

Acknowledgements

This study was completed with financial help from the CHARLES BULLARD Foundation at Harvard University. I am thankful to Professors P. S. ASHTON (Director of the Arnold Arboretum) and K. S. BAWA (University of Massachusetts, Boston) for their kind and unlimited help in various ways.

Literature cited

BRITWUM, S. P. K.: Artificial hybridization in the genus *Ulmus*. Proc. 8th NE. Forest Tree Improv. Conf.: 43–7 (1960). — COLLINS, P. E.: Hybridization studies in the genus *Ulmus*. Unpubl. Ph. D. Thesis, University of Minnesota. 118 pp. (Dissert. Abst. 1968. 288 (12 pt. 1) 4828–9) (1967). — FEDOROV, A. A. (Ed.): Chromosome numbers of flowering plants. *Ulmaceae* — p. 710–11. Academy of Science of USSR. V. L. Komarov Botanical Institute, Leningrad. 926 pp. (1969). — HEYBROEK, H. M.: Taxonomy, crossability and breeding of elms. Int. Symp. Dutch elm disease. Feb. 26–28, 1968. Iowa State University, Ames (1968). — JOHNSON, L. P. V.: Fertilization

in *Ulmus* with special reference to hybridization procedure. Canad. J. Res. 24C: 1–3 (1946). — LESTER, D. T.: Genetics and breeding of American elm. Proc. 16th NE. Forest Tree Improv. Conf.: 9–13 (1968). — LESTER, D. T.: Self compatibility and inbreeding depression in American elm. Forest Sci. 17: 321–2 (1971). — MARTIN, F.: Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. Stain Technology 34: 125–8 (1958). — MELVILLE, R.: *Ulmus* L. pp 292–9. in C. A. Stace, Ed. Hybridization and the flora of the British Isles. Academic Press, London (1975). — MELVILLE, R.: On the discrimination of species in hybrid swarms with special reference to *Ulmus* and the nomenclature of *U. minor* MILL. and *U. carpinifolia* GLED. Taxon 27: 345–51 (1978). — RICHENS, R. H.: On fine distinctions in *Ulmus* L. Taxon 29: 305–12 (1980). — RICHENS, R. H. and J. N. R. JEFFERS: Multivariate analysis of the elms of northern France I. Variation within France. *Silvae Genetica* 24: 141–50 (1975). — RICHENS, R. H. and J. N. R. JEFFERS: Multivariate analysis of the elms of northern France II. Pooled analysis of the elm populations of northern France and England. *Ibid.* 27: 85–95 (1978). — SANTAMOUR, F. S. JR.: New chromosome counts in *Ulmus* and *Platanus*. *Rhodora* 71: 544–7 (1969). — SANTAMOUR, F. S. JR.: Interspecific hybridization with fall and spring — flowering elms. *Forest Sci.* 18: 283–9 (1972).

Nachweis und physiologische Aspekte von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Inhibitor(en) in keimendem Fichtensaatgut (*Picea abies* (L.) Karst.)

VON W. SCHINDLBECK

Lehrstuhl für Forstpflanzenzüchtung und Immissionsforschung der Ludwig Maximilians-Universität München

(Eingegangen 23. April 1981)

Zusammenfassung

Durch enzymatische Messungen wird nachgewiesen, daß in der Quellungsphase der Keimung von Fichtensaatgut G6P-DH-Inhibitor/en ausgeschieden wird/werden.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, daß der/die nachgewiesene(n) Inhibitor(en) die Aktivität endogener G6P-DH und damit die Keimfähigkeit des Saatgutes beeinflussen kann/können.

Schlagworte: Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Inhibitor, keimendes Fichtensaatgut, Nachweis, physiologische Aspekte, *Picea abies*.

Summary

It is demonstrated by enzyme measurements that during soaking stage of seed material from Norway spruce substance/s inhibitory to G6P-DH is/are secreted.

The inhibitor/s proved is/are supposed to influence the activity of endogenous G6P-DH, i.e. the germination rate of seed material.

Key words: Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase, inhibitor, germinating seed, Norway spruce (*Picea abies*), proof, physiological aspects.

Abstract

Proof and Physiological Aspects of Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase-Inhibitor(s) in Seed Material from Norway

Anschrift des Verfassers:

DR. W. SCHINDLBECK, Lehrstuhl für Forstpflanzenzüchtung und Immissionsforschung der Ludwig Maximilians-Universität, Amalienstraße 52, D-8000 München 40.

Spruce (*Picea abies* (L.) KARST.) during Germination. By means of enzyme measurements germinating seed material (*P. abies*) of different vitality is shown to secrete substance(s) inhibitory to vital Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase. Physiological aspects of the results (kinetic data) are discussed.

1. Einleitung

Die Keimfähigkeit von Saatgut ist durch das Zusammenwirken exo- und endogener Faktoren festgelegt. Umweltbedingte Einflüsse wie Feuchtigkeit, Temperatur, Substratzusammensetzung u. a. sind exogene Faktoren, während die genetische Anlage und damit physiologisch-biochemische und morphologische Merkmale des Saatgutes zu den endogenen Faktoren zählen. Diese Faktoren können die Keimung fördern oder hemmen. So sind bei der Saatgutlagerung reversibel keimhemmende, im Keimstadium hingegen optimal keimfördernde Faktoren zu beachten (SCHÖNBORN VON, 1964).

Bei Fichte konnte bereits früher zwischen Keimfähigkeit und Ionenausscheidung durch keimendes Saatgut eine enge Korrelation nachgewiesen werden (SCHINDLBECK, 1981). Dieser Befund und die Tatsache, daß viele lebensnotwendige Enzyme (endogene Faktoren) durch Ionen gehemmt bzw. aktiviert werden (BERGMAYER, 1970), waren Anlaß zur vorliegenden Arbeit.

Am Beispiel der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH), einem Enzym von zentraler Bedeutung für die Keimfähigkeit, sollte untersucht werden, ob und unter welchen Bedingungen die endogenen, teilweise ionischen

Tabelle 1. — Eingesetztes Fichtensaatgut

Probe-Nr.	K _{21T} (%)	Abtrennbare Verunreinigungen (%)
46 584	78	0,6
444	53	5,0
442	83	7,5
439	95	2,2
438	72	5,7
724	60	0,9
637	32	0,7
630	51	4,5
629	47	2,1
624	67	6,7
778	94	0,2
806	74	0,6
832	75	4,3
836	89	0,5
835	87	2,0
834	86	2,4
805	90	2,2
804	90	2,8
777	95	2,2
534	92	0,9

(Sämtliche enzymatischen Untersuchungen wurden, unmittelbar daran anknüpfend, vom Januar 81—Februar 81 durchgeführt. Die genannten Keimprozentage waren daher für die Auswertungen (Kap. 3) verwendbar.

Substanzen, die während der Keimung in das Keimmedium abgegeben werden, den endogenen Faktor „Enzymaktivität“ und damit die Keimfähigkeit beeinflussen könnten.

2. Material und Methoden

2.1 Samenmaterial von *Picea abies*

Für die Untersuchungen wurden 20 mit Flügel, Spreu ff. geringfügig verunreinigte Saatgutproben eingesetzt, deren maximale Keimfähigkeiten (K) in der amtlich anerkannten Prüfstelle für forstliches Saatgut (im Hause) in der Zeit von November 80—Februar 81 nach Entfernung der Verunreinigungen mit 3 Standardmethoden (mit Keimschrank bzw. Jacobsenapparat) bestimmt worden war.

Tabelle 1 gibt die untersuchten Probennummern mit den maximalen Keimfähigkeiten nach 21 Tagen Keimdauer (K_{21T}) wieder. Ergänzend sind die abtrennbaren Verunreinigungen angeführt.

2.2 Geräte, Präparate, Lösungen

2.2.1 Zu den Untersuchungen dienten in der Hauptsache folgende Geräte:

Grating Spectrophotometer DB-GT mit 10“-Recorder (Beckman), Zentrifuge Type „Minifuge“ (Heraeus Christ), Mikrowaage Type H 54 (Mettler), Waage mit halbautomatischem Taraabgleich Type 1265 MP für die Einwaagen zu Kap. 2.3.1 (Sartorius)

2.2.2 Biochemica (alle Boehringer Mannheim):

G6P-DH (EC 1.1.1.49) aus Hefe, Suspension in 3,2 M Ammoniumsulfat pH 6, Reinheitsgrad I.

Glucose-6-Phosphat¹⁾, Dinatriumsalz, enzymatische Reinheit 77%.

β -Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat²⁾, Dinatriumsalz, enzymatische Reinheit 98%.

2.2.3 Weitere Chemikalien (Merck Darmstadt):

Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (pa.) und MgCl₂·6H₂O (pa.).

2.2.4 Lösungen:

a) 0,1 M Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Hydrochlorid) pH 7,6 (hergestellt mit freier Base und HCl)

b) 0,1 M MgCl₂

c) G6PNa₂-Lösung mit Wasser: 10 mg 77% Salz/ml.

d) NADPNa₂-Lösung mit Wasser: 10 mg 98% Salz/ml.

e) G6P-DH-Lösungen mit 20° C-Volumenaktivitäten von jeweils 24,1 (Abb. 1, 2), 22,3 (Abb. 3) und 19,0 μ Mol NADP/Min. ml Enzymverdünnung (Abb. 4). Die Verdünnungen der Enzymsuspension (ca. 1:10) wurden mit Trispuffer vorgenommen. Testbedingungen, vgl. Kap. 2.3.2.

Für die Herstellung von Lösungen und zum Ankeimen (Kap. 2.3.1) wurde stets entsalztes Wasser der spezifischen elektrischen Leitfähigkeit L ca. 1 μ S/cm verwendet.

Vor Einsatz zum Enzymtest wurden die stets frisch angesetzten Lösungen von G6P-DH und NADP eiskühlt. Alle übrigen Lösungen wurden vorher auf Testtemperatur (20°) gebracht.

Die üblichen Lagerungsempfehlungen für Trockensubstanzen, Suspensionen und Lösungen sind zu beachten (Boehringer 1968, 1973).

2.3 Keimansätze und enzymatische Messungen

2.3.1 Keimansätze:

Je Probe wurden 1,5 g Saatgut in 10 ml Wasser angekeimt (Bedingungen, vgl. SCHINDLBECK, 1981).

2.3.2 Enzymatische Messungen:

Unmittelbar nach Ablauf der vorgesehenen Keimzeit wurden die Keimmedien vom Saatgut abpipettiert und zentrifugiert (4000 RPM/5 Minuten/20°/Auslauf ohne Bremse). Die Niederschläge wurden verworfen, die klaren, meist gelblich gefärbten Überstände (pH stets ca. 5,5) wurden eingefroren zum Enzymtest aufbewahrt.

Zur Durchführung des Enzymtests wurden die aufgetauten Überstände auf 20° C gebracht. Der Test wurde in Anlehnung an vorhandene Vorschriften ausgearbeitet (Boehringer 1968, 1973).

Testbedingungen:

Fotometrische Messung im Einstrahlbetrieb bei einer Meßstrahlung von 366 nm und bei 20° C; Glascuvette (d = 1 cm/V = 3 ml). Meßbereich: 0—1 Extinktionseinheit. Schreiberdaten: 100 mV Spannung und 0,5 Inches/Min. Papierorschub.

Die Cuvette enthielt:

2,39 ml Lösung a)

0,20 ml Wasser oder/und Medium (vgl. Tabelle 2)

0,20 ml Lösung b)

0,10 ml Lösung c)

0,10 ml Lösung d)

0,01 ml Lösung e)

Gestartet wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von Lösung e).

Die Volumenaktivität (VA) betrug:

VA = 90,91. (ΔE /Minute), dimensioniert in μ Mol NADP/Min. ml Enzymverdünnung.

Die Werte ΔE /Min. sind den Kinetiken analog Abb. 1 (Kap. 3) entnehmbar.

¹⁾ = G6PNa₂ oder G6P

²⁾ = NADPNa₂ oder NADP

Tabelle 2. — Volumina an Wasser bzw. Keimmedium (ml), die in den Versuchen zu Abb. 1—4 eingesetzt wurden.

	Wasser	Medium
Abb. 1 (Kurven 1-3)	0	0,2
Abb. 1 (Kurve 0), entsprechend Aktivitätsbestimmungen ungehemmter Lösungen e)	0,2	0
Abb. 2	wie bei Abb. 1, wie bei Abb. 1	
Abb. 3	0-0,2	0,2-0
Abb. 4	0	0,2

3. Ergebnisse und Diskussion

G6P-DH ist neben anderen Enzymen für den ungestörten Ablauf des Keimstadiums von großer Bedeutung. Sie ist auf vielfältige Weise mit zentralen Stoffwechselwegen verknüpft. So kann dieses Enzym zur Produktion von Pentosen (Bausteine der Nucleinsäuren) biosynthetisch wirksamen Reduktionsäquivalenten (NADPH) u. a. beitragen (LEHNINGER, 1972).

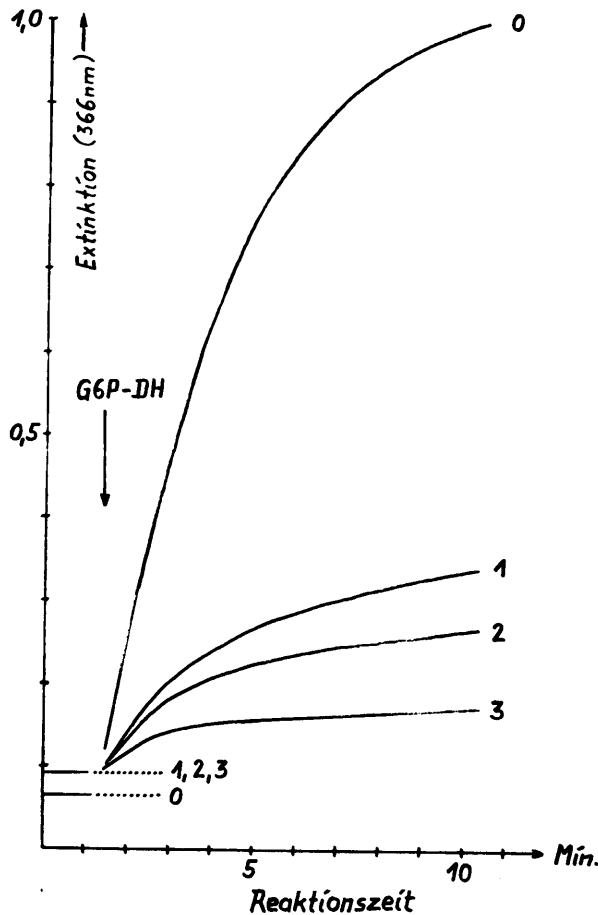
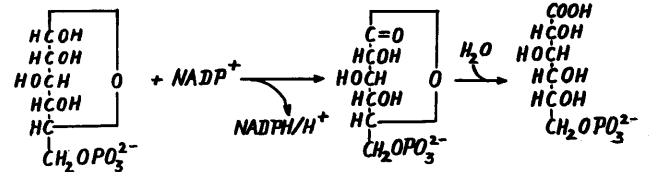


Abb. 1. — Einfluß der Keimzeit auf die Kinetik der G6P-DH-Reaktion

Parameter: Kurve 0 = Keine Keimung (Test mit entsalztem Wasser statt Medium). Kurven 1—3 = Keimzeiten von 1—3 Tagen (Tests mit Keimmedium). Verwendetes Saatgut: Nr. 46534. Testbedingungen, vgl. Kap. 2.

Influence of germination time on kinetics of the G6P-DH-reaction
Parameters: Kinetic 0 = no germination (test with deionized water substituted for growth medium). Kinetics 1—3 = germination times of 1—3 days (tests with growth medium). Used seed: Nr. 46534. Further conditions, compare chapter 2.

G6P-DH katalysiert primär folgende Reaktion:



Glucose-6-Phosphat

6-Phospho-Gluco-
no-δ-Lacton

6-Phospho-
Gluconat

Formel 1. —

Die Aktivität, mit der dies geschieht, wird durch die Verbindung NADPH indiziert, die bei der Reaktion aus NADP gebildet wird.

Diese Verbindung absorbiert in hohem Maße Licht der Wellenlänge 366 nm, d. h. die fotometrisch nach dem Enzymstart meßbare Extinktionszunahme pro Zeiteinheit ist ein Maß für die Enzymaktivität (Abb. 1).

Aus Abb. 1 ist zu entnehmen, daß keimendes Fichtensaatgut mit fortschreitender Keimzeit zunehmend enzymhemmende Substanz/en in das Keimbett ausscheidet.

Möglicherweise wird diese Hemmwirkung, wie einleitend bemerkt, durch Ionen induziert, die das Saatgut während der Keimung abgibt. Man weiß z. B. um die Hemmwirkung höherer Mg^{2+} -Konzentrationen und weiterer zweiwertiger Metallionen. Auch Phosphat kann das Enzym unter bestimmten Bedingungen hemmen. (Boehringer 1968, 1973).

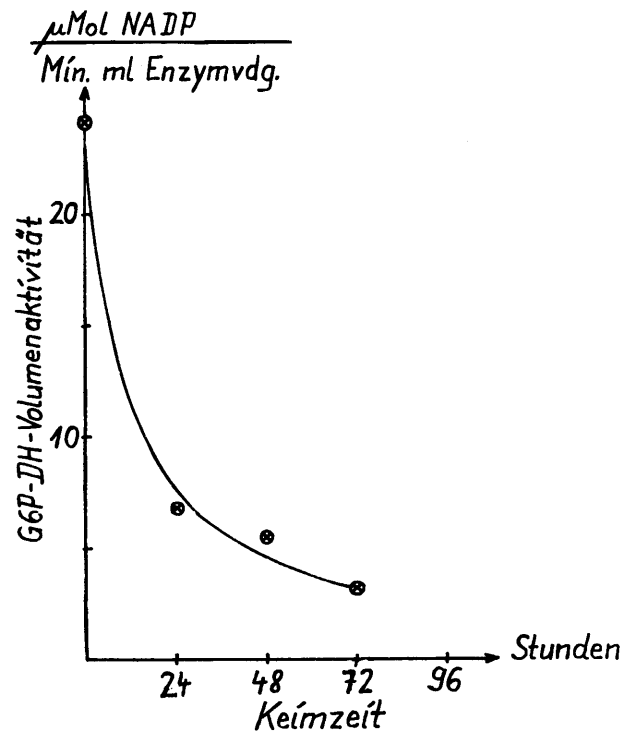


Abb. 2. — Einfluß der Keimzeit auf die Startgeschwindigkeit („Volumenaktivität“) der G6P-DH-Reaktion.

Die Werte sind den Kinetiken von Abb. 1 entnommen, vgl. Kap. 2.3.2.

Influence of germination time on the initial rate („volume activity“) of the G6P-DH-reaction.

Values are taken from the kinetics shown in fig. 1, comp. chapter 2.3.2.

Abb. 2 veranschaulicht anhand der Probe Nr. 46.534, daß bereits innerhalb der ersten 24 Stunden Keimzeit (Quellungsstadium) eine erhebliche Inhibitorausscheidung erfolgt war.

Abb. 3 zeigt am Beispiel derselben Probe ($K_{21T} = 92\%$) eine Inhibitorabhängigkeit nach 24 Stunden Keimzeit. Mit $200 \mu\text{l}$ Keimmedium wurde die Volumenaktivität des Enzyms zu ca. 63% gehemmt (vgl. hierzu auch Abb. 4).

Wie Abb. 4 zeigt, schieden weitere 19 Saatgutproben verschiedenster Keimfähigkeiten ausnahmslos G6P-DH-Inhibitor/en in das Keimmedium aus.

Rest-Volumenaktivitäten ≥ 0 und entsprechend geringere Hemmeffekte wurden vorzugsweise mit Keimmedien von relativ gut keimfähigem Saatgut gefunden. Eine enge Korrelation zwischen Keimprozent und Hemmstoffausscheidung war jedoch nicht abzuleiten.

Eine erhöhte Inhibitorausschüttung bei keim schwächerem Saatgut (vgl. Abb. 4) könnte mit Vorbehalt so gedeutet werden, daß das betreffende Saatgut unter dem Einfluß eines hohen zellulären Inhibitorgehaltes steht, der die Aktivität endogener G6P-DH und damit die Keimung negativ beeinflusst. Derartige Keimhemmungen sollten, Reversibilität

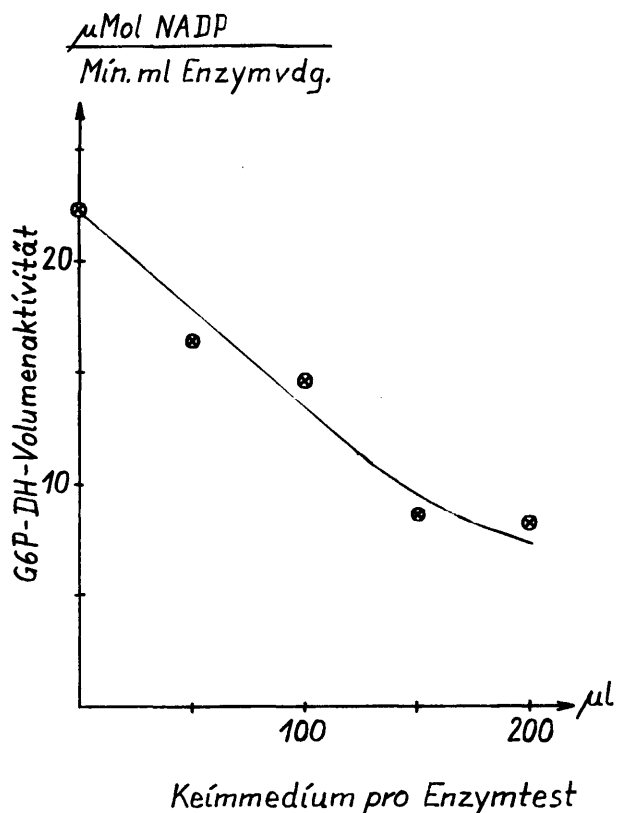


Abb. 3. — Abhängigkeit der G6P-DH-Volumenaktivität von der Hemmstoffkonzentration.

Verwendetes Saatgut: Nr. 46534. Keimzeit: 24 Stunden. Testbedingungen, vgl. Kap. 2.

Dependence of the volume activity of G6P-DH upon the concentration/s of inhibitor/s.

Used seed: Nr. 46534. Germination time: 24 hours. Test conditions, comp. chapter 2.

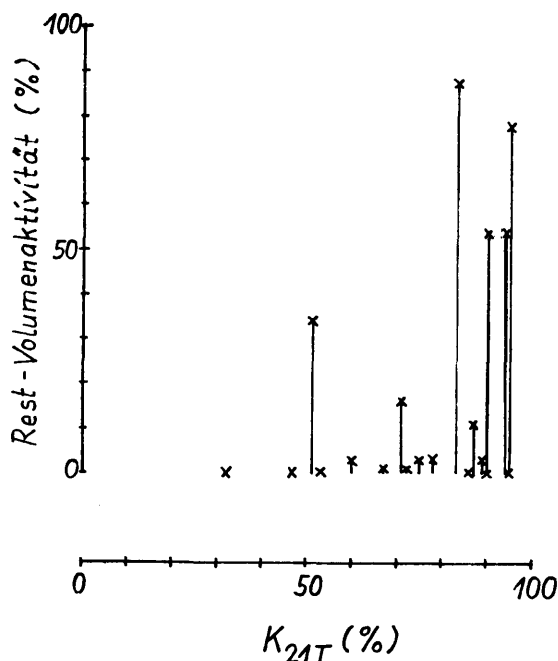


Abb. 4. — Hemmeffekte der Keimmedien von Saatgut unterschiedlicher Keimfähigkeit auf die Volumenaktivität von G6P-DH.

Hemmeffekte sind als Rest-Volumenaktivität (%) wiedergegeben. 100%: Test mit entsalztem Wasser statt Keimmedium. Die Enzymtests wurden nach 24 Stunden Keimzeit mit je $200 \mu\text{l}$ Keimmedium vorgenommen. K_{21T} = Keimprozent nach 21 Tagen Keimzeit (Bestimmung und weitere Testbedingungen, vgl. Kap. 2).

Inhibitory effects of growth mediums from seed materials of different vitality on the volume activity of G6P-DH

Inhibitory effects are shown as residual volume activity in %. 100%: Test with deionized water substituted for growth medium. Enzyme measurements were carried out with $200 \mu\text{l}$ growth medium per test after a germination time of 24 hours. K_{21T} = germination rate (%) after a germination time of 21 days (determination and further test conditions, comp. chapter 2).

vorausgesetzt, durch externe Anwendung geeigneter permeabler Enzymaktivatoren überwindbar sein.

Die Primärwirkung der während der Quellungsphase beobachteten Inhibitorabgabe wäre in einer parallel zur Ausscheidung verlaufenden Aktivierung der lebensnotwendigen G6P-DH denkbar.

Eine keimungsfördernde Sekundärwirkung der abgegebenen Inhibitormolekel könnte darin bestehen, daß G6P-DH-abhängige Fremdorganismen wie Pilze u. a. durch Inhibitoraufnahme in ihrem Wachstum zugunsten der keimenden Fichtensamen eingeschränkt werden.

Hemmstoffe der beschriebenen Art tragen möglicherweise dazu bei, daß die Enzymaktivitäten ruhenden Saatgutes (z. B. bei der Lagerung) minimiert bleiben.

Literatur

- ANONYMUS: Biochemica-Informationen zu G6P und G6P-DH, Firma Boehringer Mannheim (1968, 1973). — BERGMAYER, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße (1970). — LEHNINGER, A.: Biochemistry. Worth Publ. Inc., New York (1972). — SCHINDLBECK, W.: Die rasche Beurteilung der Keimfähigkeit von Fichtensaatgut (*P. abies* (L.) KARST.) durch Leitfähigkeitsmessungen. Forstwissenschaftliches Centralblatt (1981, im Druck). — SCHÖNBORN VON, A.: Die Aufbewahrung des Saatgutes der Waldbäume. BLV-Verlagsgesellschaft, München-Basel-Wien (1964).