei Gewebetypen, das Xylem und das Phloem, die zusammen die Leitbündel bilden. Das Xylem besteht aus toten, lignifizierten Zellen, die ein ununterbrochenes Kapillarsystem darstellen, und parenchymatischen Zellen, die für die Be- und Entladung entlang der Gefäße und die transiente Speicherung von Nährstoffen zuständig sind. Bei den Angiospermen sind die Xylemgefäße in weitleumige Tracheen und englumige Tracheiden differenziert. Die in ihnen transportierte Nährstofflösung enthält vor allem Aminosäuren und andere organische Säuren (zusammen bis zu 25 mM), sowie anorganische Ionen, bei denen K^+ (ca. 25 mM), NO_3^- (bis 20 mM) und Ca^{2+} (ca. 10 mM) dominieren (Triplett *et al.* 1980). Die Ammoniumkonzentration im Xylemstrom ist sogar bei reiner NH_4^+ -Ernährung stets niedrig,

bei Mais steigt sie z.B. nie signifikant über 1 mM (van Beusichem *et al.* 1988, Engels & Marschner 1993). Obwohl Aminosäuren die häufigsten Substanzen im Xylem sind (Pate *et al.* 1977, Pate 1980), ist ihre Gesamtkonzentration dennoch ca. zehnfach kleiner als im Phloem (Lam *et al.* 1995). Angetrieben wird der Xylemstrom durch die Kapillarkräfte in den Gefäßen und die Transpiration der oberirdischen Pflanzenteile, also letztlich durch die Wasserpotentialdifferenz zwischen Atmosphäre und Boden. Im Xylem ist daher nur ein aufwärts gerichteter Transport von der Wurzel in den Sproß möglich.

Im Gegensatz zum Xylem besteht das Phloem aus lebenden Zellen, in denen eine komplexe, hochkonzentrierte Lösung transportiert wird, die neben verschiedenen Kohlenhydraten (Disaccharide, Zuckeralkohole und Oligosaccharide) auch Aminosäuren und anorganische Ionen enthält (Ziegler 1975, Zimmermann & Ziegler 1975, Lohaus *et al.* 1995, Hayashi *et al.* 2000). Anders als im Xylemsaft kommen aber weder Nitrat noch Ammonium vor (Lohaus *et al.* 1995, Lohaus *et al.* 1998). Mit einem Anteil von bis zu 90 % an der Trockensubstanz des Phloemsaftes (Hocking 1980) dominiert bei weitem das Disaccharid Saccharose. Es kann im Phloemsaft Konzentrationen bis zu 1,5 M erreichen (Lohaus *et al.* 1994, 1995) und dient in den meisten Pflanzen als Haupttransportform für Photoassimilate. Die Gesamtkonzentration von Aminosäuren im Phloem liegt dagegen bei ca. 100-300 mM (Riens *et al.* 1991, Lohaus *et al.* 1994, 1995, 1998, Lohaus & Möllers 2000). Dabei sind die Konzentrationsverhältnisse der Aminosäuren untereinander im Phloem und dem umgebenden Gewebe sehr ähnlich (Riens *et al.* 1991, Winter *et al.* 1992), woraus man auf eine unspezifische Aufnahme von Aminosäuren ins Phloem schließen kann. Die häufigsten Aminosäuren sowohl im Mesophyll als auch im Phloem sind Glutamin, Glutamat und Aspartat, die deshalb oft als Transport-Aminosäuren bezeichnet werden. Die Transportgeschwindigkeit ist im Phloem für alle Substanzen etwa gleich (Housley *et al.* 1979) und beträgt bis zu 40-100 cm h⁻¹ (Fischer 1990).

Im Phloem werden außer Assimilaten auch Phytohormone (Ziegler 1975) und Makromoleküle wie Oligopeptide, Proteine und RNA transportiert (Oparka & Santa Cruz 2000). Peptide im Phloem können der Stickstoffverlagerung dienen, häufig handelt es sich aber um Wachstumsfaktoren (Stacey *et al.* 2002). Kleinen, im Phloem transportierten RNA-Spezies wird eine Rolle bei der systemischen Aktivierung der Pathogenabwehr durch RNA-Interferenz (RNAi) zugeschrieben (Systemic Acquired Resistance, Ryals *et al.* 1996). Das Phloem dient somit nicht nur dem Stoff-, sondern auch dem Signaltransport (Ruiz-Medrano *et al.* 2001). Sogar die Weiterleitung von Aktionspotentialen im Phloem wird diskutiert (Rhodes *et al.* 1996). Auch Pflanzenviren breiten sich häufig über den Phloemstrom in der Pflanze aus (Nelson & van Bel 1998, Oparka & Santa Cruz 2000).