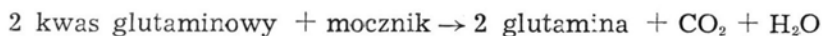


## Udział mocznika w biosyntezie glutaminy w liściach rajgrasu

*The role of urea in biosynthesis of glutamine in the leaves of rye-grass*

Z. KANIUGA

W poprzedniej pracy (K a n i u g a 1958) wykazaliśmy, że w rajgrasie podlewanym roztworem mocznika synteza glutaminy przebiega szybciej niż w przypadku jonów amonowych. W celu wyjaśnienia przyczyn tego zjawiska w pracy niniejszej zajęliśmy się następującymi czynnikami: 1. wpływem kwasu glutaminowego, który wg hipotezy R e i f e r a (1949), będącej punktem wyjściowym naszych badań, ma brać udział w bezpośrednim połączeniu się z mocznikiem z utworzeniem glutaminy wg reakcji:



2. wpływem stężenia wolnego amoniaku, które jak wykazano w poprzedniej pracy (K a n i u g a 1958) było znacznie niższe w próbach wzbogaconych mocznikiem niż jonami amonowymi, 3. wpływem dwutlenku węgla (powstającego z mocznika po hydrolizie), który mógł brać udział w syntezie glutaminy, 4. wpływem światła. Czynniki te zdawały się wpływać na szybkość syntezy glutaminy z mocznika bądź jonów amonowych.

Zastosowanie w niniejszej pracy metody infiltracji próżniowej umożliwiało nie tylko szybkie wzbogacenie liści rajgrasu odpowiednimi związkami, ale także badanie ich wpływu na syntezę glutaminy już wkrótce po infiltracji. Poza tym użycie tej techniki umożliwiało wprowadzanie do liści rajgrasu określonych ilości substratów i uniezależniało badania od warunków atmosferycznych.

Praca niniejsza dotyczy badań nad wpływem wymienionych wyżej czynników.

## I. MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

## Materiał doświadczalny

Nasiona rajgrasu wysiewano na piasku wydumowym umieszczonym w krystalizatorach zawierających 1500 g piasku oraz 225 g wody. Rośliny hodowano w ciągu 9—14 dni (od dnia wysiewu) stale w świetle rozproszonym, uzupełniając codziennie brakującą ilość wody do zawartości wyjściowej. W tych warunkach liście osiągały wielkość 4—6 cm.

## Infiltracja

Z kilkunastu krystalizatorów ścinano liście rajgrasu i do infiltracji pobierano 8—10 g próbki reprezentatywne. Próbkę rajgrasu zawiniętą w gazę umieszczano w krótkich szerokich probówkach, które po napełnieniu roztworami do infiltracji umieszczano w eksykatorze i przez 20 minut usuwano powietrze pompą wodną. Po wyrównaniu ciśnienia próbkę oplukiwano wodą i liście rozkładano na bibule. W tym momencie niektóre próby równoległe po cytolizie i zakwaszeniu kwasem octowym służyły do oznaczenia ilości azotu wprowadzonego w wyniku infiltracji (próby zerowe). Po usunięciu z powierzchni liści za pomocą bibuły znacznej części wody, próbki rajgrasu umieszczano w suszarce z przewiewem o temperaturze 28—30°. Po upływie około 20 minut sprawdzano masę próbek aż do chwili uzyskania przez nie masy pierwotnej. Od tego momentu liczono czas przemian mocznika i jonów amonowych (np. 3 godziny po infiltracji). Następnie liście rajgrasu zawijano w wilgotną gazę i umieszczano nad wodą w eksykatorze z otwartym tubusem. Eksykator pozostawiano w ciemności na odpowiedni okres, po upływie którego doświadczenie przerywano w sposób opisany w poprzedniej pracy (K a n i u g a 1958).

Roztwory do infiltracji. Do infiltracji używano roztworów mocznika, chlorku amonowego oraz ich mieszaniny. Zależnie od celu doświadczenia stężenie azotu w roztworach do infiltracji było zmieniane i wahało się w przypadku chlorku amonowego w granicach od 39 do 280 mg/100 ml oraz w przypadku mocznika od 70 do 326 mg/100 ml. W większości doświadczeń stosowano jednak roztwory o stężeniu 117 mg azotu mocznika lub chlorku amonowego w 100 ml roztworu.

Do roztworów do infiltracji dodawano buforu fosforanowego o pH 6,5 ( $\frac{1}{15}$  M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \frac{1}{5}$  M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) w ilości 20 ml na 100 ml roztworu. W doświadczeniach nad wpływem jonów węglanowych roztwory infiltrowane posiadały pH 7,0, a próby z dodatkiem kwaśnego węglanu sodowego pH 7,2.

Kwas glutaminowy zobojętniano wodorotlenkiem sodowym do pH 6,5 i dopiero wówczas potrzebną ilość dodawano do roztworu mocznika lub chlorku amonowego.

### Metody analityczne

Przygotowanie wyciągu oraz metody oznaczania mocznika, wolnego amoniaku oraz glutaminy za pomocą szczepu *Clostridium welchii* SR-12 opisano w poprzedniej pracy (K a n i u g a 1958). Poza tym zawartość glutaminy oznaczano po hydrolizie nieenzymatycznej wg metody Reifera i T a r n o w s k i e j (1952).

Tabela 1

Wpływ światła słonecznego i rozproszonego na wykorzystanie azotu mocznika oraz chlorku amonowego (w mg %)

Warunki oświetlenia	Infiltrowano	N — infiltr.	N — NH <sub>3</sub>	N — amid. glut.*	N — moc.	N — zasymilowany	Przyrost N — amid. glut.
Światło słoneczne	H <sub>2</sub> O		0,9	3,8	0,7		
	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	35,9	5,9	11,3	12,0	19,6	7,5
	NH <sub>4</sub> Cl	35,2	19,6	9,6	3,6	16,5	5,8
Światło rozproszone	H <sub>2</sub> O		1,2	11,7	3,0		
	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	35,5	7,0	17,8	16,3	16,4	6,1
	NH <sub>4</sub> Cl	35,9	21,7	15,7	5,8	14,2	4,0

\* Oznaczano metodą enzymatyczną przy użyciu szczepu *Clostridium welchii* SR-12

Porównując obie metody oznaczania glutaminy stwierdziliśmy, że w liściach rajgrasu infiltrowanych wodą, roztworem mocznika lub mieszaniną mocznika i chlorku amonowego zawartość glutaminy oznaczona obiema metodami jest prawie jednakowa, natomiast w próbach infiltrowanych chlorkiem amonowym zawartość glutaminy oznaczona po hydrolizie nieenzymatycznej wynosi 83% zawartości glutaminy oznaczonej po hydrolizie enzymatycznej. Różnica 17% nie zaciemniała jednak wyższych przyrostów glutaminy z mocznika, gdyż przyrosty te były o 58% (tabela 2), a w doświadczeniach wykonanych w jesieni nawet o 88% większe (tabela 3). Również w przypadku stosowania obu metod oznaczania glutaminy (ryc. 5) lub tylko hydrolizy enzymatycznej (tabela 1) obserwowano wyższe przyrosty zawartości glutaminy z mocznika niż chlorku amonowego.

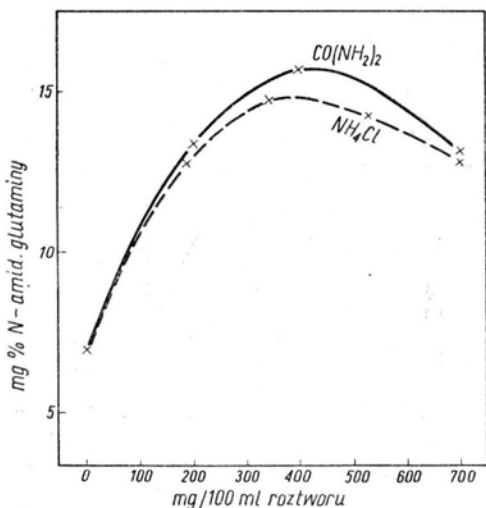
Powtarzalność wyników. Analiza prób równoległych wykazała, że wahania w zawartości amoniaku, glutaminy i mocznika nie przekraczają 0,8 mg%. Wartość tę przyjęto więc za górną granicę wahań w zawartości

wymienionych składników między próbami równoległymi, uwarunkowane błędami metodyki.

Wszystkie wyniki podane na wykresach i w tabelach wyrażają mg azotu amoniaku, mocznika i azotu amidowego glutaminy w 100 g świeżej tkanki roślinnej.

### Ogólne warunki doświadczalne przy stosowaniu metody infiltracji próżniowej

Stężenia infiltrowanych roztworów. Na ryc. 1 przedstawiono jedno z kilku doświadczeń nad wpływem różnych stężeń mocznika oraz chlorku amonowego na syntezę glutaminy. Doświadczenia te



Ryc. 1. Wpływ różnych stężeń mocznika oraz chlorku amonowego na syntezę glutaminy

okresem takim są 3—4 godziny od uzyskania masy pierwotnej próbki. W tym okresie liście rajgrasu posiadają jeszcze nadmiar substratu, a zawartość glutaminy jest już znaczna, przez co możliwe jest bardziej dokładne uchwycenie ewentualnych różnic.

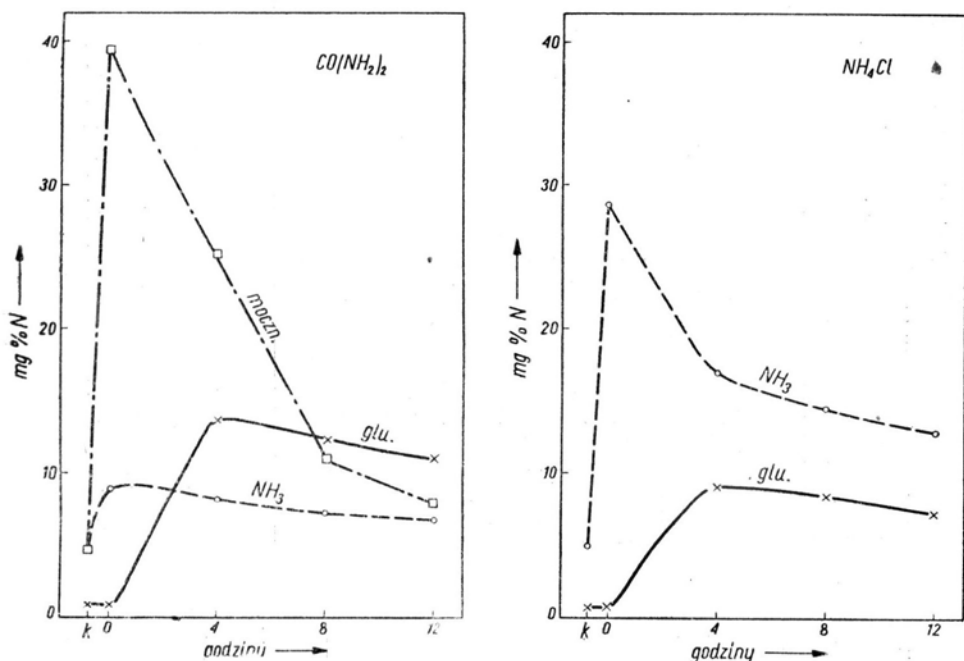
Warunki oświetlenia. Badaliśmy również, czy i w jakim stopniu różne oświetlenie rajgrasu w czasie jego hodowli wpływa na szybkość syntezy glutaminy oraz przemiany mocznika i jonów amonowych (tab. 1).

Z tabeli 1 wynikają następujące spostrzeżenia: 1. w próbach kontrolnych (infiltrowanych wodą) zawartość glutaminy jest wyższa w warun-

wykazały, że szybkość syntezy glutaminy maleje w przypadku stosowania roztworów o stężeniu większym niż 400 mg mocznika lub chlorku amonowego w 100 ml roztworu do infiltracji. Z tych względów w dalszych doświadczeniach nie stosowano (z wyjątkiem kilku niezbędnych przypadków) roztworów o stężeniu azotu większym niż 186 mg w 100 ml.

Czas trwania doświadczeń. Wprowadzając w liście rajgrasu nadmiar substratu (mocznik, jony amonowe) należało przede wszystkim określić najodpowiedniejszy czas trwania doświadczeń. Na podstawie kilku doświadczeń, z których jedno przedstawia ryc. 2, okazało się, że

kach światła rozproszonego, 2. liście infiltrowane roztworem mocznika wykazują w obu seriach wyższe przyrosty glutaminy niż infiltrowane chlorkiem amonowym, przy czym przyrosty te są większe w serii „światło słoneczne“, 3. ilości azotu zasymilowanego z mocznika lub chlorku



Ryc. 2. Szybkość zmian zawartości mocznika, amoniaku i glutaminy w liściach rajgrasu infiltrowanych roztworem mocznika oraz chlorku amonowego

amonowego są większe w przypadku mocznika w rajgrasie rosnącym w warunkach intensywnego światła słonecznego niż w warunkach światła rozproszonego.

Chociaż wyniki tabeli 1 wykazują, że rośliny wyhodowane w warunkach intensywnego nasłonecznienia byłyby bardziej korzystnym materiałem do badań ze względu na większe przyrosty glutaminy, szybszą przemianę mocznika i jonów amonowych oraz asymilację tych związków, to jednak ze względu na fakt, że intensywne nasłonecznienie praktycznie możliwe jest w ciągu niewielu dni w roku, dalsze doświadczenia zdecydowano przeprowadzać na rajgrasie wyhodowanym w świetle rozproszonym.

## II. WYNIKI BADAŃ

### Synteza glutaminy w infiltrowanych liściach rajgrasu

Tabele 2 i 3 przedstawiają syntezę glutaminy w liściach rajgrasu infiltrowanych roztworem mocznika oraz chlorku amonowego. Jak z nich wi-

Tabela 3

Synteza glutaminy w rajgrasie hodowanym w jesieni (w mg %)  
Rajgras hodowano na paraspecie okna. Wczesne hodowli rośliny nie korzystały ze światła słonecznego ze względu na silne zchmurzenie. Temperatura odczenia 12 — 16°, kroiki dzień.

Data (rok 1955)	Przyrost*		Różnica**
	N-amid. glutaminy	NH <sub>4</sub> Cl	
	CO (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	Z	
4.X.	6,6	4,8	+ 1,8
8.X.	8,2	5,8	+ 2,4
12.X.	8,5	5,1	+ 3,4
12.X.**	4,8	0,9	+ 3,9
22.X.	8,0	3,9	+ 4,1
25.X.	8,9	3,7	+ 5,2
28.X.	5,6	1,5	+ 4,1
2.XI.	6,4	3,3	+ 3,1
19.XI.	9,3	4,7	+ 4,6
7.XII.	5,4	4,3	+ 1,1
13.XII.	4,9	3,4	+ 1,5
16.XII.	4,3	1,1	+ 3,2
Srednio	6,66	3,54	+ 3,12

\* W stosunku do zawartości N-amidowego glutaminy w prób-  
bie infiltrowanej wodą.

\*\* W stosunku do przyrostu N-amidowego glutaminy z chlor-  
ku amonowego.

\*\*\* Rajgras młodszy o 5 dni niż w próbie poprzedniej.

Tabela 2

Synteza glutaminy w infiltrowanych liściach rajgrasu  
wyhodowanego w lecie w świetle rozproszonym (w mg %)

Data (rok 1955)	Przyrost*		Różnica**
	N-amid. glutaminy	NH <sub>4</sub> Cl	
	CO (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	Z	
3.V.	4,9	3,4	+ 1,5
9.VI.	6,0	5,2	+ 0,8
21.VI.	6,6	4,9	+ 1,7
25.VI.	13,6	7,9	+ 5,7
30.VI.	5,8	4,4	+ 1,4
6.VII.	4,1	2,9	+ 1,2
14.VII.	5,7	2,9	+ 2,8
16.VII.	7,8	5,1	+ 2,7
8.VIII.	5,2	0	+ 5,2
16.VIII.	6,2	4,1	+ 2,1
22.IX.	5,1	3,4	+ 1,7
26.IX.	6,2	4,7	+ 1,5
Srednio	6,43	4,07	+ 2,36

\* W stosunku do zawartości N-amidowego glutaminy w próbie  
infiltrowanej wodą.

\*\* W stosunku do przyrostu N-amidowego glutaminy z chlorku  
amonowego.

dać, synteza glutaminy z mocznika jest znacznie większa niż z chlorku amonowego zarówno w roślinach wyhodowanych w lecie (tab. 2), jak i w jesieni (tab. 3).

### Wpływ światła lampy kwarcowej

Stwierdzone w poprzedniej pracy (Kaniuga 1958) oraz obecnie (tab. 2 i 3) znaczne różnice w szybkości syntezy glutaminy z mocznika i jonów amonowych sugerowały, że może to być wynikiem niedostatecznej ilości prekursorów glutaminy w przypadku jonów amonowych. Przypuszczenie to znajdowało częściowe potwierdzenie szczególnie w fakcie, że synteza glutaminy z jonów amonowych w rajgrasie wyhodowanym w jesieni (tab. 3) była znacznie niższa niż z mocznika. Obserwacje te nasunęły myśl przebadania wpływu światła lampy kwarcowej. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabelach 4 i 5.

Tabela 4

Wpływ światła jarzeniowego i lampy kwarcowej na syntezę glutaminy (w mg %)

Rajg es oświetlano około 5 godz. dziennie lampami jarzeniowymi z odległości 40 cm i 1 ekspozycję przed infiltracją 1 godzinę lampą kwarcową (o palniku p. ostym) z odległości 1,4 m

Przyrost* N-amidowego glutaminy z		Różnica**
CO (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	NH <sub>4</sub> Cl	
8,5	10,8	— 2,3
5,9	6,9	— 1,0
3,4	5,5	— 2,1
1,5	4,2	— 2,7
4,3	6,4	— 2,1
Średnio		— 2,0

\* W stosunku do zawartości N-amidowego glutaminy w próbce infiltrowanej wodą.

\*\* W stosunku do przyrostu N-amidowego glutaminy z chlorku amonowego.

Z tabel tych widać, że jednogodzinne naświetlenie lampą kwarcową w połączeniu z uprzednim naświetleniem lampami jarzeniowymi (tab. 4) lub bez tego naświetlenia (tab. 5) powoduje, że synteza glutaminy, w prze-

Tabela 5

Wpływ światła lampy kwarcowej na syntezę glutaminy z mocznika i chlorku amonowego (w mg %)

Rajgras hodowano na parapecie okna (próby A). Bezpośrednio przed infiltracją naświetlano lampą kwarcową jak podano w tabl. 4 (próby B).

Próby	Data r. 1955	Przyrost N-amid. glutaminy z*		Przyrost N-amid. glutaminy z**	
		CO (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	NH <sub>4</sub> Cl	CO (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	NH <sub>4</sub> Cl
A	3.XII	3,6	2,9	—	—
	7.XII	5,4	4,3	—	—
B	3.XII	4,2	4,8	+ 0,6	+ 1,9
	7.XII	6,2	6,7	+ 0,8	+ 2,3

\* W odniesieniu do zawartości N-amidowego glutaminy w próbce infiltrowanej wodą.

\*\* W odniesieniu do zawartości N-amidowego glutaminy w próbach nie naświetlanych lampą kwarcową.

ciwieństwie do danych przedstawionych wyżej, jest szybsza z chlorku amonowego niż mocznika.

Jest rzeczą charakterystyczną, że światło lampy kwarcowej stymulując syntezę glutaminy zarówno z mocznika, jak i chlorku amonowego, pobudza ją w większym stopniu z chlorku amonowego, na skutek czego obserwowane uprzednio (tab. 2 i 3) różnice in plus przechodzą w różnice in minus (tab. 4).

Należy również zwrócić uwagę, że stymulujący wpływ światła lampy kwarcowej na syntezę glutaminy z chlorku amonowego ujawnia się zarówno przy naświetleniu rajgrasu lampami jarzeniowymi, jak i w warunkach hodowli rajgrasu późną jesienią. W obu przypadkach wzrostowi zawartości glutaminy z mocznika lub jonów amonowych odpowiadał w przybliżeniu spadek zawartości amoniaku.

### Wpływ glutaminianu

W związku z sugestią bezpośredniego udziału mocznika w syntezie glutaminy (Reifer 1949) przebadano wpływ glutaminianu. Tabela 6 przedstawia zawartość oraz przyrosty glutaminy w liściach rajgrasu infiltrowanych roztworem mocznika, chlorku amonowego oraz tymi związkami z dodatkiem glutaminianu.

Wyniki zawarte w tabeli 6 wykazują, że wpływ glutaminianu na syntezę glutaminy jest większy w obecności chlorku amonowego niż w obec-



Tabela 6

 Wpływ glutaminianu na syntezę glutaminy z mocznika oraz chlor-  
ku amonowego (w mg %)

Infiltrowano (listopad 1955)	Stężenie N/100 ml roztw. mg	Zawartość N-amid. glut. w doświadczeniach				Przyrost N-amid. glutaminy*			
		a	b	c	d	a	b	c	d
H <sub>2</sub> O		3,9	3,6	2,9	3,5				
CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	117	8,9	8,1	9,0	9,0				
CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> + glutaminian sodowy	117 50	11,2	12,1	11,3	10,1	2,3	3,0	2,3	1,1
NH <sub>4</sub> Cl	117	7,3	4,7	7,7	8,2				
NH <sub>4</sub> Cl + glutaminian sodowy	117 50	9,3	8,0	12,2	11,8	2,0	5,3	4,5	3,6

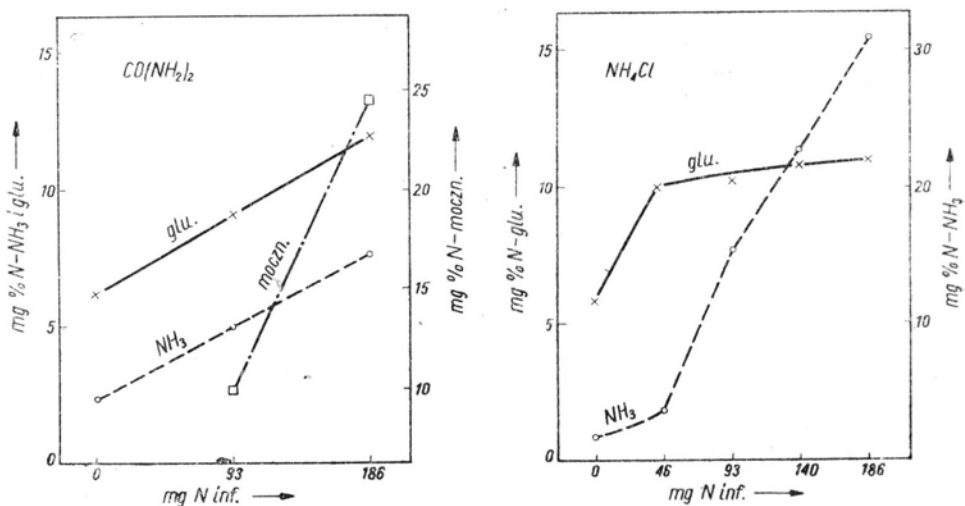
 \* Przyrost zawartości N-amidowego glutaminy w odniesieniu do jego  
zawartości w próbce infiltrowanej mocznikiem lub chlorkiem amonowym.

ności mocznika, co nie wskazuje na możliwość bezpośredniego łączenia się mocznika z glutaminianem z utworzeniem glutaminy.

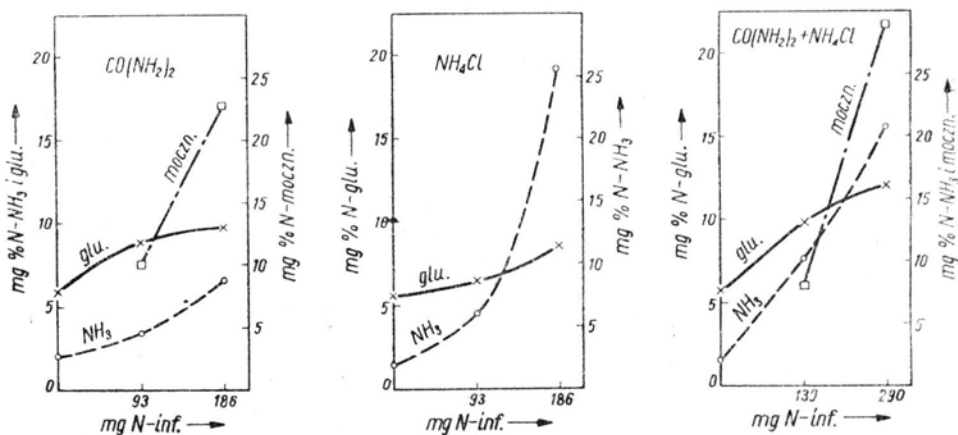
Wpływ stężenia mocznika, jonów amonowych oraz ich mieszaniny

W związku z różnym poziomem amoniaku w próbach serii „mocznikowej” i „amonowej” w doświadczeniach przedstawionych w poprzedniej pracy (Kaniuga 1958) przyjęto za celowe przebadanie wpływu stężenia amoniaku na syntezę glutaminy w rajgrasie. Wyniki takiego doświadczenia przedstawiono na ryc. 3. Z rysunku tego widać, że przy wyższych stężeniach jonów amonowych szybkość syntezy glutaminy, po osiągnięciu pewnej granicy, maleje.

W celu stwierdzenia, czy zmniejszenie szybkości syntezy glutaminy przy wyższych stężeniach jonów amonowych jest spowodowane ich obecnością, czy też może innymi czynnikami, liście rajgrasu infiltrowano roztworami: mocznika, chloroku amonowego oraz ich mieszaniną o różnych stężeniach. Ponieważ jony amonowe biorą bez wątpienia udział w syntezie glutaminy, starano się tak dobrać stężenia mocznika, chloroku amonowego i ich mieszaniny, by synteza glutaminy przebiegała bądź przy nadmiarze amoniaku (ale o zbliżonej zawartości) w próbach infiltrowanych chlorkiem amonowym oraz mieszaniną chloroku amonowego i mocznika (ryc. 4), bądź też przy niskiej (ale zbliżonej) zawartości jonów amonowych w próbach infiltrowanych samym mocznikiem oraz samym chlorkiem amonowym (ryc. 5). W związku z tym jako podstawę do inter-



Ryc. 3. Wpływ stężenia mocznika i chlorku amonowego na syntezę glutaminy



Ryc. 4. Wpływ stężenia mocznika, chlorku amonowego oraz ich mieszaniny na syntezę glutaminy

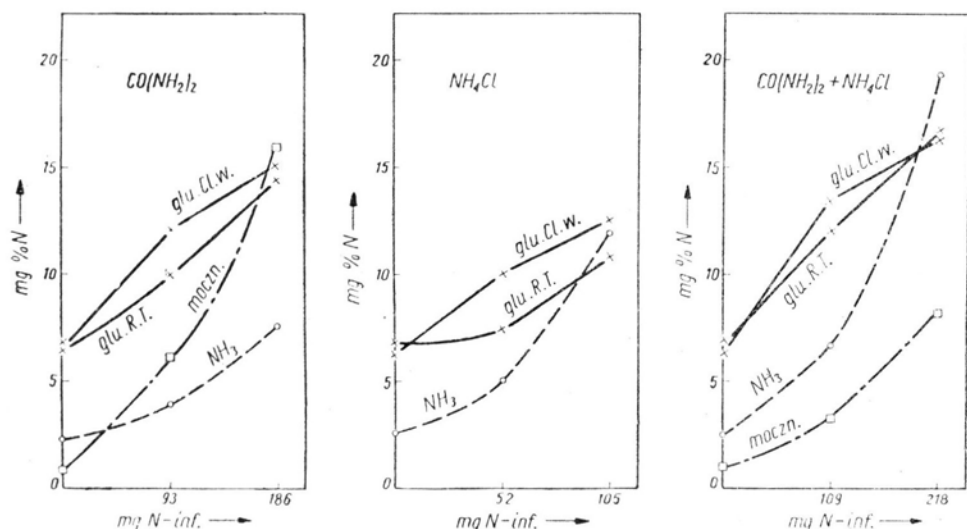
pretacji uzyskanych wyników przyjęto zawartość wolnego amoniaku w poszczególnych próbach, a nie ilość azotu infiltrowanego. Tym też należy tłumaczyć niejednakową skalę na ryc. 4 i 5.

Z doświadczeń przedstawionych na ryc. 3, 4 i 5 wynikają następujące spostrzeżenia:

1. Wraz ze wzrostem stężenia infiltrowanego mocznika wzrasta zawartość amoniaku, któremu z kolei towarzyszy prawie równoległy wzrost za-

wartości glutaminy. Ilość amoniaku w próbach serii mocznikowej jest czynnikiem warunkującym szybkość syntezy glutaminy (ryc. 3, 4 i 5).

2. Duże ilości amoniaku w próbach serii „amonowej“ nie powodują znacznego przyrostu glutaminy (ryc. 3 i 4).



Ryc. 5. Wpływ stężenia mocznika, chlorku amonowego oraz ich mieszaniny na syntezę glutaminy. Glutaminę oznaczono metodą Reifera i Tarnowskiej (R. T.) oraz przy użyciu szczepu *Clostridium welchii* SR-12 (Cl. w.)

3. W liściach infiltrowanych mieszaniną mocznika i chlorku amonowego, duże ilości amoniaku nie powodują zasadniczej zmiany krzywej przyrostu glutaminy, która przebiega podobnie jak w przypadku infiltracji samym mocznikiem (ryc. 4 i 5).

Szybkość syntezy glutaminy i asymilacji azotu z mocznika, chlorku amonowego i ich mieszaniny badaliśmy poza tym z dwóch punktów widzenia: 1. poziomu jonów amonowych na początku i na końcu doświadczenia oraz 2. ilości azotu substratowego (amonianu i mocznika) na początku i na końcu doświadczenia. Warunki te staraliśmy się uzyskać przez użycie różnych stężeń mocznika i chlorku amonowego stosowanych oddzielnie lub w mieszaninie.

Tabela 7 przedstawia doświadczenie, w którym uzyskano zbliżone ilości amoniaku i azotu substratowego w próbach „amonowych“ i „mocznikowych“ na początku lub na końcu doświadczenia. Jak widać, przyrosty glutaminy są większe w próbie 4 niż 2 mimo wyższego poziomu amoniaku w tej ostatniej. Również ilość azotu zasymilowanego jest większa w przypadku mocznika (próba 4) niż chlorku amonowego (próba 3) mimo bardzo

Tabela 7

Synteza glutaminy i asymilacja azotu z mocznika, chlorku amonowego i ich mieszaniny w ciągu godzin po infiltracji (w mg %)

Nr próby	Infiltrowano	N-NH <sub>3</sub>		N-amid. glut.		N-mocz.		Azot substratowy*		Przyrost N-amid. glut.	Azot zasymilowany**
		0	3	0	3	0	3	0	3		
a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l
1	H <sub>2</sub> O	1,4	1,7	5,5	5,2	4,8	3,8				
2	NH <sub>4</sub> Cl	16,8	7,1	6,0	8,5	—	—	16,8	7,1	3,5	9,7
3	NH <sub>4</sub> Cl	26,2	14,2	5,4	10,8	—	—	26,2	14,2	5,6	12,0
4	CO (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	8,1	4,8	5,0	11,6	21,6	7,9	29,7	12,7	6,4	17,0
5	CO (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> + + NH <sub>4</sub> Cl	19,3	12,4	6,4	15,1	22,8	7,4	42,1	19,8	9,9	22,3

\* W próbach infiltrowanych roztworem mocznika jest to suma azotu amoniaku i mocznika, a w próbach infiltrowanych roztworem chlorku amonowego — azot amoniaku.

\*\* Obliczono z różnicy: ilość azotu substratowego w czasie „zerowym” minus jego ilość po 3 godzinach.

zbliżonej zawartości azotu substratowego w tych próbach. Przy jednakowej zawartości mocznika w próbach 4 i 5 (rubryka g i h) synteza glutaminy jest większa w próbce 5 posiadającej wyższą zawartość amoniaku niż w próbce 4 (rubryka c i d).

Doświadczenia przedstawione na ryc. 3, 4 i 5 oraz w tab. 7 sugerowały, że większe przyrosty glutaminy z mocznika niż jonów amonowych mogą być spowodowane udziałem jonów węglanowych powstających z mocznika pod wpływem ureazy.

### Wpływ jonów węglanowych

Ponieważ mocznik, według ogólnie przyjętego poglądu, jest wykorzystywany przez rośliny dopiero po uprzedniej hydrolizie do węglanu amonowego — badaliśmy, czy jony węglanowe wpływają na syntezę glutaminy. W tym celu liście rajgrasu infiltrowaliśmy mieszaninami: chlorku amonowego i węglanu, chlorku amonowego i mocznika oraz mocznika i węglanu.

Cyfry zawarte w tabeli 8 wykazują, że jony węglanowe pobudzają syntezę glutaminy. Wniosek ten wynika z następujących faktów (rubryka f i g):

Tabela 8

Wpływ jonów węglanowych na syntezę glutaminy (w mg %)

Doświad- czenie (kwie- cień 1956)	Nr próby	Infiltrowano	Stężenie mg/100 ml	N-NH <sub>3</sub>	N-amid. glut.	Przyrost N-amid. glut.*	Przyrost N-amidowego glutaminy w próbach infiltrowanych					
							*		***			
							NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> **	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>
a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	l
I	1	H <sub>2</sub> O		3,3	6,0							
	2	NH <sub>4</sub> Cl	400	12,1	8,5				2,5			
	3	NH <sub>4</sub> Cl + NaHCO <sub>3</sub>	400 280	10,7	11,0	2,5	2,5				5,5	
	4	NH <sub>4</sub> Cl + CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	250 300	16,3	12,5	4,0		4,0				6,5
	5	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	400	6,8	11,3	2,8		2,8		5,3		
II	6	H <sub>2</sub> O		1,8	6,2							
	7	NH <sub>4</sub> Cl	400	10,2	11,4				5,2			
	8	NH <sub>4</sub> Cl + NaHCO <sub>3</sub>	400 280	9,1	13,0	1,6	1,6				6,8	
	9	NH <sub>4</sub> Cl + CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	150 250	10,4	12,6	1,2		1,2				6,4
	10	NH <sub>4</sub> Cl + CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	300 250	15,0	12,9	1,5		1,5				6,7
	11	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	400	8,6	11,6	0,2		0,2		5,4		
III	12	H <sub>2</sub> O		1,5	8,5							
	13	NH <sub>4</sub> Cl	400	11,3	12,5				4,0			
	14	NH <sub>4</sub> Cl + NaHCO <sub>3</sub>	400 280	9,5	13,7	1,2	1,2				5,2	
	15	NH <sub>4</sub> Cl + CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	250 150	9,9	14,3	1,8		1,8				5,8
	16	NH <sub>4</sub> Cl + CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	250 300	14,4	15,6	3,1		3,1				7,1
	17	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	400	7,8	12,6	0,1		0,1		4,1		
	18	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> + NaHCO <sub>3</sub>	400 280	6,2	14,2	1,7	1,7**					
Średnio Różnica****							1,75	1,83	4,2 -0,7	4,9	5,8 -0,7	6,5

\* Przyrost N-amidowego glutaminy w odniesieniu do próby kontrolnej infiltrowanej chlorkiem amonowym.

\*\* Mocznik jest traktowany jako związek, który po hydrolizie daje mieszaninę jonów amonowych i węglanowych.

\*\*\* Przyrost N-amidowego glutaminy w odniesieniu do próby infiltrowanej wodą

\*\*\*\* Różnica w stosunku do prób infiltrowanych mocznikiem.



1. Przyrosty glutaminy z mieszaniny chlorku amonowego i węglanu (próby nr 3, 8, 14) są większe niż w próbach infiltrowanych tylko chlorkiem amonowym.

2. W próbach infiltrowanych mieszaniną chlorku amonowego i mocznika (próby nr 4, 9, 10, 15, 16) przyrosty glutaminy są również większe niż w przypadku infiltracji samym chlorkiem amonowym (próby nr 2, 7, 13).

3. Nawet w liściach infiltrowanych roztworem mocznika obecność jonów węglanowych (próba nr 18) pobudza syntezę glutaminy. Wyższe przyrosty glutaminy w liściach infiltrowanych mieszaniną chlorku amonowego i mocznika (próby nr 4, 10, 16) niż mieszaniną chlorku amonowego i węglanu (próby nr 3, 14) są wynikiem większej zawartości amoniaku, na co zwrócono już uwagę przy omawianiu tab. 7 (próby nr 4 i 5). Należy podkreślić, że przy zwiększaniu stężenia mocznika w celu uzyskania większych ilości jonów węglanowych zwiększa się jednocześnie dwukrotnie ilość amoniaku (stosunek C : N w moczniku 1 : 2).

W analizie wyników przedstawionych w tab. 8 (rubryki h—l) zastosowano dwie wielkości odniesienia: 1. zawartość glutaminy w próbce infiltrowanej samym chlorkiem amonowym (a więc nie zawierającej jonów węglanowych lub mocznika) oraz 2. zawartość glutaminy w próbce infiltrowanej wodą.

Jak widać z tabeli 8, średnie wartości rubryki h i i są jednakowe. Stymulujący wpływ mocznika na syntezę glutaminy zanika więc, gdy przyrosty zawartości glutaminy z mocznika są porównywane z przyrostami glutaminy z mieszaniny jonów amonowych i węglanowych.

W rubrykach j—l przedstawiono przyrosty glutaminy w próbach równoległych (rubr. j—k) oraz (rubr. l—l). Średnie wartości dla tych prób są o 0,7 mg<sup>0</sup>/o niższe w próbach nie zawierających mocznika. Różnice te mieszczą się jednak w granicach błędów metodycznych (0,8 mg<sup>0</sup>/o) i mogą być tłumaczone tym, że w pierwszym przypadku (rubr. k) mocznik jest nie tylko źródłem amoniaku, ale także — przynajmniej częściowo — i jonów węglanowych, które jak to zostało wykazane stymulują syntezę glutaminy. W drugim natomiast przypadku (rubr. l) w próbach infiltrowanych mieszaniną chlorku amonowego i mocznika poziom amoniaku jest zawsze wyższy, na co zwrócono już uwagę wyżej.

Wyniki tabeli 8 sugerują, że stymulujący wpływ mocznika na syntezę glutaminy polega, przynajmniej częściowo, na udziale w tej syntezie jonów węglanowych powstających z mocznika.

## DYSKUSJA

Hodowla rajgrasu w normalnych warunkach oświetlenia i jego wzbogacanie w mocznik i jony amonowe przez podlewanie roślin przedstawione w poprzedniej pracy (Kaniuga 1958) wykazały, że szybkość pobierania tych związków oraz ich przemiany zależały od wielu czynników, które warunkowały zarówno szybkość syntezy glutaminy, jak i poziom mocznika i wolnego amoniaku w próbach obu serii. Zastosowanie w niniejszych badaniach hodowli rajgrasu w świetle rozproszonym oraz wzbogacanie liści w mocznik i jony amonowe metodą infiltracji próżniowej pozwoliły na uzyskiwanie stale wyższych przyrostów glutaminy z mocznika niż jonów amonowych (tab. 2 i 3). Fakt ten zdawał się potwierdzać nasze przypuszczenia, że warunki oświetlenia rajgrasu wywierają wpływ na wielkość syntezy glutaminy z mocznika i jonów amonowych.

Bardzo niskie przyrosty glutaminy z chlorku amonowego w porównaniu z przyrostami jej z mocznika (tab. 3) w rajgrasie, wyhodowanym w jesieni w warunkach silnie ograniczonego oświetlenia naturalnego, skłoniły nas do zastosowania naświetlania rajgrasu lampami jarzeniowymi i lampą kwarcową. Wpływ światła lampy kwarcowej okazał się bardzo interesujący, gdyż w przeciwieństwie do wyników uzyskiwanych poprzednio, glutamina gromadziła się szybciej z jonów amonowych niż z mocznika (tab. 4 i 5). Wyniki te sugerują, że warunki oświetlenia wpływają na powstawanie prekursorów syntezy glutaminy z mocznika i jonów amonowych, co z kolei warunkuje szybkość syntezy glutaminy z tych dwóch związków.

Ta zmienność w szybkości syntezy glutaminy z mocznika była również obserwowana na innych tkankach. Steward i Pollard (1956) podają, że skrawki bulwy ziemniaka tego samego szczepu w jednym doświadczeniu tworzyły glutaminę z mocznika bardzo intensywnie, natomiast użyte na podstawie tej właściwości do drugiego doświadczenia zawierały prawie cały mocznik nie zmieniony i zawartość glutaminy nie przyrastała.

Stosując infiltrację glutaminianu w mieszaninie z chlorkiem amonowym lub mocznikiem (tab. 6) nie uzyskaliśmy potwierdzenia dla reakcji sugerowanej przez Reifera (1949). Większe przyrosty glutaminy uzyskiwane w próbach infiltrowanych mieszaniną chlorku amonowego i glutaminianu niż mieszaniną mocznika i glutaminianu wskazują, że przy dostatecznej ilości kwasu glutaminowego i nadmiarze amoniaku synteza glutaminy przebiega intensywniej niż w przypadku mocznika, gdy zawartość amoniaku jest niska. Obserwacja nasza nie wyłącza jednak możliwości reagowania mocznika, przed jego hydrolizą, z innymi związkami.

Przypuszczenie, że wysokie stężenia amoniaku mogą hamować syn-

teżę glutaminy, okazało się (w przypadku stosowanych stężeń) — nie-słuszne, gdyż w próbach zawierających mieszaninę chlorku amonowego i mocznika, mimo dużych stężeń amoniaku, synteza glutaminy była wyższa niż w nieobecności mocznika (ryc. 4 i 5). Fakt ten prowadzi do wniosku, że różnice w szybkości syntezy glutaminy między próbami serii „amonowej“ i „mocznikowej“ są wynikiem w pierwszym przypadku braku dostatecznej ilości kwasu glutaminowego, natomiast w przypadku mocznika istnieniem reakcji, które zwiększają syntezę glutaminy.

W doświadczeniach z zastosowaniem różnych stężeń mocznika chlorku amonowego i ich mieszaniny zwraca uwagę fakt, że synteza glutaminy z mocznika przebiega prawie równolegle do zawartości jonów amonowych (ryc. 3, 4, 5), a więc i jonów węglanowych, które z mocznika powstają pod wpływem ureazy. W doświadczeniach tych nie ujawnia się natomiast zależność między ilością mocznika, który jest w nadmiarze, a syntezą glutaminy.

W przypadku infiltracji roztworami o niskim stężeniu jonów amonowych lub mocznika przyrosty glutaminy w obu przypadkach są prawie jednakowe, co może być spowodowane faktem, że substraty reakcji (kwas glutaminowy oraz amoniak) występują w dostatecznej ilości. Przy stosowaniu natomiast znacznego nadmiaru mocznika lub chlorku amonowego, gdy zawartość amoniaku, a w przypadku mocznika i jonów węglanowych, wzrasta — synteza glutaminy z mocznika jest szybsza niż z jonów amonowych.

Obserwowany przez nas stymulujący wpływ jonów węglanowych na syntezę glutaminy jest bardzo charakterystyczny. Gdyby syntezę glutaminy pobudzały nie węglany, a tylko mocznik, można by wówczas zakładać, że szybsze przyrosty glutaminy z mocznika są właśnie wynikiem bezpośredniego udziału mocznika. Stymulacja syntezy glutaminy przez jony węglanowe chociaż nie wyłącza możliwości bezpośredniego udziału mocznika w tej syntezie, to jednak zwraca uwagę uderzająca zbieżność, że w obu przypadkach stymulacji konieczna jest obecność bądź jonów węglanowych wprowadzonych z zewnątrz, bądź mocznika, który w wyniku hydrolizy, przynajmniej częściowo, jest również źródłem jonów węglanowych.

Ostatnio ogłoszone doświadczenia przeprowadzone na tkankach bulwy ziemniaka wykazały (Steward i Pollard 1956), podobnie jak nasze na rajgrasie, zarówno znacznie większe przyrosty glutaminy z mocznika niż chlorku amonowego, jak i fakt, że przy inkubacji skrawków bulwy ziemniaka z  $^{14}\text{C}$ -mocznikiem w syntezie glutaminy obok azotu bierze udział, przynajmniej częściowo, również węgiel mocznika.

W doświadczeniach wykonanych w ostatnich kilku latach z zastoso-



waniem  $^{14}\text{C}$ -mocznika wykazano bądź łatwość włączania węgla mocznika do związków azotowych roślin (Allison i współpracownicy 1954, Ellner i Steers 1955, Webster, Varner i Gansa 1955), bądź też na podstawie radioaktywności wydzielonego w zamkniętej komorze dwutlenku węgla oznaczano szybkość hydrolizy mocznika przez liście sześciu gatunków roślin opryskanych znaczonej mocznikiem (Hinsvark, Wittwer i Tukey 1953). Webster, Varner i Gansa (1955) podają, że w liściach fasoli  $^{14}\text{C}$ -mocznik jest w zasadzie włączany do aminokwasów podobnie jak  $\text{NH}_4^{14}\text{CO}_3$ , mimo pewnych różnic na korzyść mocznika. Wysoka radioaktywność glutaminy i asparaginy obserwowana przez Allisona i współpracowników (1954) przy żywieniu *Nostoc muscorum*  $^{14}\text{C}$ -mocznikiem, wyższa niż przy żywieniu znaczonej węglanem, jest zrozumiałą, ponieważ mocznik jest źródłem zarówno węgla, jak i azotu. Węgiel mocznika był także intensywnie włączany do guaniny przez komórki *Chlorella* i *Scenedesmus* żywione  $^{14}\text{C}$ -mocznikiem (Ellner i Steers 1955). W pierwszym przypadku 25% a w drugim 100% węgla guaniny stanowił węgiel izotopowy.

Pobudzanie syntezy glutaminy w rajgrasie przez mocznik lub jony węglanowe sugeruje, że te ostatnie biorą udział w reakcjach karboksylacji bądź kwasów organicznych, bądź aminokwasów. Bardzo prawdopodobną wydaje się być karboksylacja kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego, który jak wykazał Synge (1951) występuje w rajgrasie w dość znacznych ilościach w ciągu całego okresu wegetacji. Prace ostatnich lat wskazują nie tylko na powszechne jego występowanie, ale także, że jest on prekursorem kwasu glutaminowego. Stwierdzono mianowicie, że karboksylacja kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego do glutaminowego przebiega bardzo szybko (Steward, Bidwell i Yemm 1956), natomiast proces odwrotny — dekarboksylacja kwasu glutaminowego do  $\gamma$ -aminomasłowego bardzo powoli (Steward, Bidwell i Yemm 1956, Webster 1954). Steward i Pollard (1956) podają, że chociaż włączanie dwutlenku węgla do glutaminy w bulwie ziemniaka może przebiegać przez kwas  $\alpha$ -ketoglutarowy i pośredniki cyklu Krebsa, to jednak, jak stwierdzono, jedynym związkiem radioaktywnym była glutamina, co ich zdaniem sugeruje, że główną drogą przemiany jest: kwas  $\gamma$ -aminomasłowy  $\rightarrow$  glutaminowy  $\rightarrow$  glutamina. Znalezienie 91%  $^{14}\text{C}$ -mocznika w 2-COOH glutaminy i włączanie  $\text{NH}_2$  mocznika do kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego mogłoby być zrozumiałe według tych autorów, jeśli czterowęglowym prekursorem glutaminy z mocznika jest semialdehyd kwasu bursztynowego. Steward i Pollard nie wypowiadają się jednak, czy mocznik bierze udział w syntezie glutaminy przed czy po hydrolizie i uważają, że zagadnienie to pozostaje do wyjaśnienia.

W naszych badaniach, obok stwierdzenia stymulującego wpływu mocznika na syntezę glutaminy w rajgrasie, znaleźliśmy również i inne czynniki jak: 1. wpływ światła lampy kwarcowej, 2. kwasu glutaminowego oraz 3. jonów węglanowych, które pobudzają syntezę glutaminy z jonów amonowych. Fakty te sugerują, że w przypadku syntezy glutaminy z jonów amonowych czynnikiem ograniczającym tę syntezę jest brak dostatecznej ilości prekursorów (z których ostatnim jest kwas glutaminowy) glutaminy. W przypadku natomiast mocznika prekursory te występują bądź też w jego obecności mogą powstawać. Stymulujący wpływ jonów węglanowych zdaje się polegać na udziale w syntezie prekursorów glutaminy.

Wykazanie jednak, czy stymulujący wpływ mocznika na syntezę glutaminy jest udziałem tylko jonów węglanowych powstających z mocznika po hydrolizie, czy może także udziałem mocznika w tej syntezie przed jego hydrolizą, wymagać będzie dalszych, bardziej szczegółowych badań z zastosowaniem znaczonego mocznika i węglanu.

#### STRESZCZENIE

1. Porównano szybkość syntezy glutaminy w liściach rajgrasu infiltrowanych roztworem mocznika oraz chlorku amonowego.

2. Stwierdzono, że synteza glutaminy w rajgrasie wyhodowanym w normalnych warunkach oświetlenia, a szczególnie w świetle rozproszonym, przebiegała szybciej z mocznika niż jonów amonowych.

3. W infiltrowanych liściach rajgrasu wyhodowanego w warunkach intensywnego światła słonecznego synteza glutaminy oraz asymilacja azotu mocznika i jonów amonowych była szybsza niż w roślinach wyhodowanych w świetle rozproszonym.

4. W obecności mocznika synteza glutaminy była wyższa niż z chlorku amonowego zarówno przy małej zawartości amoniaku (infiltracja samym mocznikiem), jak i przy dużej zawartości amoniaku (infiltracja mieszaniną mocznika i chlorku amonowego).

5. Światło lampy kwarcowej stymulowało syntezę glutaminy z jonów amonowych w większym stopniu niż z mocznika.

6. Kwas glutaminowy stymulował syntezę glutaminy z jonów amonowych w większym stopniu niż z mocznika.

7. Obecność jonów węglanowych pobudziła syntezę glutaminy z jonów amonowych.

8. Stymulacja syntezy glutaminy przez jony węglanowe była ilościowo zbliżona do stymulacji tej syntezy przez mocznik.

## SUMMARY

1. It has been compared the speed of glutamine synthesis in the leaves of rye-grass infiltrated with urea and ammonium chloride.
2. The glutamine synthesis in rye-grass cultivated when normal supply of light and especially the dispersed light has been provided, was quicker in the case of urea than with ammonium chloride.
3. When cultivated in intensive sunshine the leaves of rye-grass showed quicker glutamine synthesis as well assimilation of nitrogen from urea and from ammonium ions than was the case with the plants grown in dispersed light.
4. In the presence of urea the synthesis of glutamine was higher then with ammonium chloride whether small amounts of ammonia (infiltration with urea) or greater quantities (infiltration with urea and ammonium chloride) were present.
5. The ultra-violet light stimulated the glutamine synthesis from ammonium ions to a greater degree than from urea.
6. Glutamic acid stimulated the glutamine synthesis from ammonium ions to a higher degree than from urea.
7. The presence of carbonate ions stimulated the synthesis of glutamine from ammonium ions.
8. Stimulation of the synthesis of glutamine by the carbonate ions was quantitatively very much like that effected by urea.

## LITERATURA

- Allison R. K., Skipper H. E., Reif M. R., Short W. A., Hogan G. L., 1954, Studies on the photosynthetic reaction. II. Sodium formate and urea feeding experiments with *Nostoc muscorum*, *Plant Physiol.* 29: 164—68.
- Ellner P. D., Steers Ed., 1955, Urea as a carbon source of *Chlorella* and *Scenedesmus*, *Arch. Biochem. Biophys.* 59: 534—5.
- Hinsvark N. N., Wittwer S. H., Tukey H. B., 1953, The metabolism of foliar-applied urea. I. Relative rates of  $^{14}\text{CO}_2$  production by certain vegetable plants treated with labeled urea, *Plant Physiol.* 28: 70—76.
- Kaniuga Zb., 1958, Synteza glutaminy i asymilacja azotu z mocznika w porównaniu z jonami amonowymi, *Acta Soc. Bot. Pol.* 27 (2): 313—341.
- Reifer I., 1949, Źródła amoniaku w ekstraktach roślinnych, Warszawa.
- Reifer I., Tarnowska K., 1952, Mikrooznaczanie glutaminy w materiale roślinnym, *Rocz. Nauk Rol.* 61: 233—44.
- Steward F. C., Pollard J. K., 1956, Some further observations on glutamyl and related compounds in plants, w N. D. Mc Elroy i B. Glas, A symposium on inorganic nitrogen metabolism. J. Hopkins-Press, Baltimore 1956, 377—407.
- Steward F. C., Bidwell R. G. S., Yemm E. W., 1956, Protein metabolism respiration and growth. A synthesis of results from the use of  $^{14}\text{C}$ -labelled substrates and tissue cultures, *Nature* 170: 734—37.
- Synge R. L. M., 1951, Methods for isolating  $\alpha$ -amino-acids:  $\gamma$ -amino-butyric acid from rye-grass, *Biochem. J.* 48: 429—35.
- Webster G. C., 1954, Incorporation of radioactive glutamic acid into the proteins of higher plants, *Plant Physiol.* 29: 382—85.
- Webster G. C., Varner J. E., Gansa A. N., 1955, Conversion of carbon-14-labeled urea into amino acids in leaves, *Plant Physiol.* 30: 372—74.