

Badanie przemiany azotowej w roślinach przy zastosowaniu izotopu N¹⁵

Zastosowanie w badaniach biochemicznych stabilnego izotopu azotu N¹⁵ posiada tę bezsporną wyższość nad izotopami radioaktywnymi, że w swym oddziaływaniu na żywy organizm nie różni się niczym od zwykłego azotu.

Azot zwykły o ciężarze atomowym 14,008 składa się z dwóch izotopów. Wzajemny stosunek tych izotopów w azocie występującym w przyrodzie jest zawsze identyczny: izotop o ciężarze atomowym 14 stanowi 99,61%, izotop o ciężarze atomowym 15 stanowi 0,39%.

Jeśli skład azotu występującego w przyrodzie przyjąć za jednostkę, to wszelki dodatek atomów N¹⁵ oznacza stopień wzbogacenia danego związku azotowego izotopem N¹⁵. Jeśli na przykład wzbogacimy siarczan amonu izotopem N¹⁵ dwudziestokrotnie, to związek ten będzie posiadał dwadzieścia razy więcej atomów N¹⁵ niż zwykły siarczan amonu, tj. 7,8% zamiast 0,39. Jeśli siarczan amonu, wzbogacony izotopem N¹⁵ x-krotnie, użyty zostanie jako źródło azotu do żywienia roślin, to, badając po upływie danego okresu czasu stopień wzbogacenia izotopem N¹⁵ wyodrębnionych z danej rośliny związków azotowych, można z całą dokładnością stwierdzić jak szybko azot z nawozu (w tym wypadku z siarczanu amonu) pojawia się w poszczególnych częściach rośliny, z jaką szybkością powstają w roślinie poszczególne związki azotowe, w jakiej kolejności następuje w roślinie ich synteza itp. Stwierdzić także można, w jakiej mierze w ciągu danego okresu czasu następuje odnowienie azotu jako składnika poszczególnych związków, tkanek i organów rośliny.

Zwykłe chemiczne metody analizy roślin nawet w przybliżeniu nie dają obrazu przemiany azotowej. W jednym z doświadczeń analiza chemiczna dokonana w 24 godziny po wniesieniu pod młode rośliny owsa nawozu azotowego, wzbogaconego 5-krotnie izotopem N¹⁵, wykazała, że ogólna ilość azotu zawartego w aminokwasach wynosiła 75 mg na 100 g ziel. masy. W roślinach kontrolnych, które nie otrzymały nawozu, ilość azotu aminokwasów wynosiła 71 mg. Zdawałoby się, że wniesienie nawozu azotowego nie wywarło istotnego wpływu na powstawanie aminokwasów w roślinie. Jednakże analiza izotopowa wykazała, że wskaźnik wzbogacenia tej frakcji azotu wynosił 1,95, czyli że w ciągu 24 godzin po nawożeniu nastąpiło odnowienie składu aminokwasów rośliny w wysokości 23,75%¹.

Analiza chemiczna nie mogłaby tego wykazać, ponieważ wskutek nieprzerwanie zachodzącej w roślinie przemiany materii część aminokwasów jest zużywana na syntezę białka i chlorofilu.

Zastosowanie w charakterze nawozu azotowego siarczanu amonu wzbogaconego izotopem N¹⁵ pozwoliło autorom stwierdzić na podstawie poprzednich doświadczeń, że w roślinach zachodzą nieprzerwanie procesy odnawiania się białka i chlorofilu, że panujące dawniej przekonanie o względnej stabilności białka strukturo-

¹ Procent odnowienia azotu N oblicza się według następującej formuły:
$$N = \frac{A_1 - 1}{A - 1} \cdot 100,$$

gdzie A jest stopniem wzbogacenia izotopem N¹⁵ źródła azotu (w omawianym przykładzie 5), a A₁ stopniem wzbogacenia badanego związku azotowego wykazanym przez analizę izotopową (w omawianym przykładzie stopień wzbogacenia izotopem N¹⁵ aminokwasów wyniósł 1,95).

wego jest niesłuszne, że strukturalne białka protoplazmy biorą udział w ogólnej przemianie materii w równym stopniu jak i białka zapasowe.

W niniejszej pracy autorzy podają wyniki doświadczeń wazonowych nad przemianą azotową roślin przy zastosowaniu izotopu N^{15} .

Doświadczenia wazonowe (piasek z torfem) prowadzono w hali wegetacyjnej. Pełny nawóz sztuczny (w tym 0,3 g N na wazon) dawano przed wysiewem roślin. W odpowiednim stadium rozwoju roślin dożywiano je nawozem azotowym w formie siarczanu amonu wzbogaconego izotopem N^{15} . Po upływie określonego czasu, wahaającego się w poszczególnych doświadczeniach od 6 do 120 godzin, rośliny zbierano, ważono i poddawano analizie. Jednocześnie zbierano rośliny z wazonów kontrolnych.

Pierwsze doświadczenie przeprowadzono nad owsem. W 24 dni po wschodach dożywiono go 3-krotnie wzbogaconym izotopem N^{15} siarczanu amonu w ilości 0,24 g na wazon.

Tabela 1 podaje wysokość zbioru zielonej masy i zawartość poszczególnych frakcji azotu w różnych okresach po zastosowaniu dożywiania siarczanem amonu zawierającym znakowany azot.

Tabela 1

Wysokość zbioru zielonej masy i zawartość poszczególnych frakcji azotu w różnych okresach po zastosowaniu dożywiania siarczanem amonu zawierającym znakowany azot

Czasokres, który upłynął od chwili dożywiania siarczanem amonu z N^{15} do zbioru (w godzinach)	Waga zielonej masy owsa w g na wazon	Azot poszczególnych frakcji w zbiorze zielonej masy owsa w mg na wazon				
		azot organiczny niebiałkowy	azot białek zapasowych	azot białek strukturalnych	azot chlorofilu	azot związków nieorganicznych (NH_3 i in.)
6	49,1	54,0	81,0	127,0	5,8	nie było
12	48,3	64,5	78,0	131,0	5,8	„ „
24	52,6	75,4	82,0	135,0	6,2	„ „
36	52,3	80,1	94,0	139,0	6,3	„ „
48	50,0	76,0	105,5	146,0	6,7	„ „
72	49,0	90,0	94,0	158,0	5,8	„ „
120	68,9	95,0	156,0	148,0	8,9	„ „
Kontrola bez dożywiania siarczanem amonu						
6	49,0	50,0	76,0	124,0	5,9	„ „
72	56,0	62,0	69,0	117,0	6,2	„ „

Jak widać z tabeli 1 zawartość poszczególnych frakcji azotu na ogół wzrasta w miarę upływu czasu po dożywieniu azotem. Pewne wahania w zawartości azotu przypisać należy dynamice przemiany azotowej w roślinach — powstawaniu jednych form związków azotowych kosztem rozkładu innych związków.

Wyniki analizy izotopowej poszczególnych frakcji azotu w zielonej masie młodych roślin owsa przedstawia tabela 2.

Tabela 2

Wyniki analizy izotopowej poszczególnych frakcji azotu wyodrębnionych z zielonej masy młodych roślin

Czasokres, który upłynął od chwili dożywienia siarczanem amonu z N^{15} do zbioru (w godzinach)	Stwierdzone wzbogacenie izotopem N^{15}				Zawartość znakowanego azotu* w procentach ogólnego azotu danej frakcji			
	azot organiczny niebiałkowy	azot białek zapasowych	azot białek strukturalnych	azot chlorofilu	azot organiczny niebiałkowy	azot białek zapasowych	azot białek strukturalnych	azot chl. rofilu
6	1,07	1,00	1,00	1,00	3,5	0,0	0,0	0,0
12	1,32	1,06	1,13	1,07	16,0	3,0	6,5	3,5
24	1,53	1,13	1,28	1,14	26,5	6,5	14,0	7,0
36	1,82	1,15	1,46	1,36	41,0	7,5	23,0	18,0
48	1,75	1,28	1,47	1,43	37,5	14,0	23,5	22,5
72	1,85	nie oznacz.	1,77	1,81	42,5	nie oznacz.	38,5	40,5
120	1,93	1,85	1,96	nie oznacz.	46,5	42,5	48,0	nie oznacz.

* Zawartość znakowanego azotu w przeliczeniu na trzykrotne wzbogacenie izotopem N^{15} , tj. za 100% przyjęto wzbogacenie izotopem N^{15} siarczanu amonu użytego do dożywienia owsa.

Jak widać z tabeli 2, wstępujący w roślinę azot nieorganiczny (NH_3) wchodzi w skład poszczególnych organicznych związków azotowych w określonej kolejności: najpierw następuje synteza organicznych związków azotowych niebiałkowych (aminokwasy, amidy), białka zaś powstają nieco później. Przy tym z dwóch grup substancji białkowych synteza białek strukturalnych następuje znacznie szybciej niż białek zapasowych. Wyniki te są całkowicie zgodne z doświadczeniami przeprowadzonymi z młodym żytem ozimym.

Z danych doświadczenia wynika, że oprócz syntezy nowego białka i chlorofilu w roślinach zachodzi nieprzerwanie odnawianie azotu w istniejących już „starych“ cząsteczkach białka i chlorofilu. Dowodzi tego przede wszystkim to zjawisko, że względna zawartość znakowanego azotu w białkach strukturalnych i w chlorofilu jest znacznie wyższa niż wynikałoby to z ogólnego wzrostu zawartości danej frakcji azotu w roślinie po dożywieniu jej siarczanem amonu zawierającym izotop N^{15} (porównaj tab. 2 z tab. 1).

Dane tabeli 2, dotyczące zawartości znakowanego azotu, wskazują ściśle na stopień odnowienia azotu tylko w stosunku do aminokwasów i amidów, tj. tych związków, które powstają bezpośrednio z amoniaku wyzwolonego z siarczanu amonu użytego na dożywienie. Dla ścisłego obliczenia w jakiej mierze, w danym momencie, odnowiony został azot białka i chlorofilu należałoby za punkt wyjścia brać nie stopień wzbogacenia siarczanu amonu izotopem N^{15} , a tych związków (przede wszystkim aminokwasów), które wykorzystywane są bezpośrednio do syntezy białka. Ponieważ

jednak przemiana azotowa w roślinie jest procesem ciągłym, nawet tego rodzaju obliczenia dałyby nam w pewnym momencie wielkości zbyt małe (przy wzrastającej zawartości izotopu N^{15} w aminokwasach), lub zbyt wielkie (gdy oprócz aminokwasów powstających z NH_3 siarczanu amonu, w syntezie białka zaczynają brać udział także aminokwasy powstałe z rozpadu wytworzonego wcześniej białka, jeszcze bez udziału znakowanego azotu). Z chwilą jednak gdy stopień wzbogacenia izotopem N^{15} prekursorów białka i chlorofilu, tj. niebiałkowych organicznych związków azotowych, stanie się równy stopniowi wzbogacenia białka i chlorofilu, wówczas można z całą pewnością stwierdzić, że nastąpiło już całkowite odnowienie składnika azotowego w tych ostatnich.

Obliczenia dokonane na wyżej wymienionej podstawie dają procenty odnawiania się azotu białka i chlorofilu w różnych okresach czasu po zastosowaniu dożywiania azotowego (tab. 3).

Tabela 3

*Odnawianie się azotu białka i chlorofilu
w różnych okresach czasu po zastosowaniu dożywiania azotowego (w procentach)*

Czasokres, który upłynął od chwili dożywiania siarczanem amonu z N^{15} (w godzinach)	Procent odnowienia azotu		
	w białku strukturalnym	w białku zapasowym	w chlorofilu
6	0,0	0,0	0,0
12	40,6	18,7	21,9
24	53,0	24,8	26,5
36	56,0	18,3	44,0
48	62,6	37,4	57,5
72	91,0	nie badano	95,0
120	103,0	91,0	nie badano

Jak widać z tabeli 3, proces odnawiania się azotu w białkach i chlorofilu przebiega niezwykle intensywnie. W ciągu 72 godzin następuje prawie całkowite odnowienie azotu zawartego w białku strukturalnym (91%) i chlorofilu (95%). W białku zapasowym odnowienie azotu przebiega nieco wolniej, ale i tam po 120 godzinach prawie cały azot (91%) zostaje odnowiony. Odnowienie składnika azotowego w białku i chlorofilu tylko w nieznacznym stopniu związane jest ze zwiększeniem się ilości tych substancji. Tak na przykład po 48 godzinach od chwili wniesienia nawozu azotowego ogólna zawartość azotu w białku strukturalnym zwiększyła się o 18%, w chlorofilu — o 14%, a w ciągu tego samego okresu czasu azot wchodzący w skład białka strukturalnego uległ odnowieniu w 62,6%, zaś azot chlorofilu — 57,5%.

W następnej serii doświadczeń badano intensywność odnawiania się białek i chlorofilu roślin w późniejszym stadium rozwojowym: owsa w stadium kłoszenia i tymotki przed samym kłoszeniem. Rośliny dożywiano siarczanem amonu wzbogaconym pięciokrotnie izotopem N^{15} w dawce 0,25 g N na wazon. Wyniki tych doświadczeń podaje tabela 4.

Jak widać z tabeli 4, proces odnawiania składnika azotowego w białkach i chlorofilu roślin starszych przebiega mniej intensywnie niż u roślin młodych. Dotyczy to zwłaszcza białek strukturalnych i chlorofilu. Tak na przykład u tymotki w stadium przedkłoszeniem odnowienie azotu w białkach strukturalnych nastąpiło tylko

Tabela 4

Wyniki badań intensywności odnawiania się białek i chlorofilu roślin z zastosowaniem izotopu N^{15} owsa w stadium kłoszenia i tymotki przed samym kłoszeniem

Roślina	Czasokres, który upłynął od chwili dożywienia roślin siarczanem amonu z N^{15} (w godz.) i kontrola (bez dożyw.)	Waga roślin	Zawartość poszczególnych frakcji azotu w mg N na 100 g zielonej masy				Stwierdzone wzbogacenie poszczególnych frakcji azotu izotopem N^{15}				Procent odnowionego azotu w poszczególnych frakcjach		
			azot organiczny niebiałkowy	białka strukturalne	białka zapasowe	chlorofil	azot organiczny niebiałkowy	białka strukturalne	białka zapasowe	chlorofil	białka strukturalne	białka zapasowe	chlorofil,
Owies zielona masa	48	82,4	116,6	116,5	96,8	10,4	2,90	1,91	1,98	1,44	48,0	51,6	25,2
	kontrola	82,5	50,0	85,8	73,5	10,2	—	—	—	—	—	—	—
Owies kłosy	48	16,8	271,1	332,2	153,0	14,8	—	1,80	2,23	1,48	—	—	—
	kontrola	14,7	213,6	257,6	144,3	12,6	—	—	—	—	—	—	—
Tymotka zielona masa	48	63,0	117,0	494,0	97,0	—	1,36	1,16	1,23	—	44,5	64,0	—
	120	78,0	147,0	405,0	88,0	—	2,02	1,68	1,74	—	66,7	72,5	—

w 66,7% po 120 godz., podczas gdy w młodych roślinach owsa już po 72 godz. azot uległ odnowieniu prawie w całości. Podobnie przedstawia się sprawa z chlorofilem: w młodych roślinach owsa po 48 godz. azot chlorofilu odnawia się w 60%, u tegoż owsa w stadium kłoszenia odnawiało się w tym samym okresie tylko 25% azotu. Białko zapasowe odnawia się w roślinach w późniejszym stadium rozwoju szybciej, w kłosach nawet znacznie szybciej. Związane jest to zapewne z przesuwaniem się białek zapasowych z części wegetatywnych rośliny do generatywnych.

Ogólnie można powiedzieć, że intensywność przemiany azotowej w roślinach zależy od ich stadium rozwoju. W roślinach młodych przemiana jest tak intensywna, że już po upływie kilku lub kilkunastu godzin po dożywieniu azotowym (u żyta w 2 — 4 godz.), znaczny procent białek strukturalnych (40% i wyżej) i chlorofilu (około 20%) ulega odnowieniu. Nie znamy jeszcze mechanizmu odnawiania białka i chlorofilu. Wydaje się jednak, że przy odnawianiu się białka nie zachodzi jego rozkład, a jedynie zamiana poszczególnych części składowych cząsteczki białka. Następuje to zapewne przez chwilowe otwieranie się łańcucha peptydów i włączenie aminokwasów między końcowe grupy łańcucha.

Proces samoodnawiania się białka odgrywa podstawową rolę w świecie organicznym. Dla utrzymania przy życiu struktur biologicznych niezbędne jest stałe wydatkowanie energii. Jako źródło tej energii w białkach strukturalnych organizmu służyć może stałe utlenianie wchodzących w skład białka aminokwasów. W zamian utlenionych aminokwasów w skład cząsteczki białka wchodzi nowe cząsteczki aminokwasów, co zapewnia utrzymanie białka w stanie nie zmienionym.

Pozostałe po utlenieniu aminokwasów reszty bezazotowe biorą udział w ogólnej przemianie materii zachodzącej w roślinach i w zetknięciu z dostającym się z zewnątrz lub wytwarzającym się w samej roślinie amoniakiem (przy dezaminacji aminokwasów) mogą tworzyć nowe aminokwasy.

Pomimo intensywności samoodnawiania się białek wzajemny stosunek poszczególnych aminokwasów wchodzących w skład białka nie ulega zmianom. Na tej podstawie można sądzić, że zanim nastąpi odnowienie białka muszą powstać wszystkie te aminokwasy, które wchodzą w skład cząsteczki białka.

W celu zbadania tego zagadnienia, tj. stwierdzenia z jaką szybkością i w jakiej kolejności z azotu wniesionego w postaci nawozu azotowego powstają w roślinie aminokwasy, przeprowadzono specjalne badania metodą chromatograficzną. Badania te wykazały, że synteza aminokwasów następuje w ściśle określonej kolejności: najpierw powstaje alanina, następnie aminokwasy dwukarboksyłowe — kwas asparaginowy i glutaminowy. Synteza aminokwasów podstawowych i aromatycznych następuje znacznie później. Wyniki tych badań podaje tabela 5.

Tabela 5

Wyniki badań nad młodymi roślinami owsa

Zawartość w nich poszczególnych aminokwasów w różnych terminach po wniesieniu nawozu azotowego w postaci siarczanu amonu (w mg N na 100 g zielonej masy)

Części roślin	Czasokres, który upłynął od chwili dożywienia owsa siarczanem amonu (w godz.)	Alanina	Kwas asparaginowy	Kwas glutaminowy	Asparagina	Seryna	Tryptofan	Histydyna
Korzenie	0,5	3,5	0,50	0,50	0,00	0,00	0,0	0,0
	2,0	12,2	0,50	0,50	0,00	0,00	0,0	0,0
	4,0	44,0	0,50	2,48	0,00	0,00	0,0	0,0
	20,0	18,0	3,67	3,96	7,40	0,00	0,0	0,0
	44,0	8,8	1,23	2,70	1,77	0,77	0,0	0,0
Zielona masa	0,5	ślady	ślady	ślady	0,0	0,0	ślady	0,0
	2,0	3,7	„	„	0,0	0,00	„	0,0
	4,0	7,2	„	„	0,0	0,00	„	0,0
	20,0	17,6	7,85	1,90	0,0	0,00	„	0,0
	44,0	47,3	4,03	6,33	11,7	10,75	28,2	8,7

Jak widać z tabeli 5, azot amoniakalny wstępując do korzeni roślin od razu przerobiony zostaje na aminokwasy. Już w pół godziny po zastosowaniu nawożenia azotowego w korzeniach owsa nagromadza się alanina, której ilość szybko się zwiększa, po czym równie szybko spada. Kwas glutaminowy powstaje nieco później (po 4 godz.). Jeszcze później kwas asparaginowy (po 20 godz.) i seryna (po 44 godz.). W tym okresie czasu nie stwierdzono w korzeniach syntezy tryptofanu i histydyny.

Wydaje się, że synteza alaniny i aminokwasów dwukarboksyłowych następuje bezpośrednio, drogą redukcyjnego aminowania α -ketokwasów przy zetknięciu się ich z amoniakiem. Fakt, że pierwszym aminokwasem, który powstaje w roślinach po wchłonięciu amoniaku, jest alanina, tłumaczy się tym, że podczas oddychania roślin jako stały metabolit tworzy się zawsze kwas pirogronowy, który w reakcji z amo-

niakiem daje łatwo alaninę. Po wprowadzeniu amoniaku do rośliny alanina powstaje prawie natychmiast. W warunkach laboratoryjnych powstawanie alaniny zaobserwowano po upływie 5 minut od momentu wprowadzenia amoniaku.

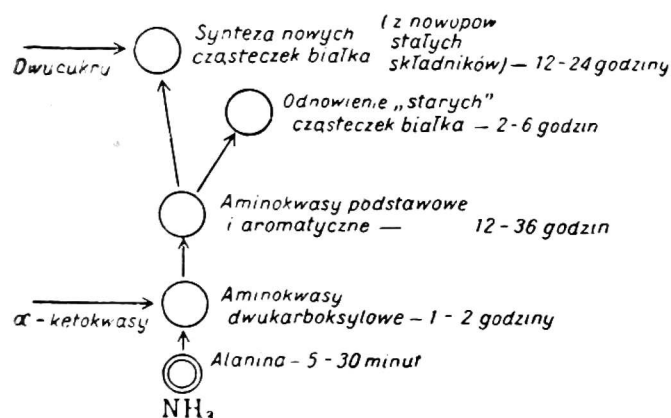
Z chwilą wyczerpania się w korzeniach rezerw α -ketokwasów, niezbędnych dla syntezy aminokwasów, dostający się z gleby amoniak nie może już być całkowicie związany w korzeniach i przechodzi do nadziemnych części roślin. W doświadczeniu z owsem syntezę alaniny w liściach zaobserwowano już po 2 godz. od momentu wniesienia nawozu azotowego. Synteza aminokwasów dwukarboksylowych nastąpiła po 20 godz., synteza tryptofanu i histydyny — po 44 godz.

Należy sądzić, że aminokwasy podstawowe i aromatyczne powstają w roślinach nie wskutek bezpośrednich reakcji amoniaku z odpowiednimi kwasami organizmu, lecz drogą transaminacji. Do wyciągnięcia takiego wniosku upoważniają autorów wyniki doświadczeń laboratoryjnych nad powstawaniem poszczególnych aminokwasów w roślinach przy ich odżywianiu w ciągu krótkiego okresu czasu roztworem amoniaku, a następnie usunięciu go z odżywczego roztworu. W doświadczeniach tych stwierdzono powstawanie tryptofanu i histydyny dopiero w 30 — 40 godz. po całkowitym zużyciu wchłoniętego przez rośliny amoniaku na syntezę alaniny i aminokwasów dwukarboksylowych.

Proces odnawiania się białka w roślinach przebiega bardzo szybko. W doświadczeniach ze znakowanym azotem stwierdzono, że już w 12 godz. po dożywieniu roślin nawozem zawierającym N^{15} , azot ten znajdował się w białku. W ciągu tego okresu nie powstają jednak jeszcze takie niezbędne dla syntezy białka aminokwasy, jak tryptofan i histydyna. Powstaje tylko alanina i aminokwasy dwukarboksyłowe. Nasuwa się wobec tego przypuszczenie, że znaczna część aminokwasów wchodzących w skład białka, a przede wszystkim aminokwasy podstawowe i aromatyczne, powstają bezpośrednio drogą transaminacji z grup aminowych alaniny i aminokwasów dwukarboksyłowych podczas procesu odnawiania się cząsteczki białkowej.

Odnawianie się białka w roślinach zachodzi stale, nawet jeśli środowisko odżywcze nie zawiera wcale azotu. Przy odżywianiu azotem, oprócz odnawiania się „starych“ cząsteczek białka, powstają nowe cząsteczki, jednakże synteza nowego białka wymaga dłuższego czasu niż odnowienie białka już istniejącego w roślinie.

Doświadczenia wykazały, że synteza nowego białka związana jest ze stratą cukrów w roślinie, co wskazuje na to, że cukry odgrywają wielką rolę w syntezie białka. Można sądzić, że białko roślinne powstaje w jakimś związku z cukrami. Z drugiej strony można też postawić hipotezę, że syntezie białka w roślinach towarzyszy intensywne utlenianie się cukrów, uwalniające energię niezbędną dla aktywacji cząsteczek aminokwasów, biorących udział w syntezie białka. Przemianę azotową u roślin przedstawić można w formie załączonego schematu.



Schemat ten jest bardzo uproszczony. Wskazuje on tylko na główne kierunki i szybkość przebiegu poszczególnych reakcji w przemianie azotowej u roślin i tylko o tyle, o ile pozwalają na to uzyskane wyniki przeprowadzonych doświadczeń.

Schemat ten jest bardzo uproszczony. Wskazuje on tylko na główne kierunki i szybkość przebiegu poszczególnych reakcji w przemianie azotowej u roślin i tylko o tyle, o ile pozwalają na to uzyskane wyniki przeprowadzonych doświadczeń.