

Symbiotische N₂-Fixierung: Ein Boden-Pflanze-Interface

Ueli A. HARTWIG, Silvia ZANETTI, Carina WEISBACH, Jan TROMMLER und Josef NÖSBERGER, Institut für Pflanzenwissenschaften, ETH-Zentrum, CH-8092 Zürich

Die Produktivität von Wiesenökosystemen ist Stickstoff(N)- und Kohlenstoff(C)-limitiert. Es ist anzunehmen, dass sich eine N-Limitierung unter erhöhtem atmosphärischem CO₂ verstärkt. Dadurch kommt der symbiotischen N₂-Fixierung eine zunehmende Bedeutung zu, da durch sie die erhöhten N-Bedürfnisse der Leguminosen und aller anderen Organismen gedeckt werden können. Paradoxe Weise scheint aber eine erhöhte Konzentration von C-Metaboliten in der Pflanze kein Auslöser für erhöhte N₂-Fixierung zu sein.

Die bedeutendste natürliche N-Quelle für Wiesenökosysteme in Mitteleuropa stellt mit Sicherheit die symbiotische Stickstoff-Fixierung in Wurzelknöllchen dar (Abb. 1). Trotz der Zufuhr von mineralischem N, der normalerweise mit Hilfe fossiler Energie fixiert wurde, wird auch in intensiv genutzten Leguminosen-/ Nicht-Leguminosen-Wiesen meist 40 bis 90 % des Stickstoffes durch die symbiotische Stickstoff-Fixierung in diese Ökosysteme eingebracht (z.B. Boller *et al.* 1987; Seresinhe *et al.* 1994; Zanetti *et al.* 1995). Da Stickstoff häufig ein limitierender Faktor für die CO₂-Fixierung und den nachfolgenden C-Einbau (Biomasseproduktion, «Ertrag») darstellt, kann angenommen werden, dass die symbiotische N₂-Fixierung ein wichtiger Parameter für die Produktivität eines Wiesenökosystems darstellt.

Das C:N-Verhältnis in einem Wiesenökosystem als Ganzes ist sehr träge und daher relativ konstant. Das bedeutet gleichzeitig, dass ein solches System bezüglich dieser beiden wichtigen Elemente entweder primär C- oder N-limitiert ist. Bei ungenügendem N-Angebot (entweder durch ungenügende N-Düngung oder als Folge ineffektiver symbiotischer Stickstoff-Fixierung), wird der C-Einbau (Biomasseproduktion, «Ertrag») reduziert, bei ungenügendem C-Angebot muss dementsprechend die N₂-Fixierung beziehungsweise der N-Einbau angepasst werden. Während einiges bekannt ist über die Anpassungsmechanismen der CO₂-Fixierung an ein verändertes N-Angebot in einem Ökosystem, wissen wir wenig über die Regulation der symbiotischen Stickstoff-Fixierung an veränderte C-Flüsse. Solche Information würde massgeblich helfen, das Konkurrenzverhalten

zwischen Leguminosen und anderen Arten zu verstehen.

Im weiteren wird ein Feldexperiment vorgestellt, bei dem über ein erhöhtes atmosphärisches CO₂-Angebot die CO₂-Fixierung und damit die C-Flüsse manipuliert wurden, um deren Einfluss auf die symbiotische Stickstoff-Fixierung zu studieren. Um die zugrunde liegenden Prozesse besser zu verstehen, wurde in parallel durchgeführten Klimakammerexperimenten weiter der Frage nachgegangen, wie die N₂-Fixierung auf physiologisch/biochemischer Ebene der CO₂-Fixierung beziehungsweise dem C-Einbau angepasst wird. In diesen Experimenten diente auch Schnitt zur Manipulation der CO₂-Fixierung.

Symbiotische N₂-Fixierung

Verglichen mit der momentanen atmosphärischen CO₂-Konzentration (36 Pa), nahm die Einzelblatt-Photosyntheserate unter 60 Pa CO₂ in den untersuchten Arten um durchschnittlich 40 % zu (Zunahmen zwischen 30 % und 80 %) (S. Long, persönliche Mitteilung). In den Mischungen von Englisch Raigras (*Lolium perenne*) und Weissklee (*Trifolium repens*) zeigte *L. perenne* eine kaum veränderte bis abnehmende oberirdische Biomasseproduktion, wogegen diese bei *T. repens* um 65 % zunahm (Hebeisen *et al.* 1994; Lüscher *et al.* 1996). Offensichtlich konnte *T. repens* die erhöhte Photosyntheserate besser in oberirdische Biomasse umsetzen als *L. perenne*, das vom Klee zurückgedrängt wurde. Diese Resultate lassen vermuten, dass die Biomasseproduktion von *L. perenne* durch ein anderes Element, zum Beispiel Stickstoff, limitiert war und so die Umsetzung der erhöhten Photosyntheserate in Biomasse verhindert wurde. Die-



Abb. 1. Wurzelknöllchen von Luzerne: Diese sind das von aussen sichtbare Resultat einer Symbiose zwischen Leguminosen und Rhizobien. Letztere sind nur innerhalb dieser Beziehung zur Stickstoff-Fixierung befähigt, sonst leben sie als normale chemo-organo oder chemolithotrophe Bakterien frei im Boden.

se Vermutung wird gestützt durch die deutliche Abnahme der N-Konzentration (auf die Blattfläche bezogen) in der Monokultur der tiefen N-Düngung (Tab. 1) und durch die Zunahme des Wurzelwachstums um 80 % (Jongen *et al.* 1995; Hebeisen *et al.* 1994) in *L. perenne*, während sich diese Parameter in *T. repens* viel weniger veränderten.

Tab. 1. Stickstoffkonzentration pro Blattfläche in *Lolium perenne* Monokultur unter zwei CO₂- beziehungsweise Stickstoffverfahren im Mai 1994. Mittelwerte aus drei Wiederholungen und Standardfehler des Mittelwertes (s.e.) sind angegeben

	35 Pa CO ₂	60 Pa CO ₂
	(g/m ²)	
hohe N-Düngung	1,81	1,40
tiefe N-Düngung	1,19	1,17
s.e.	0,095	

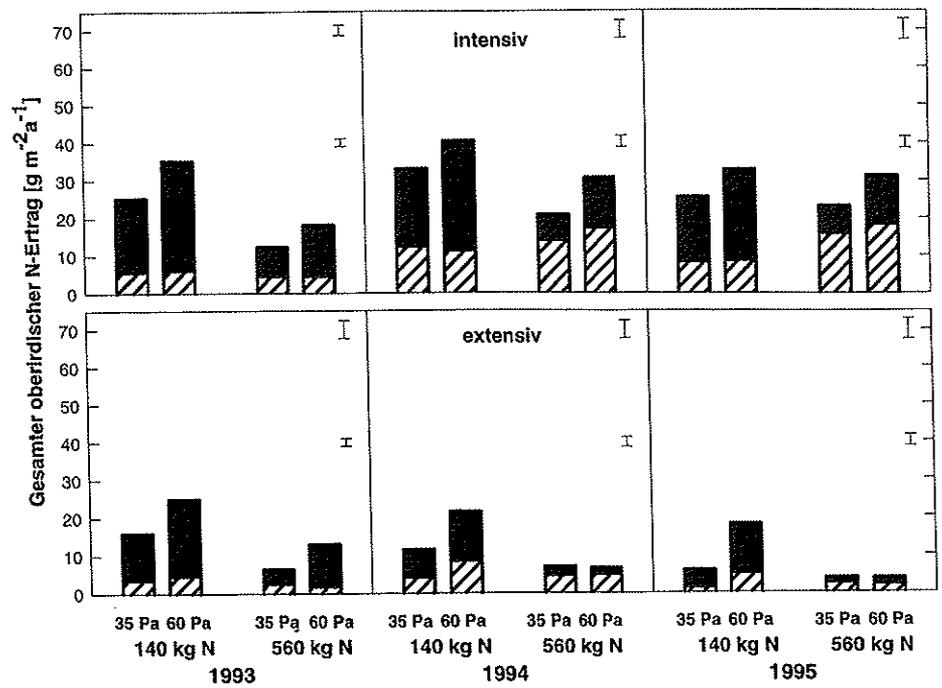


Abb. 2. Jahres Stickstoff-Erträge (aufgeteilt nach Boden/Dünger-Stickstoff vs. symbiotisch fixiertem Stickstoff) bei zwei Dünger- und zwei Schnittverfahren. (Schraffiert: Boden/Dünger; schwarz: Symbiose)

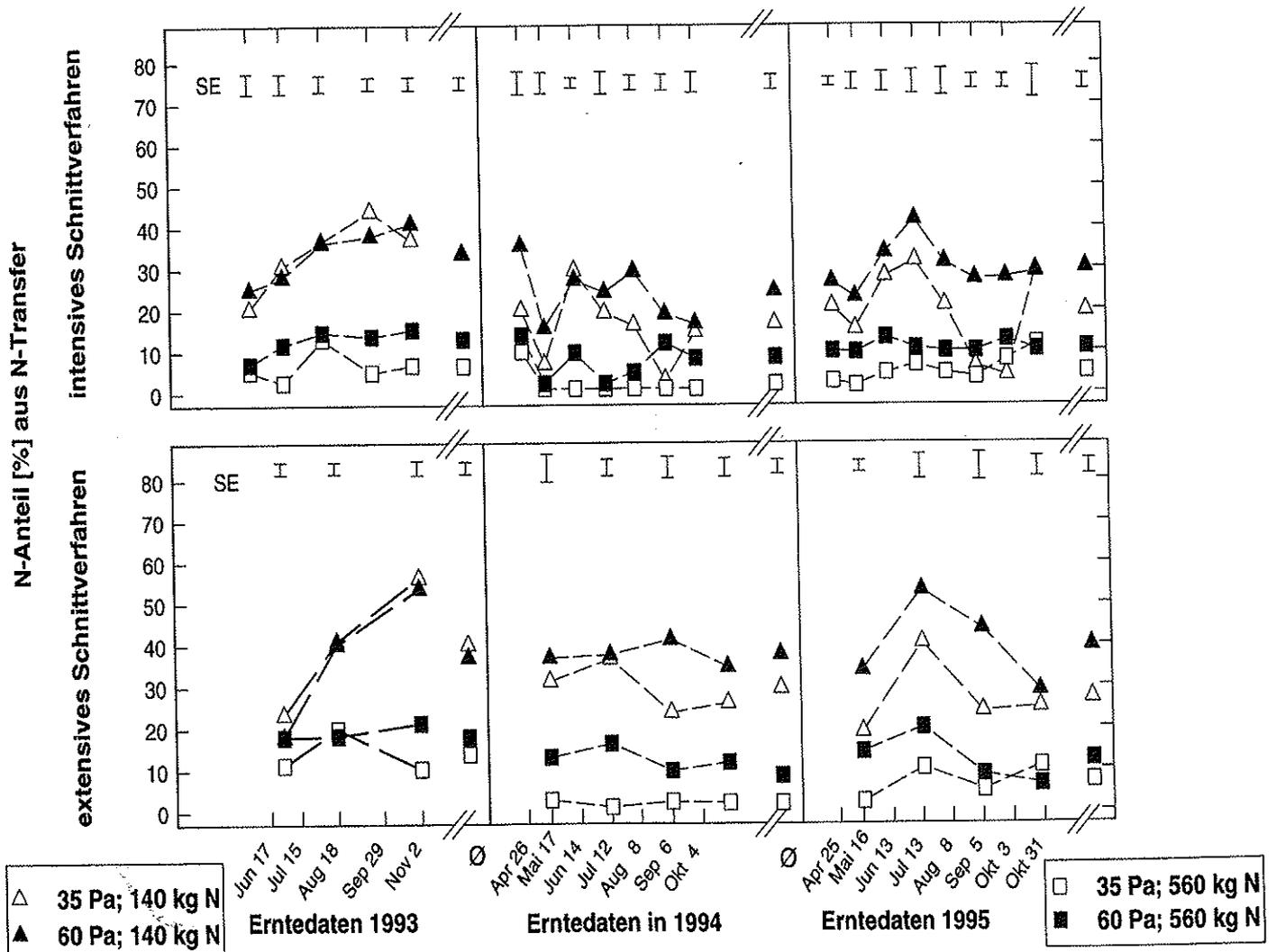


Abb. 3. Anteil Stickstoff in den Partnergräsern, der ursprünglich von der Leguminose kam (N-Transfer).

Die Aufnahme mineralischer Nährstoffe wird durch den C-Einbau beziehungsweise durch die Biomassezunahme bestimmt; umgekehrt verhindert ungenügende Verfügbarkeit mineralischer Nährstoffe zusätzlichen C-Einbau. Wir müssen also annehmen, dass als Folge des erhöhten C-Einbaus unter erhöhtem atmosphärischen CO_2 , der N-Bedarf in einer Pflanze zunimmt; das grössere Wachstum des Weissklee unter erhöhtem CO_2 wäre ohne eine vergrösserte N-Assimilation nicht möglich gewesen. Diese könnte parallel durch gesteigerte N_2 -Fixierung und erhöhte Aufnahme von mineralischem Stickstoff aus dem Boden gedeckt worden sein, was in Klimakammerexperimenten tatsächlich festgestellt wurde (Zanetti *et al.* 1994). Überraschenderweise nahm aber der Anteil von Stickstoff, der aus der Symbiose assimiliert wurde (gemessen mit Hilfe der ^{15}N -Isotopen Verdünnungsmethode) in allen drei Jahren signifikant zu; der zusätzlich assimilierte Stickstoff unter erhöhtem CO_2 kam ausschliesslich aus der Symbiose und nichts aus dem Boden beziehungsweise Dünger (Abb. 2; Zanetti *et al.* 1995). Dies deutet auf eine verminderte N-Verfügbarkeit im Boden hin, wie das als Folge tiefer N-Düngung oder starker Konkurrenz um Stickstoff durch Nicht-Leguminosen in unzähligen Experimenten gezeigt wurde (Boller *et al.* 1987; Seresinhe *et al.* 1994; Abb. 2). Das heisst, dass während der drei Versuchsjahre der mineralische Stickstoff nicht in der Lage war, einen Beitrag an den CO_2 -bedingten, erhöhten N-Bedarf zu leisten. Dies mag wiederum eine Erklärung sein für den schwachen zusätzlichen C-Einbau in *L. perenne* unter erhöhtem CO_2 . Aufgrund dieser Resultate ist zu vermuten, dass sich unter erhöhtem CO_2 der N-Bedarf aller Organismen in diesem Ökosystem durch das erhöhte C-Angebot vergrösserte. Dies führte vermutlich zu einer (zumindest vorübergehenden) Immobilisierung des Stickstoffes im Boden, was schliesslich zu der beschriebenen, erhöhten N_2 -Fixierung führte. Neben anderen möglichen Mechanismen (Hartwig *et al.* 1996) wird diese Erklärung durch die Tatsache unterstützt, dass erhöhte Mengen an Stickstoff in *L. perenne*, welche ursprünglich aus der Symbiose stammten (sogeannter N-Transfer, Abb. 3), gefunden wurden. Diese Resultate lassen den Schluss zu, dass ein primär C-limitiertes Ökosystem unter erhöhtem CO_2 primär N-limitiert wird (Gifford 1992). Der dadurch entstandene, erhöhte N-Bedarf im Ökosy-

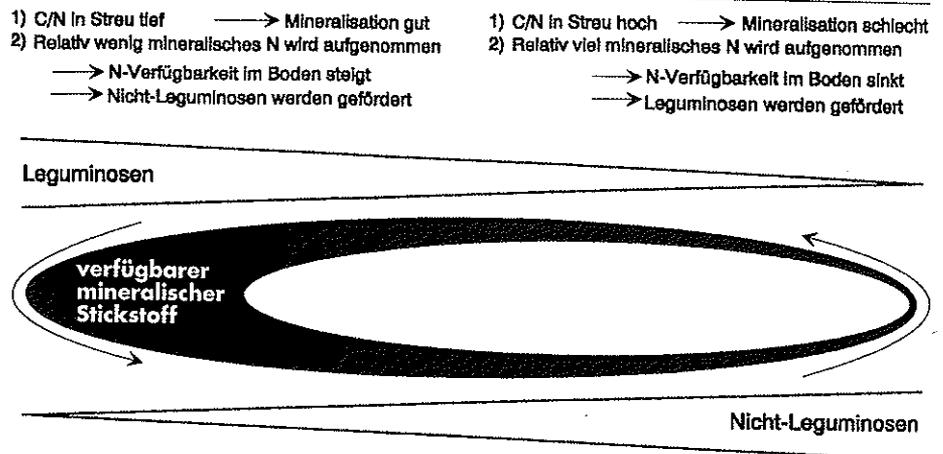


Abb. 4. Modell, wie durch die Verfügbarkeit von mineralischem Stickstoff im Boden die Bestandesanteile Klee/Gras reguliert werden könnten.

stem wurde einerseits durch einen erhöhten Bestandesanteil von Klee (Hebeisen *et al.* 1994) als Folge erhöhter Konkurrenzkraft und andererseits durch eine erhöhte N_2 -Fixierungsleistung in *T. repens* gedeckt (Abb. 2). Tatsächlich betrug so die totale Zunahme der symbiotischen N_2 -Fixierung in den Mischungen 63 %; dies bewegt sich in der gleichen Grössenordnung wie die gemessene, erhöhte Photosyntheserate (siehe oben). Dies deutet auf eine physiologisch/biochemische Reaktion der symbiotischen Stickstoff-Fixierung auf eine Auslenkung des C:N-Gleichgewichtes im gesamten Ökosystem hin (Abb. 4).

Bedarf nach symbiotisch fixiertem Stickstoff

Wenn Beobachtungen aus dem Feld erklärt werden sollen, kommen wir oft nicht um entsprechende Laborexperimente herum. Dabei ist hier unsere Hauptfrage, wie die Stickstoff-Fixierung beziehungsweise die Nitrogenase-Aktivität in Leguminosknöllchen reguliert wird. Lange wurde angenommen, dass unter erhöhtem CO_2 oder nach einem Schnitt die veränderte Kohlenhydratversorgung der Knöllchen direkt die N_2 -Fixierung reguliert. Diese Annahme wurde unterdessen mehrfach widerlegt (Hartwig *et al.* 1990; Denison *et al.* 1992; Hartwig *et al.* 1994; Weisbach *et al.* 1996). Demgegenüber existieren Hinweise, dass der Bedarf nach symbiotisch fixiertem Stickstoff über die Nodulation die N_2 -Fixierungsleistung regulieren kann (Parsons *et al.* 1993). Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass die Zunahme der N_2 -Fixierungsleistung unter erhöhtem CO_2 erst nach mehreren Tagen, parallel mit einer Zunahme der Knöllchenzahl, beziehungsweise -masse, erfolgte (Zanetti

et al. 1994). Im Gegensatz zu diesen langfristigen Anpassungen, werden kurzfristige Veränderungen der Nitrogenase-Aktivität durch eine variable Knöllchen-Sauerstoffpermeabilität reguliert, die scheinbar ebenfalls in einem direkten Zusammenhang mit dem Bedarf nach symbiotisch fixiertem Stickstoff steht (Hartwig und Nösberger 1994). Hier vermuten wir einen «N-Feedback»-Mechanismus, der über die Menge und Zusammensetzung freier Aminosäuren im Phloem in den Knöllchen den N-Bedarf signalisiert. Erste positive Hinweise für diese Hypothese existieren aus den Arbeiten von Oti-Boateng und Silsbury (1993), Heim *et al.* (1993) und Hartwig *et al.* (1994).

Durch das vorübergehend reduzierte Wachstum nach einem Schnitt, reduziert sich dementsprechend der Bedarf nach symbiotisch fixiertem Stickstoff (Hartwig *et al.* 1994). Bereits eine Stunde nach einem Schnitt, konnte eine signifikante Zunahme der Konzentration der Haupttransport-Aminosäuren im Xylem und in den Knöllchen von Weissklee gemessen werden. Diese Tatsache stellt eine erste Bestätigung für eine «N-Feedback»-Regulation der Nitrogenase-Aktivität dar. Nachdem weitere Stickstoffmetaboliten untersucht werden müssen, stehen wir aber auch vor der Herausforderung, diese «N-Feedback»-Hypothese mit der Veränderung der Knöllchen-Sauerstoffpermeabilität zu verknüpfen. Dies ist umso schwieriger, da der Mechanismus, wie die Sauerstoff-Permeabilität reguliert wird, nach wie vor nicht geklärt ist. Aufgrund von Untersuchungen, die in Zusammenarbeit mit dem Labor für Elektronenmikroskopie der ETH-Zürich (Dr. P. Walther und Dr. M. Müller) durchgeführt wurden, können wir einfache morphologische Ver-

änderungen im Knöllchen in diesem Zusammenhang ausschliessen.

Folgerungen

Die symbiotische Stickstoff-Fixierung scheint in einer direkten Beziehung mit dem Bedarf nach symbiotisch fixiertem Stickstoff in der Leguminose selbst, und mit dem N-Bedarf im Ökosystem, als Ganzes zu stehen. Kenntnisse über die Regulation der symbiotischen Stickstoff-Fixierung versprechen daher Einblicke in die Steuerung der Stickstoffernährung von Ökosystemen und an das Verständnis der Koexistenz zwischen Nicht-Leguminosen und Leguminosen (Biodiversität).

DANK

Herzlichen Dank für die Mithilfe im Feldexperiment und für die Installation und Betreuung der CO₂-Begasungsanlage an Dr. H. Blum, K. Rüegg, S. Koller, R. Bossi, P. Jäger, P. Schlüssel und R. Godard. Im Labor war A. Dürsteler eine unentbehrliche Kraft. Die verschiedenen Projekte wurden finanziert durch den Nationalen Energie Forschungs Fond, das Bundesamt für Energiewirtschaft, das Bundesamt für Landwirtschaft, den Schweizerischen Nationalfonds und die ETH-Zürich.

LITERATUR

- Boller B.C. and Nösberger J., 1987. Symbiotically fixed nitrogen from field-grown white and red clover mixed with ryegrass at low levels of ¹⁵N-fertilization. *Plant and Soil* **104**, 219-226.
- Denison R.F., Hunt S. and Layzell D.B., 1992. Nitrogenase activity, nodule respiration, and O₂ permeability following detopping of alfalfa and birdsfoot trefoil. *Plant Physiology* **98**, 894-900.
- Gifford R.M., 1992. Interaction of carbon dioxide with growth-limiting environmental factors in vegetation productivity: Implications for the global carbon cycle. In: *Advances in Bioclimatology* (R.L. Desjardins, R.M. Gifford, T. Nilson, E.A.N. Greenwood, eds.). Vol. 1, Springer, Berlin, pp. 26-58.
- Hartwig U.A., Boller B.C., Baur-Höch B. and Nösberger J., 1990. The influence of carbohydrate reserves on the response of nodulated white clover to defoliation. *Annals of Botany* **65**, 97-105.
- Hartwig U.A., Heim I., Lüscher A. and Nösberger J., 1994. The nitrogen-sink is involved in the regulation of nitrogenase activity in white clover after defoliation. *Physiologia Plantarum* **92**, 375-382.
- Hartwig U.A., and Nösberger J., 1994. What triggers the regulation of nitrogenase activity in forage legume nodules after defoliation? *Plant and Soil* **161**, 109-114.
- Hartwig, U.A., Zanetti, S., Hebeisen, T., Lüscher A., Frehner, M., Fischer, B., Van Kessel, Ch., Hendrey, G.R., Blum, H. and Nösberger, J., 1996. Symbiotic nitrogen fixation: one key to understand the response of temperate grassland ecosystems to elevated CO₂? In: *Carbon Dioxide, Populations, and Communities*

(Ch. Körner and F. Bazzaz, eds.). Academic Press, San Diego, 253-264.

Hebeisen T., Stadelmann F., Zanetti S., Fischer B., Lüscher A., Hartwig U.A., Blum H. and Nösberger J., 1994. Auswirkungen einer erhöhten CO₂-Konzentration in der Atmosphäre - wie reagieren Gras/Klee-Gemenge? *Mitteilungen der Gesellschaft für Pflanzenbauwissenschaften* **7**, 199-202.

Heim I., Hartwig U.A. and Nösberger J., 1993. Current nitrogen fixation is involved in the regulation of nitrogenase activity in white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant Physiology* **103**, 1009-1014.

Jongen M., Jones M.B., Hebeisen T., Blum H. and Hendrey G.R., 1995. The effects of elevated CO₂ concentrations on the root growth of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* grown in a FACE system. *Global Change Biology* **1**, 361-371.

Lüscher A., Hebeisen T., Zanetti S., Hartwig U.A., Blum H., Hendrey G.R., and Nösberger J. 1996. Interspecific and intraspecific variability in the responses to free air carbon-dioxide enrichment in species of permanent grassland. In: *Carbon Dioxide, Populations, and Communities* (Ch. Körner and F. Bazzaz, eds.). Academic Press, San Diego, 287-300.

Oti-Boateng C. and Silsbury J.H., 1993. The effects of exogenous amino acid on acetylene reduction activity of *Vicia faba* L. cv. Fiord. *Annals of Botany* **71**, 71-74.

Parsons R., Stanforth A., Raven A.J. and Sprent J.I., 1993. Nodule growth and activity may be regulated by a feedback mechanism involving phloem nitrogen. *Plant Cell and Environment* **16**, 125-136.

Seresinhe T., Hartwig U.A., Kessler W. and Nösberger J., 1994. Symbiotic nitrogen fixation of white clover in a mixed sward is not limited by height of repeated cutting. *Journal of Agronomy and Crop Science* **172**, 279-288.

Weisbach C., Hartwig U.A., Heim I. and Nösberger J., 1996. Whole nodule carbon metabolites are not involved in the regulation of the oxygen permeability and nitrogenase activity in white clover nodules. *Plant Physiology* **110**, 539-545.

Zanetti S., Hartwig U.A., Hebeisen T., Hendrey G.R., Blum H. and Nösberger J., 1995. Effect of elevated atmospheric CO₂ on performance of symbiotic nitrogen fixation in white clover in the field (Swiss FACE experiment) and possible ecological implication. In: *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications* (I.A. Tikhonovich, V.I. Romanov, N.A. Provorov, W.E. Newton, eds). Kuwer Academic Publishers, Dordrech, p. 615.

Zanetti S., Hartwig U.A. and Nösberger J., 1994. Response of N₂ fixation of white clover to elevated CO₂. In: *Proceedings of the first European Nitrogen Fixation Conference* (G.B. Kiss, G. Endre, eds.). Officina Press, Szeged, p. 325.

RÉSUMÉ

La fixation symbiotique: une interface entre plante et sol

La productivité des écosystèmes prairiaux est le plus souvent limitée par le

carbone et l'azote. On suppose que selon la manière dont la séquestration du C augmente dans un écosystème sous un pCO₂ atmosphérique élevé, la limitation de la productivité due à l'azote devient même plus frappante.

Ainsi la fixation de N₂ symbiotique (¹⁵N isotope technique de dilution) sous un pCO₂ élevé a été examinée dans des conditions de terrain et avec la technique du FACE pendant trois ans. Le pourcentage d'azote de plante dérivé de la fixation symbiotique de N₂ augmentait sous un pCO₂ élevé. Tout l'azote assimilé additionnellement était dérivé de la fixation symbiotique de N₂ et rien de la terre ou de l'engrais. En moyenne, le total de la fixation N₂ a augmenté de 40 % pendant les trois années. On suppose que l'augmentation de la fixation de N₂ provient de la compétitivité du trèfle blanc dans une plantation mélangée. Ce peut être un facteur crucial pour maintenir le rapport C:N de la biosphère entière. Au niveau de la plante individuelle, des expériences en chambres climatiques peuvent indiquer la fonction d'un mécanisme de «feedback» de l'azote pour régulariser l'activité de la nitrogénase.

SUMMARY

Symbiotic N₂-fixation: a soil-plant interface

Productivity of grassland ecosystems are mostly carbon and nitrogen limited. It is assumed that as C-sequestration into an ecosystem increases under elevated atmospheric pCO₂, nitrogen limitation of productivity becomes even more striking. Thus symbiotic N₂ fixation (¹⁵N isotope dilution technique) under elevated atmospheric pCO₂ was investigated under field conditions using the FACE technology during three years. Percentage of plant nitrogen derived from symbiotic N₂ fixation increase under elevated pCO₂. All additionally assimilated nitrogen was derived from symbiotic N₂ fixation and none from soil and fertilizer. Averaged across all three years, total N₂ fixation increased by 40 %. It is suggested that increased N₂ fixation is a competitive advantage of white clover in a mixed sward and may be a crucial factor for maintaining the C:N ratio in the biosphere as a whole. At the single plant level, growth chamber experiments indicate the function of a nitrogen feedback mechanism to regulate nitrogenase activity.

KEY WORDS: symbiotic nitrogen fixation; elevated atmospheric CO₂; nitrogenase activity; ¹⁵N-isotope dilution