

Lehrstuhl für Pflanzenernährung, Technische Universität München, Freising-Weihenstephan,
BR Deutschland

Aufnahme und Metabolismus von ^{15}N -markiertem Cyanamid durch Rebenstecklinge

von

K. VILSMEIER und A. AMBERGER

Uptake and metabolism of ^{15}N labelled cyanamide by cuttings of grapevine

S u m m a r y : ^{15}N labelled cyanamide was taken up from nutrient solution by rooted grapevine cuttings. Precipitable N in shoots or roots contained up to 2/3 of total supplied ^{15}N . Arginine concentrations were higher during cyanamide feeding than in controls and declined to control levels after transfer into cyanamide free nutrient solution. In arginine extracted from shoots and roots after hydrolysis with 6 M HCl and column chromatography, 6—7 % of ^{15}N originating from cyanamide was recovered.

Key words: nutrition, metabolism, growth regulator, nitrogen, isotope, amino acid, protein, root, shoot.

Einleitung

In früheren Arbeiten wiesen LATZKO und AMBERGER (1952), WÜNSCH und AMBERGER (1968, 1974) nach, daß Cyanamid (Cy) von Markstammkohl, Raps, Mais, Weizen, Sonnenblumen und Buschbohnen als Molekül über die Wurzeln aufgenommen wurde und als solches in den Pflanzen teilweise innerhalb weniger Stunden nicht mehr nachzuweisen war. Mittels Tracertechnik wurde aus dem Cyanamid stammende ^{14}C -Strahlung in der freien Aminosäure Arginin gefunden. Die Arginingehalte in den Blättern waren bei gleichzeitig deutlich verringerter Arginaseaktivität bis zu 600 % höher als in den ohne Cyanamid ernährten Kontrollpflanzen.

In neuerer Zeit wurde festgestellt, daß wäßrige Lösungen von Kalkstickstoff bzw. Cyanamid, auf das ruhende Holz von Reben ausgebracht, die Dormanz brechen können (IWASAKI und WEAVER 1977; SHULMAN *et al.* 1983; WILLIAMS 1987). Diese Beobachtung ist vor allem von Interesse für den Weinbau in Ländern mit sehr milden Wintern, woraus spätes, uneinheitliches Austreiben im Frühjahr mit teils geringeren Erträgen resultiert.

In der folgenden Arbeit sollte untersucht werden, ob ^{15}N -markiertes Cyanamid von Rebenstecklingen über die Wurzel aus der Nährlösung aufgenommen und der markierte Stickstoff im Protein eingebaut wird und im Arginin nachzuweisen ist, und ferner, ob sich daraus eventuell Rückstandsprobleme ergeben könnten.

Material und Methoden

Versuchsanstellung

Rebenstecklinge: Sorte Comtessa (10—40 cm hoch) aus Einaugenstecklingen in Nährlösungskultur angezogen.

Nährlösung: 1/2konzentrierte Hoagland-Lösung.

Cyanamidgabe: 5 bzw. 10 mg ^{15}N -markiertes Cyanamid (98 % ^{15}N) je l Nährlösung. — Die

Pflanzen wurden in der Klimakammer (14 h Licht/d) zunächst in cyanamidhaltiger Nährlösung, anschließend verschieden lang in cyanamidfreiem Medium kultiviert.

Versuch 1: Rebenstecklinge ca. 20 cm hoch, 10 d in ^{15}N -Cyanamidlösung (5 mg $\text{H}_2\text{CN}_2/\text{l}$). — Ernte und Untersuchung

- a) am Ende der Cyanamidbehandlung,
- b) nach weiteren 7 d in cyanamidfreier Nährlösung,
- c) nach weiteren 14 d in cyanamidfreier Nährlösung.

Versuch 2: Rebenstecklinge ca. 30 cm hoch, 11 d in ^{15}N -Cyanamidlösung (10 mg $\text{H}_2\text{CN}_2/\text{l}$). — Ernte und Untersuchung

- a) am Ende der Cyanamidbehandlung,
- b) nach weiteren 14 d in cyanamidfreier Nährlösung,
- c) nach weiteren 21 d in cyanamidfreier Nährlösung.

Versuch 3: Rebenstecklinge ca. 40 cm hoch, 14 d in ^{15}N -Cyanamidlösung (10 mg $\text{H}_2\text{CN}_2/\text{l}$). — Ernte nach 14 d in cyanamidfreier Nährlösung.

Wiederholungen: 2.

Nach der Ernte wurden die Pflanzen in Sproß und Wurzeln getrennt, mit flüssigem N_2 tiefgefroren, gefriergetrocknet und gemahlen.

Für die Argininbestimmung wurde das Pflanzenmaterial aus den Versuchen 1—3 wegen der geringen Probemengen folgendermaßen zusammengemischt:

Sproß 1: alles Material am Ende der Cyanamidernährung, d.h. Versuch 1 a + 2 a;

Wurzel 1: ebenso;

Sproß 2: alle Pflanzen standen nach der Cyanamidernährung noch 14—21 d in normaler Nährlösung, d.h. Versuch 1 c + 2 b + 2 c + 3;

Wurzel 2: ebenso.

Analysenmethoden

In der Nährlösung:

Cyanamidbestimmung photometrisch mit Ammoniumdinatriumpentacyanoaminferat bei 530 nm (STELLER *et al.* 1965).

Im Pflanzenmaterial:

Gesamtstickstoff nach Kjeldahl mit Selenreaktionsgemisch und Mikrodestillation.

Fällbarer Stickstoff: 4-malige Extraktion mit $\text{CH}_3\text{OH}/0.1 \text{ M KOH}$ (1 : 1 v/v), Fällung mit Trichloressigsäure und Kjeldahlaufschluß.

Argininbestimmung: Jeweils 1 g Pflanzenmaterial wurde mit 300 ml 6 M HCl 18 h am Rückflußkühler hydrolysiert und nach Entfernung der HCl (durch mehrmaliges Einengen) mit 2 ml deionisiertem Wasser aufgenommen.

Isolierung mittels Ionenaustauschharzes (Aminex A — 6, Fa. Bio Rad): Glassäule 65 cm Länge, 0,9 cm Innendurchmesser, Harzhöhe 40 cm, Säulentemperatur 55 °C, Laufmittel Natriumcitratpuffer pH 5,28 — 0,35 n, Fluß 80 ml/h, Probenmenge 0,5 ml, manuelle Einspritzung, 2 Wiederholungen.

Unter diesen Trennbedingungen erscheint Arginin nach 300 min. Die Fraktion (300—340 min) wurde in 10-min-Schritten gesammelt und im Aminosäureanalysator (Biotronik LC 6000) auf Arginin geprüft; die argininpositiven Fraktionen wurden vereinigt.

Die Gesamt-N-Bestimmung bei Arginin erfolgte mittels Mikrokjeldahl. Alle ^{15}N -Analysen wurden mittels Emissionsspektroskopie durchgeführt (VILSMEIER und MEDINA 1984).

Ergebnisse

Die Sproßerträge lagen je nach Größe der Stecklinge und Versuchsdauer zwischen 1,0 und 5,7 g TS/Pflanze, die in der Wurzel zwischen 0,4 und 2,7 g (Tabelle 1). Am Ende

Tabelle 1
Trockensubstanzerträge von Rebenstecklingen (g TS/Pflanze)
Dry matter yields of grapevine cuttings (g dry m./plant)

		Sproß	Wurzel
Versuch 1	a	1,0	0,4
	b	1,3	0,6
	c	1,9	0,7
Versuch 2	a	2,6	1,8
	b	3,6	2,1
	c	5,7	2,5
Versuch 3		4,2	2,5

der jeweiligen Cyanamidbehandlung wurden noch 62—73 % der Cy-Vorlage in der Nährlösung wiedergefunden (Tabelle 2). Die Gesamtstickstoffgehalte erreichten im Sproß 1,6—2,4 %, in der Wurzel 1,3—1,9 %; 78—93 % davon wurden im Sproß, bzw. 64—78 % in der Wurzel als mit Trichloressigsäure fällbarer Stickstoff nachgewiesen (Tabelle 3). Fällbarer ^{15}N konnte im Sproß mit 46—73 % vom Gesamt-N und in den Wurzeln mit 32—75 % nachgewiesen werden (Tabelle 4).

Daraus geht hervor, daß das ^{15}N -markierte Cyanamid über die Wurzel aufgenommen wurde und davon bis zu 2/3 im fällbaren Stickstoff enthalten waren.

Die nach Hydrolyse mit 6 M HCl im Aminosäurenanalysator gefundenen Arginin-gehalte lagen im Sproß zwischen 5,4 und 7,9 und in den Wurzeln zwischen 4,3 und 5,0 mg Arginin/g TS. Sie unterschieden sich nur geringfügig von den über die Gesamt-N-Bestimmung der Argininfraktion erzielten Werten (Tabelle 5). Während der Cyanamidernährung ergaben sich höhere Arginingehalte gegenüber der Kontrolle. Nach dem Umsetzen in cyanamidfreie Nährlösung lagen diese im Sproß wieder auf dem Niveau der Kontrolle, dagegen waren die Unterschiede in den Wurzeln gering. Da das Pflanzenmaterial aus mehreren sehr ähnlichen Versuchen zusammengemischt war, wurde

Tabelle 2

Cyanamidgehalte der Nährlösung zu Beginn und Ende der Behandlung mit Cyanamid (mg $\text{H}_2\text{CN}_2/\text{l}$)
Cyanamide concentrations in nutrient solution before and after treatment with cyanamide (mg $\text{H}_2\text{CN}_2/\text{l}$)

	Anfang	Ende
Versuch 1	5,2	3,7
Versuch 2	10,1	6,3
Versuch 3	9,7	7,1

Tabelle 3
Gesamt-N und fällbarer N in Rebenstecklingen (% N i. TS)
Total and precipitable N in grapevine cuttings (% N in dry m.)

		Sproß		Wurzel	
		Ges.-N	Fällb. N	Ges.-N	Fällb. N
Versuch 1	a	2,26	1,94	1,40	1,09
	b	1,94	1,79	1,26	0,95
	c	1,94	1,81	1,61	1,24
Versuch 2	a	2,40	1,86	1,29	0,98
	b	1,92	1,67	1,33	1,00
	c	1,62	1,29	1,43	1,04
Versuch 3		1,63	1,34	1,93	1,28

Tabelle 4
Gesamt-¹⁵N-Aufnahme und fällbarer ¹⁵N in Rebenstecklingen (µg ¹⁵N/Pflanze)
Total ¹⁵N uptake and precipitable ¹⁵N in grapevine cuttings (µg ¹⁵N/plant)

		Sproß		Wurzel	
		Ges.-N	Fällb. N	Ges.-N	Fällb. N
Versuch 1	a	122	63	75	24
	b	166	110	65	22
	c	237	173	84	35
Versuch 2	a	940	581	615	462
	b	758	493	343	237
	c	1 048	478	311	219
Versuch 3		2 295	1 627	1 233	687

ferner eine ¹⁵N-Bestimmung durchgeführt. In Sproß und Wurzeln wurden 363—507 µg ¹⁵N/g TS gefunden (Tabelle 6). Im Arginin (nach Hydrolyse mit 6 M HCl) von Sproß und Wurzeln lagen ca. 6—7 % des aus dem Cyanamid stammenden markierten Stickstoffs vor.

Diskussion

Frisch bewurzelte Rebenstecklinge nahmen über die Nährlösung in geringer Konzentration angebotenes ¹⁵N-markiertes Cyanamid auf. Zwar kann ein gewisser Abbau von Cyanamid in der Nährlösung in Gegenwart von Wurzeln bzw. durch Wurzelexsu-

Tabelle 5

Arginingehalte in Sproß und Wurzeln von Rebenstecklingen (mg Arg/g TS)
 Arginine concentrations in shoots and roots of grapevine cuttings (mg Arg/g dry m.)

Bestimmung	Sproß			Wurzel		
	Kontr.	1	2	Kontr.	1	2
Aminosäuren-analysator	5,69	7,89	5,35	4,50	4,33	5,04
Kjeldahl	5,56	7,51	5,15	4,04	4,36	4,83

Tabelle 6

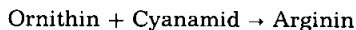
Gesamt-¹⁵N-Gehalt und ¹⁵N-Gehalt von Arginin in Rebenstecklingen (µg ¹⁵N/g TS)
 Total ¹⁵N and ¹⁵N in arginine of grapevine cuttings (µg ¹⁵N/g dry m.)

	Sproß		Wurzel	
	1	2	1	2
Gesamt- ¹⁵ N-Gehalt	379	363	507	358
Arginin- ¹⁵ N-Gehalt	28	27	30	22

date nicht völlig ausgeschlossen werden. Dennoch wurde Cyanamid größtenteils als Molekül aufgenommen, da nach 14 d noch bis zu 73 % des vorgelegten Cyanamids in der Nährlösung nachweisbar waren. Um Aussagen über den Verbleib des ¹⁵N-Cyanamids treffen zu können, wurden wesentlich längere Behandlungszeiten gewählt als in den früheren Arbeiten von WUNSCH und AMBERGER (1968, 1974).

Daraus erklärt sich der hohe Anteil des aus dem Cyanamid stammenden ¹⁵N im fällbaren N (Protein) von Sproß und Wurzeln. Das Cyanamid wurde demnach als echte N-Quelle verwendet und im pflanzlichen Stoffwechsel umgebaut. Wie bereits mit anderen Pflanzen aufgezeigt (WUNSCH und AMBERGER 1974), traten auch in den vorliegenden Versuchen während der Cyanamidbehandlung höhere Gehalte an Arginin auf.

Dieser Umstand und der damit erstmals gelungene Nachweis von ¹⁵N im Arginin aus vorgelegtem Cyanamid geben der von WUNSCH und AMBERGER (1974 und in Vorbereitung) für Pflanzen postulierten, in der chemischen Synthese wohlbekannten Reaktion



zusätzliche Festigung (HOLLEMANN und RICHTER 1951).

Diese Untersuchungen erbrachten demnach den eindeutigen Beweis für die Verwertung von über die Wurzel aufgenommenem Cyanamid im Stoffwechsel von Rebenstecklingen. Es ist anzunehmen, daß über die Rinde zur Dormanzbrechung aufgenommenes Cyanamid ähnlich rasch metabolisiert wird und sich aufgrund der niedrigen Anwendungskonzentration und der langen Zeit zwischen Applikation und Lese keinerlei Rückstandsprobleme in Trauben ergeben dürften, zumal bisher in keinem Fall Cyanamidrückstände in Trauben nachgewiesen werden konnten (SKW Trostberg, unveröffentlicht).

Zusammenfassung

^{15}N -markiertes Cyanamid wurde von bewurzelten Rebenstecklingen aus der Nährlösung aufgenommen. Fällbarer N in Sproß bzw. Wurzeln enthielt bis zu 2/3 des angebotenen Gesamt ^{15}N . Die Arginingehalte waren während der Cyanamidernährung höher als in der Kontrolle, nach Umsetzen in cyanamidfreie Nährlösung lagen sie wieder auf dem Niveau der Kontrolle. Im aus Sproß und Wurzeln nach Hydrolyse mit 6 M HCl und Säulenchromatographie isolierten Arginin wurden 6—7 % des aus dem Cyanamid stammenden ^{15}N wiedergefunden.

Die Rebenstecklinge wurden dankenswerterweise von Herrn Prof. Dr. ALLEWELDT, Bundesforschungsanstalt für Rebenzüchtung Geilweilerhof, zur Verfügung gestellt.

Literatur

- HOLLEMANN, A. F.; RICHTER, F.; 1951: Lehrbuch der Chemie. II. Organische Chemie. 27. und 28. Auflage, Walter De Gruyter und Co., Berlin.
- IWASAKI, K.; WEAVER, R. J.; 1977: Effect of chilling, calcium cyanamide, and bud scale removal on bud break, rooting, and inhibitor content of buds of 'Zinfandel' grape (*Vitis vinifera* L.). J. Amer. Soc. Hort. Sci. **102**, 584—587.
- LATZKO, E.; AMBERGER, A.; 1952: Die Aufnahme des Cyanamids und seine Wirkung auf Wachstum und N-Stoffwechsel bei verschiedenen Kulturpflanzen. Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk. **59**, 198—215.
- SHULMAN, Y.; NIR, G.; FANBERSTEIN, L.; LAVEE, S.; 1983: The effect of cyanamide on the release from dormancy of grapevine buds. Sci. Hort. **19**, 97—104.
- STELLER, W. A.; FREDERIK, I. B.; MORGAN P. W.; 1965: Determination of cyanamide residues on ginned cottonseed. J. Agricult. Food Chem. **13**, 329—330.
- VILSMEIER, K.; MEDINA, R.; 1984: Eine Memory-freie Methode zur Hypobromitoxidation von $^{15}\text{N}_4^+$ für die Emissionsspektrometrie. Fresenius Z. Anal. Chem. **318**, 597—598.
- WILLIAMS, L. E.; 1987: The effect of cyanamide on budbreak and vine development of Thompson Seedless grapevines in the San Joaquin Valley of California. Vitis **26**, 107—113.
- WUNSCH, A.; AMBERGER, A.; 1968: Über den Nachweis von Cyanamid und dessen Umwandlungsprodukten in Pflanzen. Atompraxis **14**, 311.
- — —; — — —; 1974: Arginin im Stoffwechsel cyanamidernährter Pflanzen. Z. Pflanzenphysiol. **72**, 359—366.

Eingegangen am 7. 3. 1988

Dr. K. VILSMEIER
 Prof. Dr. A. AMBERGER
 Lehrstuhl für Pflanzenernährung
 Technische Universität München
 D 8050 Freising-Weihenstephan