

Die Keimverzögerung der Samen von *Iris Pseudacorus* L.

Autor(en): **Kartaschoff, Rosemarie**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse**

Band (Jahr): **68 (1958)**

PDF erstellt am: **18.04.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-47914>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Die Keimverzögerung der Samen von *Iris Pseudacorus* L.

Von Rosemarie Kartaschoff

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Basel)

Eingegangen am 14. März 1958

Inhalt	Seite
Einleitung	145
Versuchsobjekt	148
Methodik	149
A. Aufzucht isolierter Embryonen	149
B. Statistische Prüfung der Ergebnisse	150
Keimung der Samen	151
A. Die Keimung intakter Samen	151
B. Die Keimung angeschnittener Samen	153
C. Die Entwicklung isolierter Embryonen	157
Wachstum des Keimlings	157
Wasserhaushalt und Gasaustausch	161
Kohlehydratstoffwechsel	164
A. Methoden der Zuckerbestimmung	164
B. Resultate	165
Experimentelle Veränderung der Entwicklung isolierter Embryonen	167
Diskussion	175
Zusammenfassung	179
Zitierte Literatur	180

Einleitung

Die Samen höherer Pflanzen sind beim Erreichen ihrer Reife oft nicht keimfähig, sondern bedürfen nach der Abtrennung von der Mutterpflanze einer Ruheperiode. Dies begünstigt ihre Rolle als Verbreitungseinheit. Die Ruhe erstreckt sich häufig über mehrere Monate und verlangt zu ihrer Unterbrechung oft Temperaturschwankungen um null Grad, Feuchtigkeit und Licht (Lichtkeimer), Bedingungen, die im mitteleuropäischen Klima erfüllt sind. Die Samen erhalten ihre Nachreife während der Winterruhe und keimen zu Beginn der neuen Vegetationsperiode.

Bei der Gattung *Iris* werden unverhältnismäßig lange Ruhezeiten beobachtet, die sich über mehrere Jahre erstrecken können (Werckmeister, 1937). Die Keimung setzt nur langsam und unvollständig ein, die Keimfähigkeit bleibt dafür sehr lange erhalten. Obschon in der Praxis

Methoden gefunden wurden, um die dem Züchter unerwünschte Ruheperiode zu verkürzen und die Keimung frühzeitig auszulösen, bleibt der Mechanismus der Keimungshemmung ungeklärt. Ähnliche Fälle von verzögerter Keimung finden sich auch bei Samen der *Rosaceae*, *Leguminosae* und anderer Familien.

Der erste Versuch, diese Erscheinung zu erklären, beruht auf der Annahme, im eben reif gewordenen Samen seien die Reservestoffe dem Embryo noch nicht zugänglich, sondern würden erst während der Nachreife in einen löslichen Zustand übergeführt. Eine genügende Menge verfügbarer Nährstoffe würde demnach den Embryo zur Keimung veranlassen. Flemion (1933), Stokes (1952 und 1953) und Vallance (1952) untersuchten die Veränderungen der Reservestoffe im Samen während der Nachreife, vor allem die Hydrolyse der Reserveeiweiße und Verschiebungen von Art und Menge der einzelnen Aminosäuren bei Kältebehandlungen. Daneben wurden auch Reservekohlehydrate, Reservefette und die entsprechenden Abbauprodukte bestimmt. Diese Hydrolysevorgänge sind jedoch sekundärer Natur (Borriss und Schneider, 1955) und stellen nicht den eigentlich keimungsauslösenden Faktor dar, da ihnen eine Aktivierung der entsprechenden Fermente vorausgehen muß. Eine deutliche Erhöhung der Fermentaktivität während der Nachreife konnte bei den untersuchten Samen allgemein gefunden werden, obschon nicht immer die gleichen Fermente daran beteiligt sind. Lasheen und Blackhurst (1956) konnten in Samen von *Rubus* eine maximale Aktivität von Katalase, Peroxydase und Lipase nach einer vier- bis fünfmonatigen Nachreife feststellen, zu der Zeit also, da die Samen normalerweise auskeimen. Nach weiteren zwei Monaten wird die Aktivität wieder merklich geringer. Es läßt sich nun denken, daß die Regulation der Fermenttätigkeit über die Stoffe geht, die als eigentliche Keimungshemmstoffe beschrieben worden sind. Das nachfolgende Beispiel stammt aus den Arbeiten von Laibach und Keil (1937) und Keil (1939). Apfelsamen enthalten immer Blausäure, die aus dem Nitrilglukosid Amygdalin stammt, und die alle Fermente vom Typus der Schwermetallproteide blockiert. Der Apfelembryo kann nur durch Isolierung und gründliches Auswaschen zur Entwicklung gebracht werden. Die normale Entwicklung des isolierten Embryos scheint allerdings eine geringe Menge von Blausäure zu benötigen, da diese regulierend in den Stoffwechsel eingreift und das Verhältnis zwischen Chlorophyllbildung und Wachstum bestimmt.

In zahlreichen Samen wurde in der Folge nach Realisatoren der Keimungshemmung gesucht, die die Natur eines Fermentinhibitors und eventuell eines spezifischen Wuchsstoffantagonisten besitzen. Diese Keimungshemmstoffe müssen je nach der auf Grund von Experimenten erfolgten Lokalisation der Keimungshemmung in der Samenschale, im Endosperm oder im Embryo gesucht werden. Zum Nachweis keimungshemmender Substanzen werden meist Methoden aus der Wuchsstoffforschung über-

nommen und die keimungshemmende Wirkung von Samenextrakten z. B. als Reduktion des Streckungswachstums von mit Wuchsstoff behandelten *Avena*-Koleoptilen bestimmt (siehe auch Hemberg, 1949, 1950, 1954). Die Keimung ist jedoch ein komplexer Vorgang und kann nicht ohne weiteres mit dem Streckungswachstum verglichen werden. Auch wird von verschiedenen Autoren die Meinung vertreten, daß im ungekeimten Samen keine Wuchsstoffe enthalten sind. Die Keimungsregulation würde demnach nicht durch die Auxine erfolgen (Brown, 1943), Hatcher und Gregory, 1941). Daß diese Methoden doch zum Ziel führen, ist der Tatsache zu verdanken, daß der Hemmstoff offensichtlich an einem oder mehreren zentralen Punkten des Stoffwechsels ansetzt und dadurch die ganze Aktivität des Zellgeschehens beeinträchtigt.

Seltener wird die Untersuchung eines Keimungshemmstoffes an dem Objekt durchgeführt, aus dem er gewonnen werden kann, obschon dies bei einer Lokalisation der Keimungshemmung in der Samenschale oder im Endosperm möglich ist durch Austesten von Extrakten mit dem isolierten Embryo, wie das auch in der vorliegenden Arbeit geschehen ist. Bleibt der Embryo selbst ruhend, so kann er durch eine der üblichen Methoden (Kältebehandlung, Auswaschen) zur Entwicklung gebracht werden, wie sie etwa Wareing und Foda (1957) für ihre Untersuchungen an *Xanthium* verwendeten.

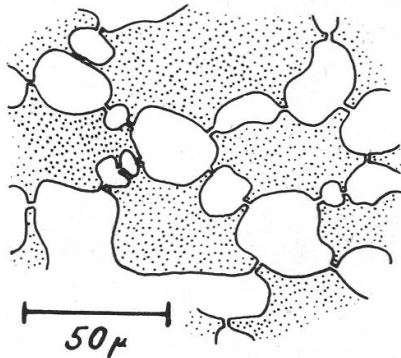
Während die Faktoren der Keimungshemmung häufig in der Samenschale oder im Embryo gefunden wurden, zeigten Randolph und Cox (1943) für *Iris Pseudacorus*, daß das *Endosperm* für die verzögerte Keimung verantwortlich gemacht werden muß, da das Anschneiden oder Entfernen des Endosperms die Zahl der Keimungen stark erhöht. Da auch ein nur noch teilweise anhaftendes Nährgewebe die Entwicklung des Keimlings, verglichen mit der des isolierten Embryos, verlangsamte, dazu ein «atypisches» Wachstum (S. 299) und Störungen der Chlorophyllbildung verursachte, vermuteten die Autoren, daß es sich um den Einfluß eines Keimungshemmstoffes handeln müsse, der aus den angeschnittenen Samen in den Nährboden hinaus diffundiere, wodurch sich die höheren Keimzahlen bei verletzten Samen erklären ließen. Da diese Experimente dem praktischen Ziele der Iriszüchtung dienten, veröffentlichten die Autoren keine weiteren Untersuchungen über die Hemmstoffwirkung.

In der vorliegenden Arbeit sollen die Anschauungen von Randolph und Cox experimentell geprüft werden. Die ausgeprägte Keimverzögerung bei *Iris* kann ihre Ursache in dem (oder den) geforderten Keimungshemmstoff(en) oder aber in einer Mangelerscheinung im Stoffwechsel des jungen Organismus haben, die nicht durch die blockierende Wirkung dieses Hemmstoffes entstanden ist, sondern auf einer ungenügenden Ausbildung von Fermenten beruht.

Als Versuchsobjekt dienen Samen und isolierte Embryonen von *Iris Pseudacorus* L., deren Keimung und Wachstum beobachtet und durch äußere Bedingungen verändert wird.

Versuchsobjekt

Samen von *Iris Pseudacorus* L. wurden im September 1956 in der Umgebung von Basel (Lange Erlen, Birstal bei Bärschwil, étangs de Faverois, Insp. de Belfort) gesammelt, aus den Fruchtknoten befreit und an

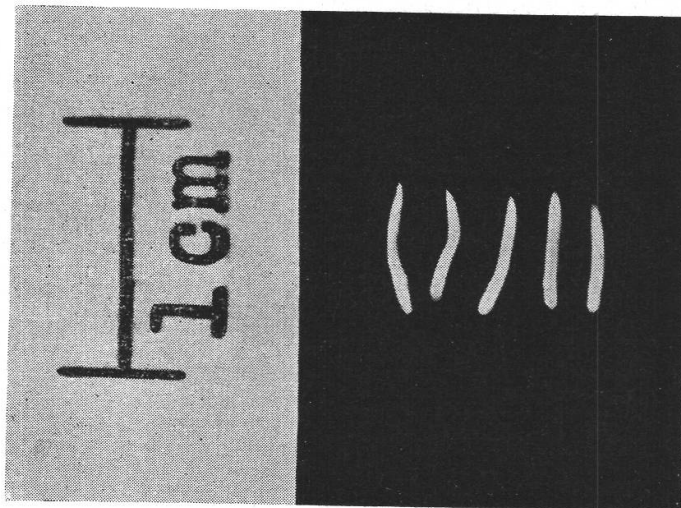


Figur 1

Zellen im Endosperm von *Iris Pseudacorus* L. Zellwände (weiß) stark verdickt durch Anlagerungen von Reservekohlehydraten.

der Luft getrocknet. Die Aufbewahrung erfolgte bei Zimmertemperatur. Bis zum Abschluß dieser Untersuchung blieben sie unverändert in Ruhe.

Die Samen sind eirundlich, flach, ca. 8 mm lang und 2 mm dick. Die hellbraune, spröde Testa umschließt einen lufthaltigen Zwischenraum,



Figur 2

Isolierte Embryonen von *Iris Pseudacorus* L.

der den Samen das Schwimmen ermöglicht. Das Endosperm besitzt Zellen mit Reserveeiweiß, Fett und zellwandverdickenden Ablagerungen von Reservekohlehydraten («Hemizellulosen») (Figur 1). Die zwei äußersten Zellschichten unter der kutinisierten Epidermis sind frei von Reservestoffen. Der walzenförmige Embryo ist etwa 5 mm lang und 1 mm breit (Figur 2). Er besteht aus einem Keimblatt, der Wurzelanlage und einer

seitlich ansetzenden Sproßknospe, die in ungekeimtem Zustande kaum erkennbar ist.

Methodik

A. Aufzucht isolierter Embryonen

Unbeschädigte Samen werden 30 Minuten in Bromdampf und anschließend 30 Minuten in Bromwasser (1/200) im Quellapparat nach Burette (1940) desinfiziert, gewaschen und drei Tage in durchlüftetem Wasser bei 20° bis 25° C aseptisch gequollen. Eine parallele Aufzucht steriler und unsteriler Samen in Torf-Sand-Gemisch zeigt, daß diese Behandlung weder schadet noch die Keimung anregt. Die folgenden Arbeiten werden aseptisch in einem keimfreien Impfkasten durchgeführt. Die Samen werden seitlich angeschnitten, die Hälften voneinander getrennt und der frei im Endosperm liegende Embryo mit einer sterilen Pinzette in eine Petrischale gebracht, die mit einem befeuchteten Filterpapier ausgelegt ist. Nach Isolierung der erforderlichen Zahl werden die Embryonen in geschlossener Petrischale unter dem Binokular bei 30facher Vergrößerung auf kleine Verletzungen geprüft und die beschädigten Exemplare entfernt. Die unverletzten Organismen werden aseptisch auf den Nährboden verpflanzt. Die Aufzucht erfolgt in 50-cc-Weithals-Erlenmeyern, die mit einem Wattestopfen verschlossen werden. Jedes Glas enthält 10 cc Nährboden und nimmt 5 Embryonen auf.

Der Nährboden wird nach den Vorschriften von Randolph und Cox (1943) zubereitet. Neben dem Nährsalzgemisch:

Lösung A

Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	23,6 g
KNO ₃	8,5 g
KCl	6,5 g
mit H ₂ O	ad 500 cc (5 cc/1000 cc Nährlösung)

Lösung B

FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 g
Calgon (NaPO ₃) _n	1,0 g
Mg SO ₄ · 7 H ₂ O	3,6 g
mit H ₂ O	ad 500 cc (5 cc/1000 cc Nährlösung)

und 2% Saccharose werden noch Spurenelemente als A-Z-Lösung nach Hoagland (Schropp und Scharrer, 1933) und bei Versuchen mit Endospermextrakten 0,015 m Phosphatpuffer (nach Soerensen pH 7,0) beigelegt. Die Agarkonzentration beträgt 0,7%, in Versuchen bei 30° C 0,5%, wobei dann die Menge des Nährbodens pro Glas verdoppelt wird. Die Kulturen werden in Klimakammern untergebracht (Temperatur-

schwankungen $\pm 0,5^\circ \text{C}$) und erhalten täglich 12 Stunden Licht, da *Iris Pseudacorus* ein Lichtkeimer ist (Kinzel, 1913). Werden die Versuchstemperaturen rhythmisch geändert, so wird dies mit zwei Temperaturen angegeben. $22^\circ/30^\circ \text{C}$ besagt, daß die Kulturen je 4 Tage bei 22°C und 1 Tag bei 30°C aufgezogen wurden, bei $30^\circ/22^\circ \text{C}$ dagegen je 4 Tage bei 30°C und 1 Tag bei 22°C . Dieses Verhältnis von vier Tagen und einem Tage wurde gewählt, um den Effekt jedes Temperaturstoßes einzeln beobachten zu können, da er ungefähr nach 3 Tagen sichtbar wird. Zudem ist dann nur während 20% der Versuchszeit ein Temperaturunterschied zwischen den Kulturen bei konstanter und bei wechselnder Versuchstemperatur vorhanden, was einen Vergleich der beiden Gruppen erlaubt.

Die Aufzucht ganzer und angeschnittener Samen erfolgt in der gleichen Weise, nur wird dem Nährboden mit Vorteil keine Saccharose beigefügt, da die Entwicklung des Keimlings durch einen Nährboden mit erhöhtem osmotischem Wert geschädigt wird.

B. Statistische Prüfung der Ergebnisse

Keimzahl

Unterschiede in der prozentualen Keimung werden mit Hilfe eines vereinfachten χ^2 -Testes¹ auf ihre Signifikanz geprüft (Fisher, 1954). Aus den Keimzahlen der beiden zu vergleichenden Gruppen wird die Testgröße x berechnet:

$$x = \sqrt{\chi^2} = \frac{h - h'}{\sqrt{\left(\frac{1}{n} + \frac{1}{m}\right) pq}}$$

h und h' : relative Häufigkeit der Keimung

n und m : Anzahl Individuen pro Gruppe

k und k' : Anzahl gekeimter Samen

l und l' : Anzahl nicht gekeimter Samen

$$p = \frac{k + k'}{n + m} \quad q = \frac{l + l'}{n + m}$$

Der kritische Wert x_0 ist numerisch gleich dem Wert t beim Freiheitsgrad ∞ . Er beträgt bei der gewählten Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% 2,576. Ist x größer als x_0 , so darf der Unterschied als signifikant angesehen werden.

¹ Die Methode des vereinfachten χ^2 -Testes wurde mir von Herrn PD Dr. E. Batschelet mitgeteilt, wofür ich ihm an dieser Stelle danken möchte.

Längenwachstum des Sprosses

Die Unterschiede in der Sproßlänge zweier Gruppen von Keimlingen werden mit dem *t*-Test (Fisher, 1954) geprüft.

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{x}'}{\sqrt{\left(\frac{1}{n} + \frac{1}{m}\right) \frac{\sigma_x^2 + \sigma_{x'}^2}{n + m - 2}}}$$

$\bar{x}$ und $\bar{x}'$: Mittelwerte beider Gruppen

σ_x^2 und $\sigma_{x'}^2$: Summen der quadratischen Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert der Gruppe

n und m : Anzahl Individuen pro Gruppe

Da der Freiheitsgrad $n + m - 2$ bei allen Versuchen größer als 60 ist, beträgt der Grenzwert t_0 bei der gewählten Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% 2,660. Ist t größer als t_0 , so darf der Unterschied als signifikant angesehen werden.

Die *Keimgeschwindigkeit* wird ebenfalls mit dem *t*-Test geprüft.

Keimung der Samen

A. Die Keimung intakter Samen

Die Samen von *Iris Pseudacorus* bleiben unter den gewählten Kulturbedingungen (22° C/12 h Licht) vorwiegend in Ruhe. Einzelne Keimungen können immer beobachtet werden, da die individuellen Schwankungen sehr groß sind. Den folgenden Messungen werden daher Gruppen von 50 oder 100 Organismen zugrunde gelegt, um eine statistische Auswertung zu ermöglichen.

Um den Keimungsvorgang der intakten Samen mit der ersten Entwicklung der isolierten Embryonen vergleichen zu können, wird er in zwei Stufen gegliedert. In der ersten Phase (*Stufe I*) verlängert und krümmt sich der Embryo. Beim intakten Samen werden durch die Streckung des Keimblattes Wurzel- und Sproßanlage aus dem Samen herausgeschoben. Der Begriff «Keimung» wird üblicherweise für dieses Durchbrechen der Testa durch die Keimwurzel gebraucht. Das nächste Stadium beginnt mit dem Austreiben der Sproßknospe (*Stufe II*). Da die Chlorophyllbildung gleichzeitig mit dem Austreiben des Sprosses einsetzt, entspricht die erste Keimstufe gerade der *heterotrophen* Phase, während mit dem Erreichen der zweiten Keimstufe die *autotrophe* Phase beginnt.

Manchmal bleibt der junge Keimling auf der ersten Stufe seiner Entwicklung stehen, bräunt sich nach einiger Zeit und stirbt ab; dabei können weder geotropische Krümmungen noch Chlorophyllbildung beobachtet

werden¹. Ein Sichtbarwerden der Keimwurzel kann daher nicht immer als Keimung gezählt werden, während das Austreiben der Sproßknospe in jedem Falle zur Entwicklung eines lebensfähigen Keimlings führt.

Die Summe aller Keimlinge, die je die erste Stufe erreicht haben, und die Summe derer, die auch einen Sproß entwickelten, werden bei der Bestimmung der *Keimzahl* (in %) getrennt berechnet.

Schließlich kann der Keimungsvorgang durch eine mittlere *Keimgeschwindigkeit* charakterisiert werden. Als Maß für die Keimgeschwindigkeit dient die Zeitspanne (in Tagen) vom Erreichen der Keimstufe I bis zum Erreichen der Keimstufe II.

Tabelle 1

Keimung intakter Samen.

Nährboden: nach Randolph und Cox, ohne Saccharose

Licht: 12 h/Tag

Versuchsdauer: 5 Wochen

Temperatur: 22°/30° C: 4 Tage 22° C und 1 Tag 30° C

30°/22° C: 4 Tage 30° C und 1 Tag 22° C

Gruppe	Temperatur	Anzahl Samen	Keimzahl		Keimgeschwindigkeit in Tagen
			Keimstufe I	Keimstufe II	
A	konstant 22° C	295	12 %	5 %	12,3 ± 1,5
B	wechselnd 22° / 30° C	200	58 %	33 %	10,6 ± 4,6
A:B	statistische Prüfung	—	signifikant ($x = 10,359$)	signifikant ($x = 7,888$)	signifikant ($t = 5,898$)
C	konstant 30° C	100	23 %	7 %	11,4 ± 2,7
D	wechselnd 30° / 22° C	150	63 %	33 %	7,0 ± 1,2
C:D	statistische Prüfung	—	signifikant ($x = 6,246$)	signifikant ($x = 3,166$)	signifikant ($t = 17,481$)

Statistische Prüfung (Grenzwerte) $\left\{ \begin{array}{l} \text{Keimzahl: } x_0 = 2,576 \\ \text{Keimgeschwindigkeit: } t_0 = 2,660 \end{array} \right.$

Keimversuche mit intakten Samen ergeben folgendes Resultat (Tabelle 1). Die Keimung ist stark temperaturabhängig. Sie wird durch Erhöhen der konstanten Versuchstemperatur allerdings weit weniger gefördert als durch deren rhythmische *Änderung*. Parallel zu einer vermehrten Keimung (Stufe II) geht auch eine Beschleunigung der Keimgeschwindigkeit.

¹ Vermutlich handelt es sich dabei um Quellungserscheinungen vom Typus der «falschen Keimungen», wie sie Magnus (1920/21) oder Neumcke (1931) beschrieben haben.

Diese Keimungsförderung wird nicht durch eine temperaturbedingte Quellungssteigerung verursacht. Obschon die Erhöhung der Keimzahl parallel zu einer Quellungssteigerung geht (s. S. 162 ff.), kann diese verstärkte Quellung doch nicht für die Auslösung der Keimung verantwortlich sein, da eine gleich effektvolle Erniedrigung 30°/22° C den Quellungsgrad überhaupt nicht verändert. Die vermehrte Keimung muß daher auf Grund von Stoffwechselprozessen auftreten, die auf eine *Temperaturänderung* stark ansprechen, d. h. auf eine Anregung des fermentativen Geschehens.

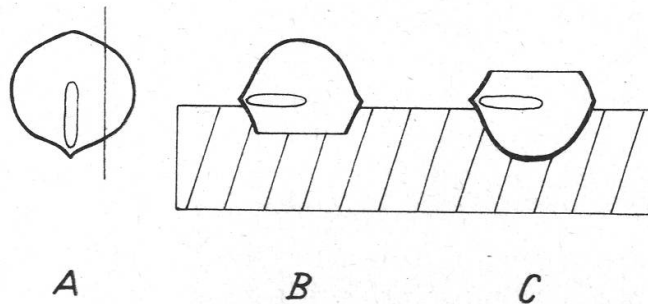
Gleichartige Beobachtungen machten Toole und Mitarb. (1955 a und b) an *Lepidium virginicum*. Die Keimung dieser lichtbedürftigen Samen wird durch eine wechselnde Versuchstemperatur (15°/25° C) von etwa 30 % auf 90 % erhöht. Dies schreiben die Autoren der raschen Verschiebung der Gleichgewichte von Stoffwechselprozessen zu, insbesondere der veränderten Menge an Pigmentkomplex, der die Lichtwirkung überträgt. Auch Davis (1929/30) findet bei *Ambrosia trifida* eine keimungsfördernde Wirkung der wechselnden Versuchstemperatur 20°/30° C, die aber nicht mit dem Nachreifevorgang zusammenhängen soll. Ob es sich im Fall von *Iris Pseudacorus* um die Aktivierung von Fermenten oder um die fermentative Inaktivierung eines Hemmstoffes handelt, bleibt vorläufig dahingestellt.

Nach diesen Beobachtungen kann gesagt werden, daß *Iris Pseudacorus* zur Keimung Temperaturschwankungen benötigt. Die Samen können daher unter ganz bestimmten Bedingungen rasch zur Keimung gebracht werden und benötigen einzig genügend Wasser und einen rhythmischen Temperaturwechsel. In der freien Natur wächst *Iris Pseudacorus* an sumpfigen Stellen und am Rande stehender Gewässer bis etwa 30 cm Wassertiefe. Die reifen Samen schwimmen auf dem Wasserspiegel und werden am Ufer angeschwemmt. Hier wird die Oberfläche des Wassers schon im Frühjahr an sonnigen Tagen stark erwärmt, während der Nacht aber wieder abgekühlt. Diese natürlichen Verhältnisse erlauben offensichtlich eine zahlreiche Keimung. Die Samen sind also gar nicht in einem absoluten Ruhezustand, sondern besitzen eine nur durch äußere Bedingungen begrenzte Keimbereitschaft, der zwar die Verhältnisse in der Natur, nicht aber die üblichen Kulturmethode gerecht werden.

B. Die Keimung angeschnittener Samen

Eine häufig angewendete Methode zur Unterbrechung von Ruheperioden ist das Anschneiden der Samen. Die günstige Wirkung wird meist dem Verletzen impermeabler Samenschalen zugeschrieben. Randolph und Cox (1943) konnten durch Wegschneiden der Samenschale und des Endosperms in der Gegend des Hilums die Keimzahl bei *Iris Pseudacorus* erhöhen; eigene Versuche bestätigen dieses Resultat. Wird allerdings nur die Samenschale abgelöst, so erfolgt die Keimung genau gleich schlecht wie bei intakten Samen. Die oben gegebene Erklärung der Keimungs-

hemmung durch impermeable Samenschalen gilt demnach hier nicht. Wird jedoch ein Teil des Endosperms ebenfalls entfernt, so erhöhen sich die Keimzahlen beträchtlich. Das Endosperm muß dafür nicht in der Gegend des Hilums entfernt, sondern kann auch seitlich weggeschnitten



Figur 3

Anschneiden der Samen

A: Der Same wird längs, parallel zum Embryo angeschnitten und ein Teil des Endosperms entfernt.

B: Die Schnittfläche wird nach unten gerichtet und in den Agar eingetaucht.

C: Die Schnittfläche wird nach oben gerichtet.

werden (Figur 3, A und B), um den gleichen Effekt zu erzeugen. Es handelt sich daher auch nicht um eine Beseitigung von rein mechanischer Hemmung.

Tabelle 2

Keimung angeschnittener Samen

Nährboden: nach Randolph und Cox, ohne Saccharose

Licht: 12 h/Tag

Versuchsdauer: 5 Wochen

Temperatur: 22°/30° C: 4 Tage 22° und 1 Tag 30° C

30°/22° C: 4 Tage 30° und 1 Tag 22° C

Gruppe	Temperatur	Anzahl Samen	Keimzahl		Keimgeschwindigkeit in Tagen
			Keimstufe I	Keimstufe II	
A	konstant 22° C	435	54 %	32 %	12,7 ± 2,2
B	wechselnd 22° / 30° C	195	85 %	57 %	10,2 ± 3,0
A:B	statistische Prüfung	—	signifikant (x = 9,952)	signifikant (x = 6,128)	signifikant (t = 11,725)
C	konstant 30° C	45	62 %	47 %	10,6 ± 4,2
D	wechselnd 30° / 22° C	140	86 %	56 %	8,8 ± 1,6
C:D	statistische Prüfung	—	signifikant (x = 3,401)	nicht signifikant (x = 1,041)	signifikant (t = 4,220)

Statistische Prüfung (Grenzwerte) $\left\{ \begin{array}{l} \text{Keimzahl: } x_0 = 2,576 \\ \text{Keimgeschwindigkeit: } t_0 = 2,660 \end{array} \right.$

Durch diesen Eingriff werden die äußeren Bedingungen für Embryo und Endosperm verändert; die Wasseraufnahme wird verbessert, und der Embryo gelangt leichter in den Genuß der Nährsalze. Schwer zu erfassen sind die Veränderungen innerhalb des Endosperms als Folge der Verletzung zahlreicher Zellen. Eine Beeinflussung enzymatischer Prozesse durch die Verletzung ist denkbar, sei es durch Auslösung von Hydrolysevorgängen oder von einer fermentativen Inaktivierung von Hemmstoffen.

Tabelle 3

Vergleich der Keimzahl intakter und angeschnittener Samen

Nährboden: nach Randolph und Cox, ohne Saccharose

Licht: 12 h/Tag

Versuchsdauer: 5 Wochen

Temperatur	Anzahl Samen		Keimzahl					
			Keimstufe I			Keimstufe II		
	intakt	angeschnitten	intakt	angeschnitten	Testgröße x	intakt	angeschnitten	Testgröße x
konstant 22° C	295	435	12 %	54 %	8,262 (signifikant)	5 %	32 %	8,539 (signifikant)
wechselnd 22° / 30° C	200	195	58 %	85 %	8,621 (signifikant)	33 %	57 %	4,855 (signifikant)
konstant 30° C	100	45	23 %	62 %	4,609 (signifikant)	7 %	47 %	6,619 (signifikant)
wechselnd 30° / 22° C	150	140	63 %	86 %	4,363 (signifikant)	33 %	56 %	3,943 (signifikant)

Statistische Prüfung: Grenzwert der Keimzahl: $x_0 = 2,576$

Solche Prozesse werden von der keimungsfördernden Wirkung der rhythmischen Temperaturänderungen überlagert, die auch bei angeschnittenen Samen erhalten bleibt (Tabellen 2 und 3).

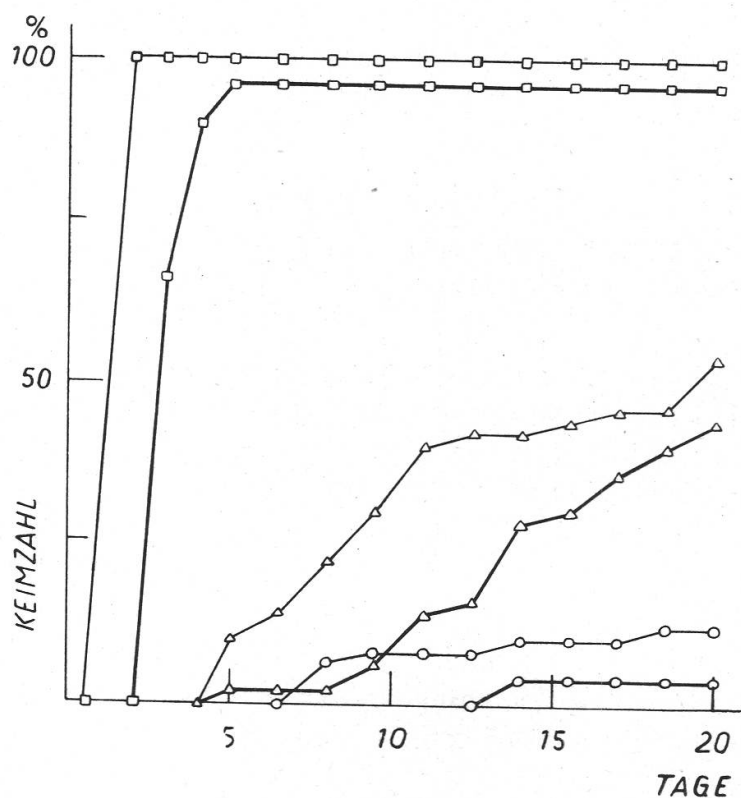
Im Falle von *Iris Pseudacorus* wie auch bei anderen schlecht keimenden Samen wird der günstige Effekt des Anschneidens mit dem Hinausdiffundieren eines Keimungshemmstoffes begründet. Die Wahrscheinlichkeit einer solchen Begründung läßt sich ungefähr abschätzen, wenn man die Keimzahlen angeschnittener Samen, die mit der Schnittfläche aus dem Agar hervorragten (Figur 3, C), mit solchen von Samen vergleicht, deren Schnittfläche im Agar eingetaucht blieb (Figur 3, B). Tabelle 4 zeigt, daß die Lage der Schnittfläche nur einen geringen Einfluß auf die Erhöhung der Keimzahl durch das Anschneiden besitzt. Die fördernde Wirkung dieses Eingriffes beruht offensichtlich nicht einfach auf einer Diffusion von Hemmstoffen in den Agar.

Tabelle 4

Keimung angeschnittener Samen bei verschiedener Lage der Schnittfläche nach Figur 3
 Nährboden nach Randolph und Cox
 Licht: 12 h/Tag, Versuchsdauer: 22 Tage

Gruppe	Lage der Schnittfläche	Temperatur	Anzahl Samen	Keimzahl		Keimgeschwindigkeit in Tagen
				Keimstufe I	Keimstufe II	
A	oben	konstant 22° C	50	15	12	$5,1 \pm 1,9$
B	unten	konstant 22° C	50	30	16	$7,9 \pm 3,1$
A:B	—	statistische Prüfung	—	signifikant ($x = 2,695$)	nicht signifikant ($x = 0,796$)	signifikant ($t = 2,83$)
C	oben	wechselnd 22° / 30° C	50	45	41	$6,6 \pm 1,3$
D	unten	wechselnd 22° / 30° C	50	49	33	$7,6 \pm 3,0$
C:D	—	statistische Prüfung	—	nicht signifikant ($x = 1,559$)	nicht signifikant ($x = 1,631$)	nicht signifikant ($t' = 1,94$)

Statistische Prüfung (Grenzwerte) $\left\{ \begin{array}{l} \text{Keimzahl: } x_0 = 2,576 \\ \text{Keimgeschwindigkeit: } t_0 = 2,763; t'_0 = 2,660 \end{array} \right.$



Figur 4
 Vergleich der Keimung in-
 takter und angeschnittener
 Samen mit der Entwicklung
 des isolierten Embryos
 Nährboden nach
 Randolph und Cox
 Licht: 12 h/Tag
 Temperatur: 22° C

Keimstufe
 isolierter Embryo
 □ — □ I
 □ — □ II
 angeschnittener Same
 △ — △ I
 △ — △ II
 intakter Same
 ○ — ○ I
 ○ — ○ II

C. Die Entwicklung isolierter Embryonen

Die Embryonen von *Iris Pseudacorus* sind *nicht in Ruhe*, sondern durchlaufen unmittelbar nach der Isolierung die beiden Keimstufen, unabhängig von der seit der Ernte bis zum Experiment verstrichenen Zeit (Beobachtungen während eines Jahres). Sie benötigen keinerlei Nachreife und keinen Wechsel der Versuchstemperatur. 2% aller Embryonen blieben auf der ersten Stufe stehen; sie entwickelten eine lange Wurzel, ergrünt, aber veränderten sich während der Dauer der Versuchsperiode (3 Wochen) nicht weiter. 4% aller Embryonen bräunten sich und starben ab; möglicherweise waren sie bei der Isolierung verletzt worden.

Figur 4 gibt eine Zusammenfassung der gewonnenen Kenntnisse über den Umfang der Keimung von ganzen und angeschnittenen Samen sowie der Entwicklung isolierter Embryonen bei der konstanten Versuchstemperatur 22° C.

Wachstum des Keimlings

Nun soll geprüft werden, ob das Streckungswachstum des jungen Keimlings durch Temperaturänderungen und Entfernen des Endosperms in ähnlicher Weise beeinflußt wird wie die Keimung. Die folgenden Ver-

Figur 5

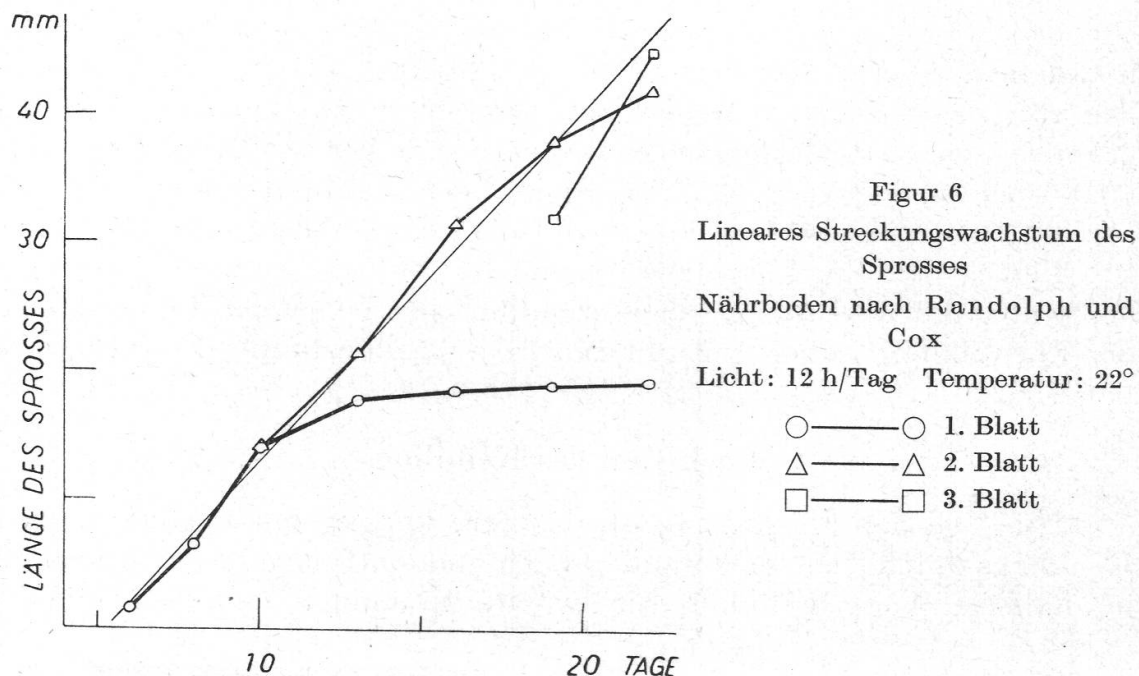
Junge Keimlinge von *Iris Pseudacorus* L.
Die Länge des Sprosses wird zwischen den
Spitzen der beiden Marken gemessen



suche sollen daher zeigen, ob die Hemmung auch noch das Wachstum des jungen Sprosses beeinträchtigt oder ob sie sich nur auf die erste Keimstufe beschränkt. Als Maß für das Streckungswachstum dient die Verlängerung des Sprosses.

Der Sproß wird von der Ansatzstelle des Keimblattes (Figur 5) bis zur Spitze des momentan längsten Blattes gemessen. Während der Versuchsperiode von 22 Tagen ist dieses Wachstum linear (Figur 6). Bei jungen Keimlingen kann die Messung auf 1 mm genau durchgeführt werden; bei einer Länge von über 50 mm wird die Meßgenauigkeit verschlechtert. Die Versuche werden daher nach Möglichkeit früher abgebrochen.

Vergleichende Trockengewichtsbestimmungen werden nur mit dem Sproßteil durchgeführt. Der Sproß wird oberhalb der Ansatzstelle des Keimblattes abgeschnitten und bei 105° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Differenzen im Streckungswachstum werden mit dem *t*-Test auf ihre Signifikanz geprüft.



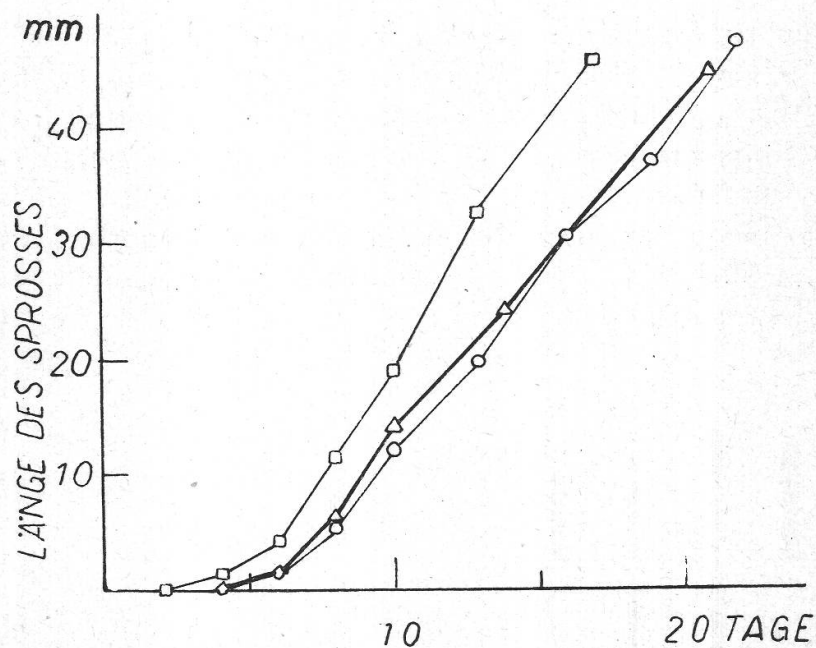
Das Wachstum von Keimlingen, die mit intaktem oder teilweise entferntem Endosperm aufgezogen werden, kann nicht direkt mit demjenigen isolierter Embryonen verglichen werden, da während der Meßperiode immer wieder zusätzliche Keimungen auftreten (s. a. Figur 4). Die Temperaturabhängigkeit kann daher nur innerhalb der homogenen Gruppen der isolierten Embryonen bzw. intakten oder angeschnittenen Samen festgestellt werden, wobei es sich zeigt, daß rhythmische Temperaturänderungen das Streckungswachstum des Sprosses nicht beschleunigen (Figur 7). Den Einfluß des Entferns von Endosperm zeigt Tabelle 5. Als Maß für die Geschwindigkeit des linearen Streckungswachstums wird die Steigung *m* der Regressionsgeraden *y* auf *x* gewählt:

$$m = \frac{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{(x_i - \bar{x})^2}$$

x = Tage seit dem Erreichen der Keimstufe II (Austreiben der Sproßknospe)

y = durchschnittliche Länge der Sprosse

Mit steigendem Endospermanteil wird das Wachstum nicht verringert, sondern sogar etwas erhöht (Figur 8). Das Endosperm übt in dieser Phase der Entwicklung keinen hemmenden Einfluß mehr aus, und der Embryo kann die Reservestoffe des Nährgewebes voll ausnützen, was



Figur 7

Wachstum isolierter Embryonen bei konstanter und wechselnder Temperatur

Nährboden nach Randolph und Cox

Licht: 12 h/Tag

Temperatur		Statistische Prüfung:
□ — □	30° C	signifikant
△ — △	22°/30° C	
○ — ○	22° C	nicht signifikant

Tabelle 5

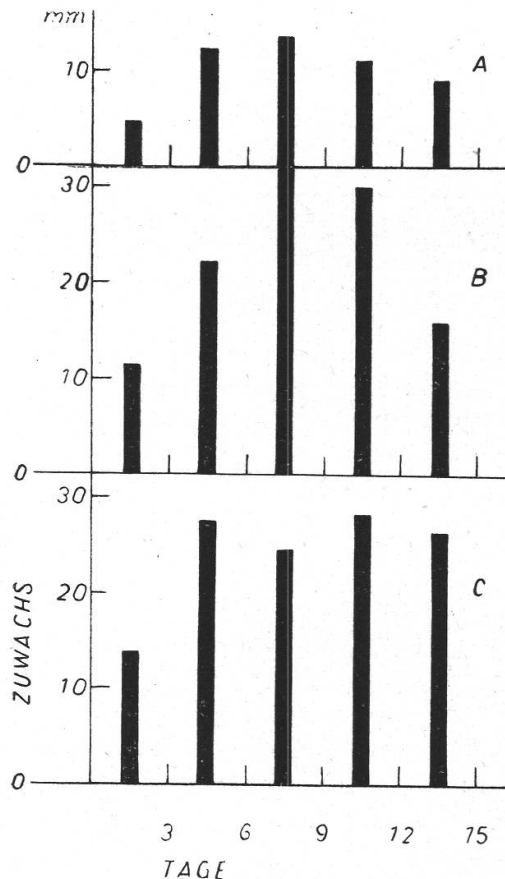
Einfluß des Entfernens von Endosperm auf die Wachstumsgeschwindigkeit des Sprosses

Nährboden nach Randolph und Cox, ohne Saccharose

Agar 0,5 %, Licht: 12 h/Tag

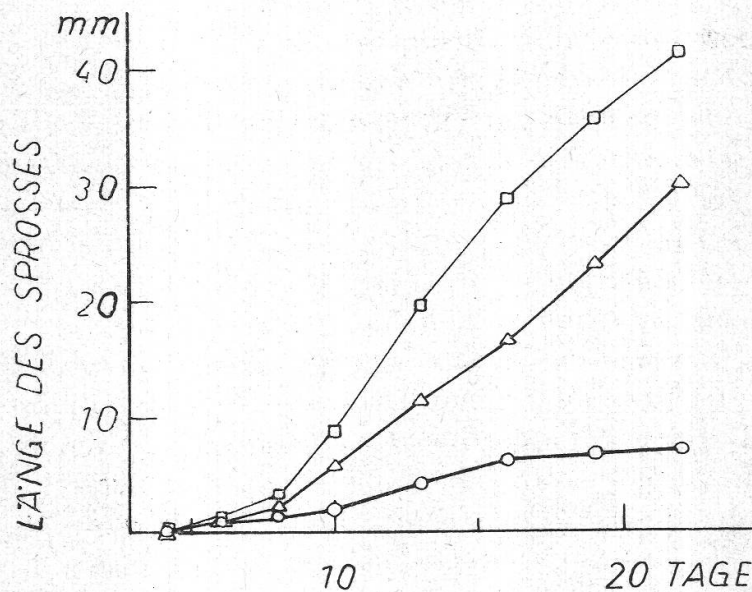
Endosperm	Anzahl Samen	Temperatur	Wachstumsgeschwindigkeit <i>m</i>
intakt	14	22° C	4,19
	30	22°/30° C	3,05
	48	30°/22° C	3,09
	7	30° C	2,79
angeschnitten	75	22° C	2,00
	92	22°/30° C	2,70
	78	30°/22° C	2,57
	21	30° C	2,65
fehlend	241	22° C	2,84
	99	22°/30° C	2,29
	49	30° C	3,96

auch zu einer Erhöhung des Trockengewichtes führt (15 % bis 17 % statt 8 % bis 10 %). Diese Trockengewichtserhöhung ist also nicht etwa auf eine mangelnde Wasserversorgung und dadurch bedingte Reduktion des Streckungswachstums zurückzuführen, wie man es bei der Aufzucht isolierter Embryonen auf Nährboden mit verschiedenem Agargehalt (Figur 9) beobachten kann, denn der junge Keimling bezieht das nötige Wasser nicht aus dem Endosperm, sondern mit Hilfe seiner frisch gebildeten Wurzeln direkt aus dem Nährboden.



Figur 8
Wachstumsgeschwindigkeit der Sprosse
von Keimlingen mit und ohne Endosperm.
Nährboden nach Randolph und Cox
Licht: 12 h/Tag Temperatur: 22°/30°
Zuwachs: mittlerer Zuwachs des Sprosses
während je 3 Tagen
A: Endosperm entfernt
B: Endosperm angeschnitten
C: Endosperm intakt

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß das Endosperm der Samen von *Iris Pseudacoris* zwar *Keimzahl* und *Keimgeschwindigkeit* stark herabsetzt, das *Streckungswachstum* dagegen *nicht beeinträchtigt*. Der hemmende Faktor wird offensichtlich gerade vor und kurz nach einsetzender Keimung beseitigt. Daß sich die Hemmung noch über die erste Keimstufe hinzieht und nicht schon beim Erscheinen der Keimwurzel beseitigt wird, ist ein Zeichen dafür, daß die Keimung nicht durch eine schlecht permeable Samenschale reduziert wird, die nach dem Austritt der Keimwurzel ja keine Bedeutung mehr besitzen würde. Diese Beobachtung wird zur Beantwortung der Fragen im nächsten Kapitel von Bedeutung sein.



Figur 9

Wachstum isolierter Embryonen auf Nährboden mit verschiedenem Agargehalt

Nährboden nach Randolph und Cox

Licht: 12 h/Tag Temperatur: 22° C

	Konzentration des Agars:	Statistische Prüfung:
□ — □	0,5 %	nicht signifikant
△ — △	1 %	signifikant
○ — ○	2 %	

Wasserhaushalt und Gasaustausch

Schlechte Keimung von Samen wird häufig auf eine mangelhafte Wasseraufnahme und erschwerten Gasaustausch zurückgeführt. Schuld daran trägt die schlecht durchlässige Samenschale, deren Permeabilität durch Behandlung mit konzentrierter Schwefelsäure, Aceton oder heißem Wasser künstlich erhöht werden kann; auf diese Weise vorpräparierte Samen keimen nach dem Quellen rasch aus (s. a. Fischer, 1907). Diese ausgeprägte «Hartschaligkeit» findet sich besonders häufig bei Leguminosen (Crocker und Barton, 1953, s. a. Khudairi, 1956).

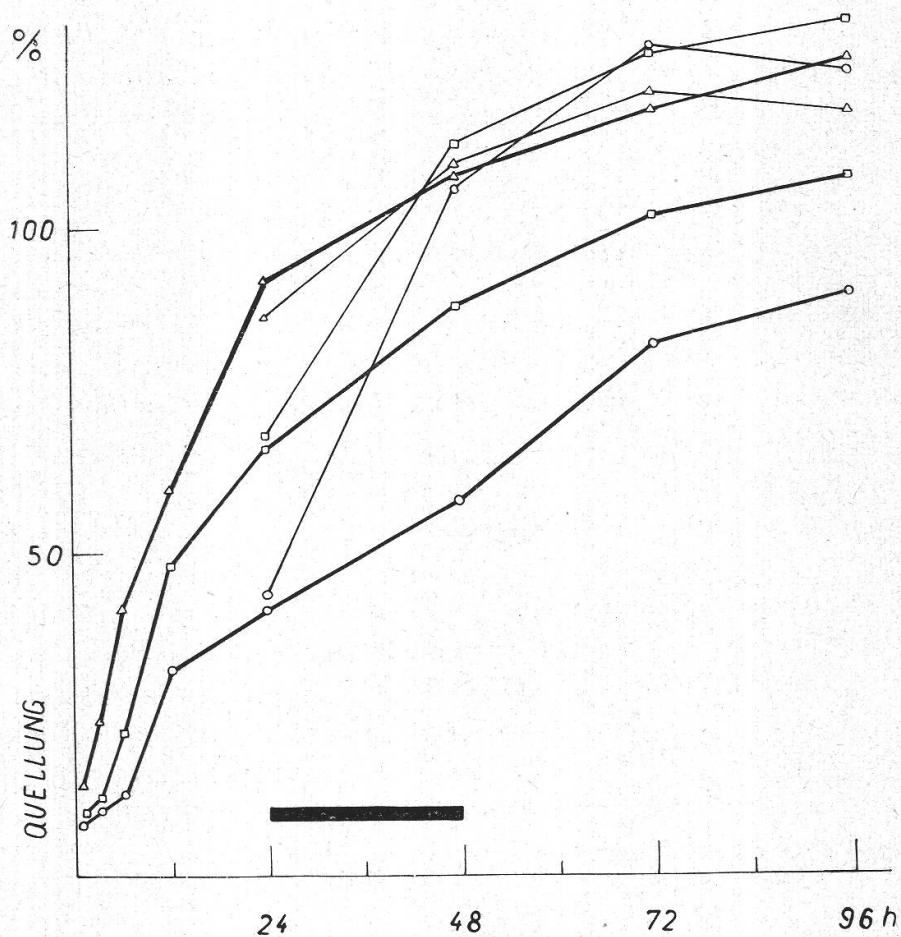
Der mangelhafte Gasaustausch kann direkt als Ursache für die Entstehung einer Ruheperiode in Samen angesehen werden. Thornton (1945) nimmt an, die Ruhe, welche die Keimung verunmöglicht, beruhe auf der Anhäufung von Hemmstoffen infolge partiell anaerober Atmung. Wareing und Foda (1957) stellen fest, daß eine erhöhte O₂-Konzentration den Abbau der Keimungshemmstoffe in den oberen Früchten von *Xanthium* beschleunigt. Bei *Ambrosia trifida* ist nach Davis (1929/30) die Membran der Frucht für O₂ fast undurchlässig. Echte Ruhe kann durch stark reduzierten Sauerstoffgehalt der Atmosphäre künstlich erzeugt wer-

den, nicht aber unter völlig anaeroben Bedingungen. Der Ruhezustand ist daher das Resultat von bestimmten Stoffwechselvorgängen, die nicht ganz unterbunden werden dürfen. Sowohl Entstehung wie auch Abbruch der Ruheperiode wäre also direkt durch die Menge O_2 bedingt, die dem Embryo und dem Endosperm zur Verfügung steht. Aus diesem Grunde versuchten Randolph und Cox (1943) durch Erhöhung der O_2 -Konzentration der Atmosphäre auf 50 % intakte, ruhende *Iris*-Samen zur Keimung anzuregen, was aber zu keinem Erfolg führte.

Bei *Iris Pseudacorus* beeinträchtigt nach unserer Erfahrung die Samenschale die Keimung nicht. Das harte Hemizellulosenendosperm wird dank zahlreicher Tüpfel den Gasaustausch ebenfalls nicht verringern, dagegen quillt das an den Zellwänden abgelagerte Reservekohlehydrat nur sehr langsam und beeinträchtigt die Wasseraufnahme durch den Embryo. Werckmeister (1937) sieht gerade in der Reduktion der Wasseraufnahme eine wichtige Funktion des Endosperms von *Iris*, da durch das Endosperm ein allzu rasches Quellen des Embryos verhindert wird. (Der Autor stellte an isolierten, rasch quellenden Embryonen Schädigungen fest, die von übereilter Wasseraufnahme herrührten. Bei der Isolierung von Embryonen für eigene Versuche zeigte sich, daß die jungen Organismen nach dreitägigem Quellen ihre Wasseraufnahme noch nicht beendet haben, sondern auf feuchtem Filterpapier deutlich weiter anschwellen, wobei sie aber nicht geschädigt werden.) Die Embryonen können also im Samen eingeschlossen das Wasser nur sehr langsam aufnehmen. Sie sind dazu sehr empfindlich auf Schwankungen des Wassergehaltes; junge Keimlinge setzen bei einer Erhöhung des Agargehaltes im Nährboden ihr Streckungswachstum stark herab (Figur 9). Möglicherweise hängt die Keimverzögerung daher nur von der sehr langsamen Quellung des Nährgewebes ab. Um diese Frage zu prüfen, werden Samen bei konstanter Temperatur (22° C und 30° C), die nur selten zur Keimung führt, und bei wechselnder, keimungsfördernder Temperatur (22° C/30° C und 30° C/22° C) gequollen. Die wechselnde Temperatur muß den Verlauf der Quellungskurve deutlich ändern, wenn die obige Hypothese bestätigt werden soll.

Portionen von 20 Samen werden trocken gewogen und in Petrischalen nach Zugabe von 20 cc Leitungswasser bei der entsprechenden Temperatur gequollen. Nach Ablauf der bestimmten Versuchszeit werden die Samen mit Filterpapier äußerlich getrocknet und wieder gewogen. Der Quellungsgrad wird als Menge aufgenommenen Wassers in % des Trockengewichtes angegeben. Jeder Punkt der Meßreihe stellt das Mittel von vier Proben dar.

Wenn auch die Quellung etwas langsamer verläuft (Figur 10) als bei anderen Samen mit Nährgeweben ähnlicher Struktur, z. B. *Lupinus* (Pringsheim, 1930), so ist doch die Abhängigkeit von verschiedener (konstanter) Versuchstemperatur normal. Ein Temperaturwechsel von 10° C oder 22° C auf 30° C während 24 Stunden beeinflußt die Quellung



Figur 10

Quellung der Samen bei konstanter und wechselnder Temperatur

Quellung: Aufnahme von H_2O in % des Trockengewichtes

Temperatur

△—△	30° C	konstant
△—△		24 h 22° C
□—□	22° C	konstant
□—□		24 h 30° C
○—○	10° C	konstant
○—○		24 h 30° C
■	Temperaturstoß	

markant. Der Quellungsgrad der Samen bei 30° C (konstant) wird von dem der Samen bei wechselnder Versuchstemperatur sogar kurzfristig überschritten, doch gleichen sich die Kurven zum Schluß an. Wenn also die Wasseraufnahme allein maßgebend für die Keimung wäre, so müßten bei 30° C (konstant) ebenso viele Keimungen auftreten wie bei den wechselnden Versuchstemperaturen. Da dies aber nicht der Fall ist, kann die mangelhafte Keimung nicht auf eine ungenügende Wasseraufnahme zurückgeführt werden. Diese Beobachtung wird durch einen Versuch von Randolph und Cox (1943) ergänzt. Je zwei Gruppen von *Iris*-Samen,

die während 2 bis 12 Wochen feucht oder trocken bei 20° bis 25° C aufbewahrt wurden, unterschieden sich in ihren Keimzahlen nur um 2%. Die Keimverzögerung bei *Iris Pseudacorus* ist also keine Frage der Permeabilität der den Embryo umhüllenden Gewebe.

Kohlehydratstoffwechsel

Als weitere Möglichkeit läßt sich denken, daß eine spezifische Mangelercheinung im Stoffwechsel des Samens die Keimung verlangsamen oder unterbinden kann. Es würde sich dabei um ergänzbare Stoffe handeln, deren Produktion nicht durch einen Hemmstoff unterbunden wird.

Die Aufzucht isolierter Embryonen von *Iris* gelingt unter einfachen Bedingungen. Außer den Nährsalzen muß nur Saccharose als Kohlehydratquelle zugegeben werden, die auch durch Glukose ersetzt werden kann. Eine Keimungshemmung dieser Art kann daher nur durch eine mangelhafte Hydrolyse des Reservekohlehydrates verursacht werden, unter der Voraussetzung, daß die am Aufbau beteiligten Monosaccharide durch den Embryo verwertet werden oder zu verwertbaren Zuckern umgebaut werden können. Durch Zuckerbestimmungen im ungekeimten und gekeimten Samen wurde versucht, über den Umfang der Hydrolyse bei der Keimung Auskunft zu erhalten.

A. Methoden der Zuckerbestimmung

Extraktion der Samen: Die Samenschale wird entfernt, das Endosperm samt Embryo zur Zerstörung der Fermenttätigkeit 5 Minuten in Äthanol gekocht, getrocknet und gemahlen. Das Äthanol wird dem anschließend verwendeten Extraktionsmittel zugegeben. Das zerkleinerte Material wird im Soxhlet 3 Tage mit 80 % Äthanol extrahiert (Woodward, Rabideau, 1953), der Extrakt filtriert und zur Entfernung der bei der Chromatographie störenden Lipide mit Chloroform ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase wird im Vakuum zur Trockne eingedampft und in Methanol aufgenommen. Durch eine nochmalige Extraktion des bereits extrahierten Materials werden keine weiteren Monosaccharide herausgelöst. Dies ist ein Zeichen dafür, daß während der Extraktion keine Degradation des Reservepolysaccharides stattfindet.

Die papierchromatographische Bestimmung der vorhandenen Monosaccharide erfolgt parallel mit vier verschiedenen Methoden.

1. *p*-Nitrophenylhydrazin (Stoll und Rüegger, 1952).

Die Mono- und Disaccharide werden in ihre *p*-Nitrophenylhydrazone übergeführt und die gefärbten Produkte auf das Papier aufgetragen (Whatman Nr. 1). Als Laufmittel wird *n*-Butanol (wassergesättigt) verwendet. Die Chromatographie erfolgt aufsteigend auf dem zylindrisch

gebogenen Papier. Diese Methode diene auch der quantitativen Auswertung. Die ausgeschnittenen Flecke werden mit 5 cc Phosphatpuffer (Soerensen pH 7,0) eluiert und die Extinktion der Lösung im Beckman-Spektrophotometer DU bei 395 m μ bestimmt.

2. *Benzidin-Trichloressigsäure* (Horrocks, 1949).

Reagens auf Aldosen und Ketosen.

3. *Anilin-Phthalsäure* (Partridge, 1949).

Reagens auf Aldosen.

4. *Naphthoresorcin-Trichloressigsäure* (Partridge, 1948).

Reagens auf Ketosen.

Der Extrakt wird direkt als Methanollösung aufgetragen. Als Papier wird ebenfalls Whatman Nr. 1 verwendet. Die Chromatographie erfolgt aufsteigend mit wassergesättigtem Phenol als Laufmittel. Der Gasphase (phenolgesättigtes Wasser) werden 1 % NH₄OH und KCN zugesetzt (Partridge, 1948). Nach Beendigung der Laufzeit (ca. 48 Stunden) wird das Papier mit Äther ausgewaschen, um das Nachdunkeln des Papiergrundes zu verringern (Ehrenthal und Mitarb., 1950). Das trockene Papier wird mit einem der angegebenen Reagenzien besprüht und bei 100 bis 105° C 10 Minuten getrocknet, bis die nachzuweisenden Zucker als gefärbte Flecke sichtbar werden.

B. Resultate

Im Endosperm der ungekeimten Samen konnten zwei Hexosen, *Glukose* und *Fruktose*, ihr Disaccharid *Saccharose* sowie eventuell Spuren

Tabelle 6

Vergleich der R_F-Werte der im Endosperm gefundenen Zucker mit denen der Kontrollzucker

Glukose: Nachweis mit Benzidin-Trichloressigsäure

Fruktose: }
Saccharose: } Nachweis mit Naphthoresorcin-Trichloressigsäure

Versuch Nr.	Glukose		Fruktose		Saccharose	
	Extrakt	Kontrolle	Extrakt	Kontrolle	Extrakt	Kontrolle
1	0,31	0,33	0,41	0,43	0,31	0,33
2	0,32	0,32	0,40	0,41	0,34	0,35
3	0,34	0,35	0,41	0,40	0,32	0,32
4	0,32	0,33	0,43	0,44	0,30	0,30
5	0,30	0,30	0,41	0,41	—	—
6	0,37	0,37	0,39	0,40	—	—

einer Trisaccharidverbindung gefunden werden (Tabelle 6). In Samen, die während 40 Tagen auf einem kohlehydratfreien Nährboden aufgezogen worden waren, konnte nur noch Glukose gefunden werden, deren Menge im ungekeimten wie auch im gekeimten Samen um ein Mehrfaches gestiegen war (Tabelle 7). Wird das Endosperm mit 5% HCl während 6 Stunden hydrolysiert, so lassen sich nur noch die zwei freien Hexosen nachweisen. Das Mengenverhältnis Glukose–Fruktose verschiebt sich zugunsten der Ketose. Das Reservepolysaccharid scheint also zur Hälfte mindestens aus Fruktose zu bestehen. Der isolierte Embryo vermag zwar Fruktose allein als Kohlehydratquelle nur schlecht zu verwerten, kann dafür aber die Saccharose gut gebrauchen. Daher ist nicht anzunehmen, daß die Speicherung eines für die Ernährung des Embryos ungünstigen Monosaccharids einen Einfluß auf die Keimung hat, vor allem, weil im nicht hydrolysierten Endosperm die Fruktose stets nur in geringer Menge neben Glukose und Saccharose vorkommt.

Tabelle 7

Quantitative Bestimmung der Hexosen im ungekeimten und gekeimten Samen von *Iris Pseudacorus* L.

Bestimmung der Zucker als *p*-Nitrophenylhydrazone

Behandlung der Samen	Glukose mg/g Endosperm	Fruktose mg/g Endosperm
ungequollen	1,3	0,5
gequollen und 40 Tage gezüchtet:		
a) ungekeimt	6,6	0,5
b) gekeimt (Keimstufe I)	9,6	0
c) gekeimt (Keimstufe II)	7,7	0
ungequollen, hydrolysiert mit 5 % HCl	25,8	26,0 ¹

¹ Der wirkliche Wert liegt noch etwas höher, ist jedoch nicht genauer zu ermitteln, da immer Verluste durch Osazonbildung während des Chromatographierens auftreten.

Das Reservepolysaccharid von *Iris Pseudacorus* ist nach den vorliegenden Untersuchungen aus Glukose und Fruktose aufgebaut. Dies stimmt nicht mit dem Befund von Colin und Augem (1928) überein, wonach die Polysaccharide der Samen von *I. Pseudacorus*, *I. germanica* und *I. foetidissima* aus Mannose und Arabinose aufgebaut sind. Auch Mitchell (1930) findet im Endosperm von *I. pallida* ein Mannan.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß der Keimverzug nicht durch eine ungenügende Verwertbarkeit und schlechte Hydrolyse des Reservekohlehydrates verursacht wird, da die Menge freier Glukose auch im ungekeimten Samen nach der Quellung ansteigt.

Experimentelle Veränderung der Entwicklung isolierter Embryonen

Durch Zugabe von Endospermextrakten zum Nährboden und Beobachtung der Reaktionen des Embryos soll geprüft werden, ob die Keimungshemmung durch einen extrahierbaren Hemmstoff hervorgerufen wird (s. S. 146 ff.). Ein solcher Keimungshemmstoff sollte die Embryonen ruhend erhalten, ohne sie zu schädigen, das Streckungswachstum des jungen Sprosses dagegen nicht verringern. Man darf zwar nicht erwarten, daß diese Forderungen ohne weiteres erfüllt werden, da Endospermextrakt keinen vollen Ersatz darstellt für das lebendige Endosperm, von dem aus offensichtlich die ganze Regulation der Keimung geht, während der Embryo passiv bleibt. Das Induzieren eines Ruhezustandes in Geweben, deren Ruhe experimentell unterbrochen wurde, durch Anwendung von Hemmstoff enthaltenden Extrakten mißlingt im allgemeinen, da der Hemmstoff rasch abgebaut wird (Hemberg, 1949). Bei *Iris Pseudacorus* ist der Embryo von vorneherein nicht ruhend. Daß er trotzdem nicht auszukeimen vermag, ist ein Zeichen dafür, daß er keine hemmstoffabbauenden Fermente besitzt. Die nachfolgend beschriebenen Versuche zeigen, daß auch der junge *Keimling* diese Fähigkeit zur Inaktivierung nicht besitzt. Dadurch wird das Bild, das wir von der Keimungshemmung im intakten Samen gewonnen haben, bei der Anwendung von Endospermextrakten verfälscht. Aber es läßt sich in der Folge doch zeigen, daß diese Hemmstoffe an der Keimungsregulation maßgebend beteiligt sind.

Durch die direkte Zugabe von gemahlenem Endosperm zum Nährboden konnte die Hemmstoffwirkung nicht geprüft werden, da durch das Verquellen des Nährgewebes dem Nährboden ein Teil des verfügbaren Wassers entzogen wird. Frei von dieser Nebenwirkung bleiben Versuche mit Zusatz von Endospermextrakten zum Nährboden, der das übliche Gemisch von Nährsalzen, Spurenelementen und Saccharose bereits enthält. Um eine Auftrennung der extrahierten Substanz in verschiedene Stoffgruppen zu erhalten, werden folgende Lösungsmittel verwendet:

H ₂ O dest.	0° C	3 Tage
Äther	0° C	3 Tage
Äthanol 80%	85° C	3 Tage
HNO ₃ 3%	90° bis 95° C	6 Stunden

Extraktion: Die trockenen Samen werden von ihrer Testa befreit und das Endosperm samt Embryo¹ in einer Schlagmühle zerkleinert. Das Extraktionsmittel wird in 5- bis 10-facher Menge zugesetzt und das Material nach der angegebenen Weise extrahiert. Die Weiterverarbeitung der Extrakte ist für jedes Lösungsmittel verschieden.

¹ Der hemmstofffreie Embryo kann in trockenem Zustand nicht vom Endosperm befreit werden.

H₂O: Der Extrakt wird filtriert und kalt sterilisiert (Bakterienfilter). Portionen von 5 cc werden in geeichte, sterile Röhrchen abgefüllt und in die Kulturgläser zum frisch sterilisierten, eben noch flüssigen Nährboden gegeben.

Äther: Der Extrakt wird mit einem Bakterienfilter sterilisiert und das Lösungsmittel aus dem anhängenden Gefäß im Vakuum verdampft. Darauf wird die erforderliche Wassermenge durch das Filter zugegeben. Die Mischung wird durch kräftiges Schütteln emulgiert. Zur Adsorption von eventuellen Ätherresten werden einige paraffingetränkte Papierstreifen steril zugegeben und der Extrakt unter öfterem Schütteln in der vorigen Weise abgefüllt.

Äthanol: Der Extrakt wird mit Wasser versetzt und anschließend mit Chloroform ausgeschüttelt. Die lipide Phase wird verworfen, die wäßrige Phase im Vakuum zur Trockne eingedampft, in heißem Wasser gelöst und mit dem Nährboden vermischt. Die Sterilisation wird schonend durchgeführt (Dampftopf, 96° C, 3mal 40 Min.).

HNO₃: Der filtrierte Extrakt wird in einer Säule mit ionenaustauschendem Harz (Amberlite IRA 410) neutralisiert. Das ungepuffert leicht basische Eluat wird eingedampft, mit dem Nährboden vermischt und im Dampftopf sterilisiert (wie oben).

pH: Bei allen Extrakten liegt das pH des Nährbodens dank Zugabe von 0,015 *m* Phosphatpuffer (Soerensen pH 7,0) zwischen 6 bis 7. Nach den Angaben von Randolph und Cox (1943) sind die Samen ausgesprochen unempfindlich gegenüber pH-Änderungen in einem weiten Bereich.

Konzentration: Enthalten 10 cc Nährboden die extrahierte Substanz von 1 g Endosperm (ungefähr 25 Samen mit einem Volumen von 0,85 cc), so wird die Konzentration gleich 1 gesetzt. Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf diese Festlegung.

Isolierte Embryonen wachsen auf jedem dieser Extrakt Nährböden *schlechter* als auf dem üblichen synthetischen Nährboden von Randolph und Cox (1943). Die Keimungs- und Wachstumsgeschwindigkeit (Tabelle 8) wird verringert, die Bildung der Adventiv- und Seitenwurzeln bleibt

Tabelle 8
Keimungs- und Wachstumsgeschwindigkeit isolierter Embryonen
bei Zugabe verschiedener Endospermextrakte
Nährboden nach Randolph und Cox + 0,015 *m* Phosphatpuffer
Licht: 12 h/Tag, Temperatur: 22° C

Extraktion	Konzentration	Keimungsgeschwindigkeit Stufe I-II in Tagen		Wachstumsgeschwindigkeit Steigung der Regressionsgeraden <i>m</i>		Sproßlänge ¹ 22. Tag + - Wert
		Versuch	Kontrolle	Versuch	Kontrolle	
H ₂ O	1,0	4,5	3,0	1,64	2,69	3,993
	0,5	4,0		2,05		1,738
	0,1	3,5		2,59		0,198
Äther	0,5	4,9	3,5	1,96	3,12	3,899
Äthanol	1,0	3,8	2,9	1,19	2,88	5,671
	0,5	3,8		1,46		6,674
HNO ₃	0,5	4,5	3,3	0,43	2,78	8,035
	0,1	3,7		1,61		5,046
	0,05	3,2		2,90		0,620

¹ Vergleich der mittleren Sproßlängen von Kontrolle und behandelten Embryonen.

ganz aus. Bei stärkeren Konzentrationen bräunen sich Keimwurzel und Keimblatt, während die ersten Blätter sich normal entwickeln. Die Keimzahl bleibt aber bei Konzentrationen, die schon signifikant geringeres Streckungswachstum verursachen, noch unverändert hoch (Tabelle 9). Durch das Entfernen des Endosperms werden die Bedingungen für den Embryo so verändert, daß sich die Entwicklung nachträglich durch die Endospermextrakte nur verlangsamen, aber nicht verhindern läßt.

Tabelle 9
Keimzahl isolierter Embryonen bei Zugabe verschiedener Endospermextrakte

Extraktion	Konzentration	Keimung		Sproßlänge ¹ 22. Tag + - Wert
		Stufe I	Stufe II	
H ₂ O	1	98 %	93 %	3,993
Äther	0,5	98 %	98 %	3,899
Äthanol	1	98 %	96 %	5,671
HNO ₃	0,1	100 %	96 %	5,046

Figur 11

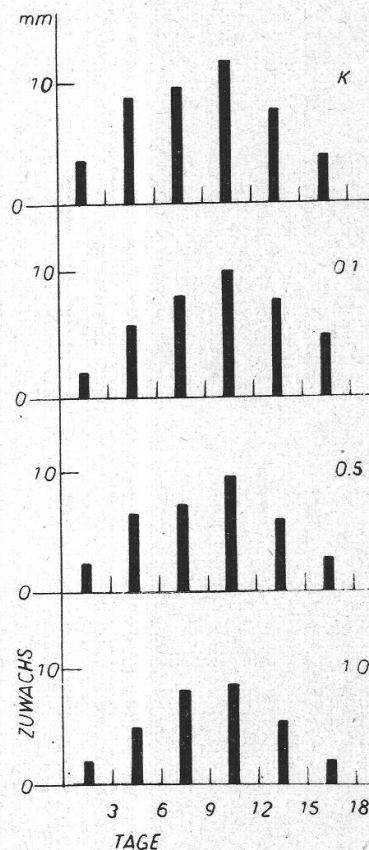
Reduktion des Sproßwachstums isolierter Embryonen durch den H₂O-Extrakt des Endosperms Nährboden nach Randolph und Cox + 0,015 m Phosphatpuffer

Licht: 12 h/Tag Temperatur: 22° C

Zuwachs: mittlerer Zuwachs des Sprosses während je 3 Tagen

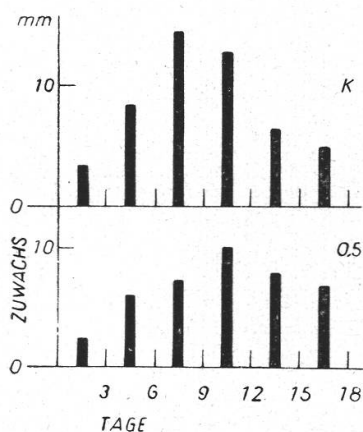
Konzentration Statistische Prüfung der Differenz zur Kontrolle (K)

0,1	nicht signifikant
0,5	nicht signifikant
1,0	signifikant



¹ Vergleich der mittleren Sproßlängen von Kontrolle und behandelten Embryonen. Alle angegebenen Konzentrationen rufen eine signifikante Reduktion des Streckungswachstums hervor ($t > 2,660$).

Die Wirkung des Endospermextraktes beruht nun nicht auf einer Erhöhung des osmotischen Wertes des Nährmediums, wie das in ähnlichen Fällen bei *unreifen* Embryonen festgestellt werden konnte (Ziebur und Mitarb., 1950). Wie Messungen der Gefrierpunktserniedrigung ergaben, besitzt der Wasserextrakt bei der gewählten Konzentration 1 einen osmotischen Wert von 0,081 *m*, der Äthanolextrakt dagegen von 0,047 *m*. Diese beiden Werte stehen in einem umgekehrten Verhältnis zur Hemmstoff-



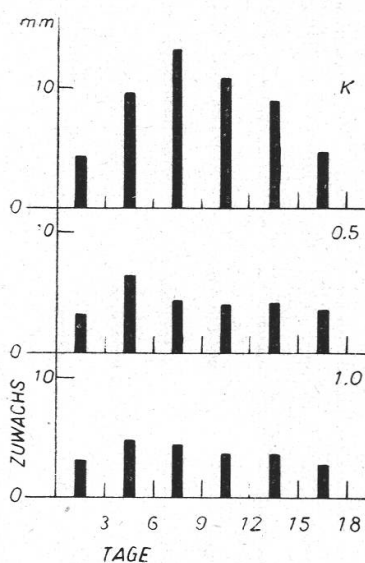
Figur 12

Reduktion des Sproßwachstums isolierter Embryonen durch den Ätherextrakt des Endosperms
Nährboden nach Randolph und Cox
+ 0,015 *m* Phosphatpuffer

Licht: 12 h/Tag Temperatur: 22° C

Zuwachs: mittlerer Zuwachs des Sprosses während je 3 Tagen

Konzentration Statistische Prüfung der Differenz zur Kontrolle (K)
0,5 signifikant



Figur 13

Reduktion des Sproßwachstums isolierter Embryonen durch den Äthanolextrakt des Endosperms

Nährboden nach Randolph und Cox
+ 0,015 *m* Phosphatpuffer

Licht: 12 h/Tag Temperatur: 22° C

Zuwachs: mittlerer Zuwachs des Sprosses während je 3 Tagen

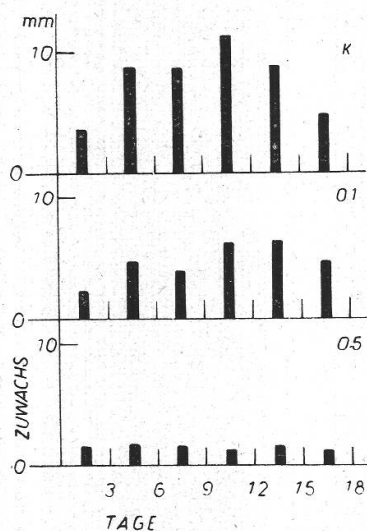
Konzentration Statistische Prüfung der Differenz zur Kontrolle (K)
0,5 signifikant
1,0 signifikant

wirkung. Eine Hemmwirkung, verursacht durch eine unspezifische Erhöhung des Gehaltes an löslichen Stoffen im Nährboden, kommt daher nicht in Frage. Die Wachstumsverschlechterung muß von extrahierbaren Stoffen herrühren, die hemmend in den Stoffwechsel des Embryos eingreifen.

Vergleicht man den Verlauf der Keimungshemmung im intakten Samen mit der künstlichen Beeinflussung des isolierten Embryos durch Endospermextrakte, so lassen sich Unterschiede im Ablauf der Hemmung feststellen. Im intakten Samen dauert der hemmende Einfluß des Endosperms höchstens bis zum Austreiben der Sproßknospe. Beim isolierten

Embryo dagegen bleibt die Hemmwirkung durch den Extrakt während der ganzen Versuchsperiode erhalten. Figuren 11 bis 14 zeigen den Verlauf des Streckungswachstums von Sprossen isolierter Embryonen. Durch die Endospermextrakte wird die Streckung gleichmäßig über alle Meßperioden verringert, was ein allmähliches Überwinden der Hemmung durch den Embryo ausschließt. Daraus läßt sich ersehen, daß die Wirkung des Hemmstoffes über die ganze Versuchsdauer erhalten bleibt und keine Zerstörung des wachstumsverringernenden Stoffes durch Licht oder O₂ einsetzt.

Nun muß die Frage geprüft werden, ob der Embryo durch die keimungsfördernde rhythmische Temperaturänderung zur Inaktivierung des Hemmstoffes angeregt wird. Isolierte Embryonen werden auf einem



Figur 14

Reduktion des Sproßwachstums isolierter Embryonen durch den Säureextrakt des Endosperms

Nährboden nach Randolph und Cox
+ 0,015 m Phosphatpuffer

Licht: 12 h/Tag

Temperatur: 22° C

Zuwachs: mittlerer Zuwachs des Sprosses während je 3 Tagen

Konzentration Statistische Prüfung der Differenz zur Kontrolle (K)

0,1

signifikant

0,5

signifikant

hemmstoffenthaltenden Nährboden (H₂O-Extrakt Konz. 1) bei konstanter und wechselnder Temperatur aufgezogen und das Streckungswachstum der Sprosse verglichen (Tabelle 10). Die Entwicklung geht bei beiden Gruppen jedoch ganz parallel. Der Embryo vermag also auch unter keimungsfördernden Bedingungen die Hemmstoffwirkung nicht zu reduzieren. Folglich verändern die Temperaturstöße den Stoffwechsel des *Endosperms*, nicht aber des *Embryos*.

Handelt es sich bei den aus dem Endosperm extrahierten Stoffen nun wirklich um keimungsregulierende Substanzen, so sollten diese im Endosperm *gekeimter* Samen nicht mehr nachweisbar sein. Hemberg (1949) kann das für seinen Hemmstoff aus den Schalen der Kartoffelknolle zeigen. Das gleiche Resultat erhalten Steward und Caplin (1952) bei der Untersuchung von wachstumshemmenden Stoffen in ruhenden Geweben (Kartoffelknolle, Knospen von *Acer*, Zwiebeln von *Allium*). Luckwill (1952) dagegen verneint eine Bedeutung der extrahierbaren Hemmstoffe aus Apfelsamen beim eigentlichen Keimungsvorgang. Da sich bei der biologischen Bestimmung der Wirkstoffe immer nur die Summe der Effekte

Tabelle 10

Entwicklung von Embryonen nach Zugabe von Endospermextrakt
bei konstanter und wechselnder Temperatur

Extrakt: H₂O, Konzentration 1, Licht: 12 h

Nährboden nach Randolph und Cox + 0,015 *m* Phosphatpuffer

Temperatur	Anzahl Samen	Keimung			Wachstum	
		Keimstufe I	Keimstufe II	Keimgeschwindigkeit Tage	Wachstumsgeschwindigkeit <i>m</i>	Mittlere Länge der Sprosse mm
konstant 22° C	50	96 %	74 %	4,8	1,17	18,00
wechselnd 22°/30° C	50	98 %	68 %	5,4	1,13	17,53
Statistische Prüfung		nicht signifikant (<i>x</i> = 0,368)	nicht signifikant (<i>x</i> = 0,331)	nicht signifikant (<i>t</i> = 0,957)	—	nicht signifikant (<i>t</i> = 0,159)

Statistische Prüfung (Grenzwerte) $\left\{ \begin{array}{l} \text{Keimzahl: } x_0 = 2,576 \\ \text{Keimgeschwindigkeit} \\ \text{Wachstumsgeschwindigkeit} \end{array} \right\}: t_0 = 2,660$

Tabelle 11

Veränderte Entwicklung isolierter Embryonen bei Zugabe von Extrakten
ungekeimter und gekeimter Samen

Nährboden nach Randolph und Cox + 0,015 *m* Phosphatpuffer

Konzentration des Extraktes: 0,5

Anzahl Embryonen pro Gruppe: 50

Licht: 12 h/Tag, Temperatur: 22° C

Keimstadium extrahierter Samen	Keimung					Wachstum	
	Keimstufe I		Keimstufe II		Keimgeschwindigkeit Tage	Wachstumsgeschwindigkeit <i>m</i>	<i>t</i>
	%	<i>x</i>	%	<i>x</i>			
ungekeimt	90		64		5,7	0,10	
Keimstufe I	94	0,733	78	0,873	4,0	1,58	9,579
Keimstufe II	92	0,392	78	0	4,2	1,64	0,244
Kontrolle	96	0,842	74	0,234	3,6	2,65	4,233

Statistische Prüfung (Grenzwerte) $\left\{ \begin{array}{l} \text{Keimzahl: } x_0 = 2,576 \\ \text{Keimgeschwindigkeit} \\ \text{Wachstumsgeschwindigkeit} \end{array} \right\}: t_0 = 2,660$

von Wuchsstoff und Hemmstoff bestimmen läßt, schreibt der Autor die verminderte Hemmwirkung eines Extraktes aus nicht mehr ruhenden Geweben der Entstehung von Wuchsstoff zu. Wenn man allerdings keine additive Wirkung, sondern eine direkte Beziehung Hemmstoff-Wuchsstoff annimmt (s. S. 176), so spielt dieser Einwand weiter keine Rolle. Bei der Prüfung der Hemmstoffinaktivierung im keimenden Samen von *Iris Pseudacorus* wird aber die Extraktionsmethode¹ so gewählt, daß Auxine vom Typus der lipoidlöslichen IES nach Möglichkeit abgetrennt und eine additive Wuchsstoffwirkung ausgeschaltet wird. Tabelle 11 stellt das Ergebnis der Entwicklung von Embryonen unter dem Einfluß extrahierter Stoffe aus dem Endosperm ungekeimter und gekeimter Samen dar. Dazu muß gesagt werden, daß ein gewisser Grundwert der Entwicklungshemmung durch den Samenextrakt immer erhalten bleibt, der in keiner Beziehung zur Keimungshemmung steht, sondern von der Zerstörung des extrahierten Gewebes herrührt. Vor allem bleibt das Wurzelwachstum gehemmt (Figur 15). Als analoge Erscheinung konnten auch Barton und Solt (1947/49) bei ihren Untersuchungen über den Abbau von Hemmstoffen während der Nachreife der Samen von *Sorbus aucuparia*, *Berberis Thunbergii* und der Früchte von *Lactuca sativa* allgemein zwei verschiedene Hemmstofftypen feststellen. Der eine ist ein eigentlicher Keimungshemmstoff, der andere besitzt dagegen keine Beziehung zur Ruheperiode und hemmt ebenfalls in erster Linie das Wurzelwachstum, wie das bei den Extrakten des Endosperms von *Iris* der Fall ist. Dieser zweite Hemmstofftyp konnte von den Autoren auch in den nicht ruhenden Samen von *Phaseolus* gefunden werden.

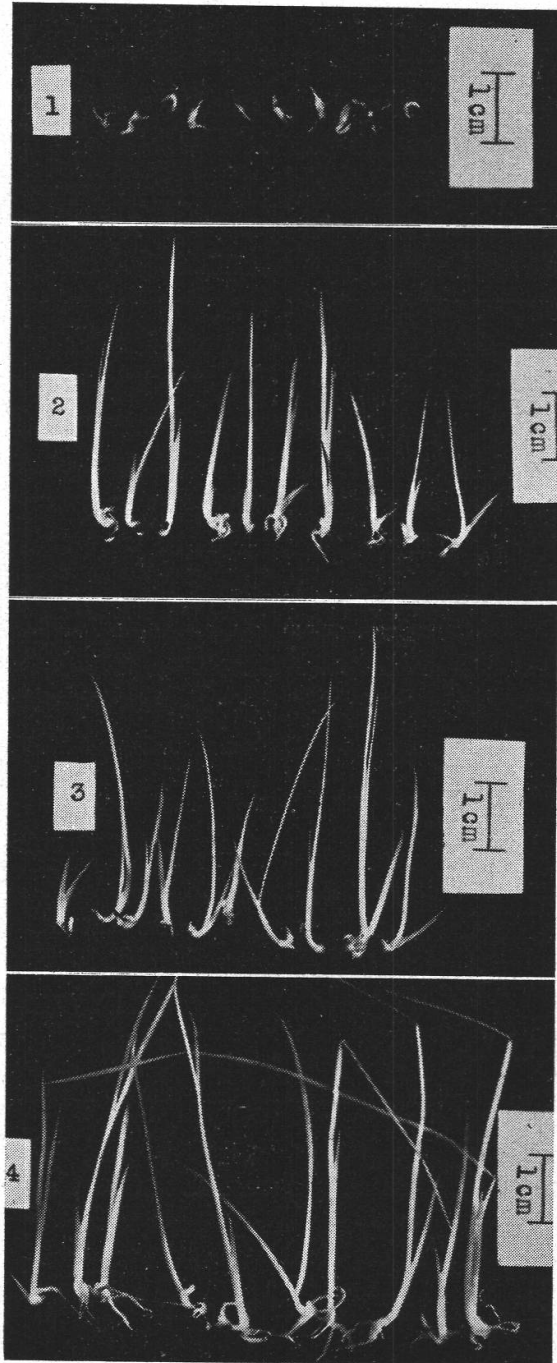
Trotz dieser Überlagerung kann die Hemmstoffabnahme im keimenden Samen von *Iris Pseudacorus* einwandfrei festgestellt werden. Die Inaktivierung des Keimungshemmstoffes im Endosperm findet *vor dem Erreichen der ersten Keimstufe* statt, also kurz vor dem Austreiben der Keimwurzel, während die äußerlich zu beobachtende Keimverzögerung sich noch bis zum Beginn der zweiten Keimstufe hinzieht.

Durch die vorliegenden Versuche wird die keimungsregulierende Wirkung der extrahierten Hemmstoffe bestätigt. Die Keimverzögerung beruht also nicht auf einer durch äußerliche Stoffzugabe aufhebbaren Mangelercheinung im Stoffwechsel des Samens, sondern auf *der Gegenwart stoffwechselblockierender Substanzen im Endosperm*. Diese sind allerdings nicht Ursache, sondern nur Realisatoren der Keimungshemmung und

¹ Ausschütteln des sauren Äthanol-Extraktes (pH 5,4) mit Chloroform. Die wäßrige Phase wird weiter verwendet. Kolorimetrische Bestimmungen der IES mit der Salkowski-reaktion nach Huber (1951) bestätigten die erwartete Verteilung des Wuchsstoffes im Modellversuch: wäßrige Phase 9,8 %, lipoid Phase 90,2 % (Verhältnis: $9,21 \pm 0,05$). Sutter (1944) bestimmte die Verteilung der IES zwischen Äther und Wasser nach zweimaligem Ausschütteln bei 20° C zu $20,1 \pm 1,3$.

Produkte von Stoffwechselvorgängen, die vor dem Erreichen der Samenreife ablaufen.

Die Hemmstoffe werden in jedem Samen nur einmal gebildet, und ihre Menge ist nach den vorliegenden Beobachtungen keinen jahreszeit-



Figur 15

Veränderte Entwicklung der isolierten Embryonen durch Extrakte ungekeimter und gekeimter Samen (Aethanol-Extrakt)

Nährboden nach Randolph und Cox + 0,015 *m* Phosphatpuffer

Licht: 12 h/Tag

Temperatur: 22° C

Extrahierte Samen:

- 1 ungekeimt
- 2 gekeimt (Keimstufe I)
- 3 gekeimt (Keimstufe II)
- 4 Kontrolle

lichen Schwankungen unterworfen. Es kann sich offensichtlich nicht um eine endogen bedingte Ruheperiode handeln, die der Same vom jahreszeitlichen Rhythmus seiner Mutterpflanze übernimmt, wie es Bünning (1949) aus seinen Versuchen mit Samen geschlossen hat.

Diskussion

Auf Grund der durchgeführten Experimente können verschiedene Ursachen, die zu einer Keimverzögerung von Samen führen, wie Impermeabilität der Samenschale oder mangelhafte Hydrolyse der Reservestoffe, für *Iris Pseudacorus* L. ausgeschlossen werden. Auf Grund der wachstumshemmenden Wirkung von Endospermextrakt auf den isolierten Embryo wird auf einen extrahierbaren *Keimungshemmstoff* geschlossen. Dieser ist im gekeimten Samen nicht mehr nachzuweisen. Es muß aber betont werden, daß die Hemmung des isolierten Embryos durch den Endospermextrakt verschieden ist von der Hemmung des im Samen eingeschlossenen Embryos durch das intakte Endosperm. Dies wird der Unfähigkeit des Embryos zur Inaktivierung des Hemmstoffes zugeschrieben. Bildung und Abbau des Hemmstoffes müssen im Endosperm verlaufen.

Der Nachweis von echten Keimungshemmstoffen ist in neuerer Zeit verschiedenen Autoren gelungen. Bereits erwähnt wurden die Arbeiten von Hemberg (1949, 1950, 1954). Ruhende Kartoffelknollen enthalten in ihren Schalen einen ätherlöslichen Hemmstoff, der die Förderung des Streckungswachstums der Haferkoleoptile durch IES reduziert und der gleichzeitig mit der Beendigung der Ruheperiode verschwindet. Der Autor vermutet trotz der Versuchsanordnung, die einen Antagonisten des Streckungswachstums bestimmt, daß es sich um eine Fermenthemmung im Stoffwechsel handelt. Durch Glutathion oder durch Äthylenchlorid, das den Gehalt an Glutathion in der Knolle steigert, können die ruhenden Knospen zum Austreiben angeregt werden. Als wirksam wird die Sulfhydrylgruppe angesehen. Der Hemmstoff vermag die wichtigen Stellen des Stoffwechsels zu blockieren, die durch SH-Gruppen enthaltende Fermente gelenkt werden. Die Wirkung des Glutathions beruht auf der Reaktivierung der SH-Gruppen.

Lasheen und Blackhurst (1956) finden in den ruhenden Achänen von *Xanthium* zwei verschiedene Hemmstoffe, deren R_F -Werte kleiner als der von IES sind. Ihr Abbau erfolgt nur nach Erhöhung der Sauerstoffkonzentration der Atmosphäre. Während der Nachreife findet keine Inaktivierung der im Embryo lokalisierten Hemmstoffe statt. Poliakoff-Mayber und Mitarb. (1957) finden dieselben sauren, ätherlöslichen Hemmstoffe mit den entsprechenden R_F -Werten in den Achänen von *Lactuca*. Diese Hemmstoffe können im ungekeimten Samen nachgewiesen werden; Wuchsstoffe treten erst während der Keimung auf.

Borriss und Arndt (1956) finden einen «Entwicklungsblock» im Embryo von *Agrostemma githago*, der während der Samenreife ungefähr parallel zur Bräunung der Samenschale auftritt und während der Nachreife abnimmt. Auch die Fähigkeit zur Chlorophyllbildung in den Kotyledonen verschwindet zu Beginn der Ruheperiode, ist aber zur Zeit der Samenreife wieder vorhanden, während sich die isoliert aufgezogenen

Hypokotyl- und Wurzelanlagen erst nach einer längeren Kältebehandlung weiter entwickeln.

Bei der Frage nach dem *Mechanismus* der Hemmstoffwirkung tritt eine Hypothese in den Vordergrund, die die Wirkung der natürlichen Hemmstoffe derjenigen von Cumarin analog setzt (s. a. Mayer, 1953). Diese gründet sich auf die oben geschilderte Fermenthemmung durch Blockierung der freien SH-Gruppen, die durch Zusatz von Verbindungen aufgehoben werden kann, die die genannte Gruppe reaktivieren. Die keimungsfördernde Wirkung von Thioharnstoff und verwandten Verbindungen und ihr Einfluß auf die Fermentaktivität war schon früher untersucht worden (Denny und Mitarb., 1930), aber die antagonistische Wirkung dieser Verbindungen (Thioharnstoff, Glutathion, 1,2-Dithio-*propanol* BAL) gegenüber den natürlichen Keimungshemmstoffen konnte erst Hemberg (1950) nachweisen, indem er ruhende Kartoffelknollen mit Glutathion behandelte und das Verschwinden des Hemmstoffes feststellte. Elliott und Leopold (1953) finden in *Avena*-Karyopsen ein Polypeptid, welches die α - und β -Amylase durch Blockierung der SH-Gruppen hemmt; auch hier kann die Hemmung durch Glutathion oder BAL aufgehoben werden. Thimann und Bonner (1948) heben die Bedeutung eines SH-Gruppen enthaltenden Enzyms hervor, das das Streckungswachstum kontrolliert und dessen Aktivität durch Blockierung mit Monojodessigsäure herabgesetzt wird. Der Hemmstoff, der über die Sulfhydrylgruppen wirkt, hat demnach eine breite Angriffsfläche und vermag Stoffwechsel und Wachstum zu kontrollieren.

Es besteht in diesem Falle eine direkte Beziehung zwischen der Hemmstoffwirkung und der Aktivierung von Wuchsstoffen, was den Einwand von Luckwill (1952) hinfällig macht, wonach die verringerte Hemmwirkung der Extrakte nachgereifter Samen nur der Entstehung von Wuchsstoff bei gleichbleibendem Hemmstoffspiegel zuzuschreiben ist, nicht aber dem Verschwinden des Hemmstoffes, der nach diesem Autor keine Bedeutung für die Ruheperiode der Samen haben soll.

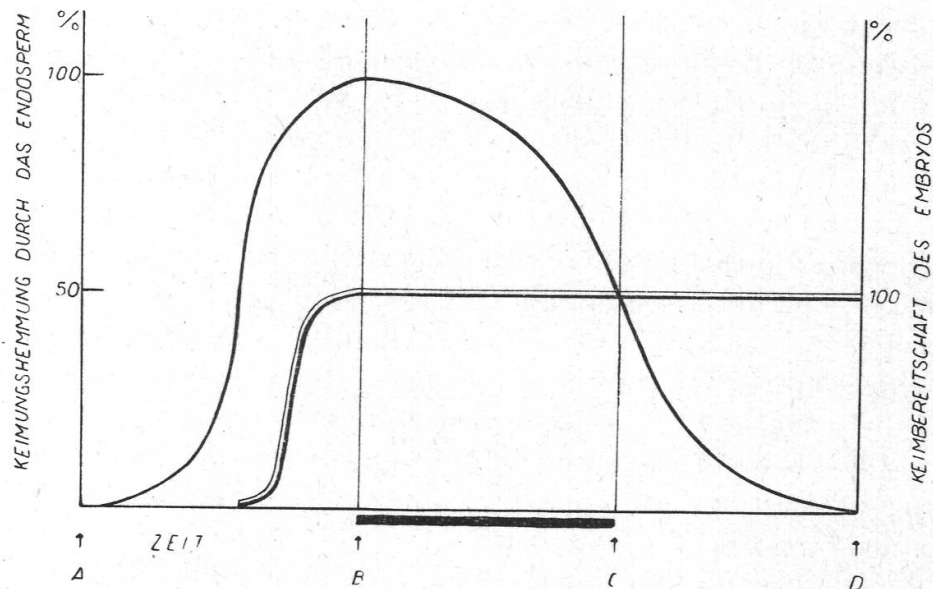
Die biochemischen Grundlagen, die zur Entstehung des Ruhezustandes und zur *Bildung* von Keimungshemmstoffen führen, werden von Vegis (1955) im Anschluß an seine Untersuchungen über die Bildung von Ruheknospen bei *Hydrocharis* ausführlich besprochen. Wie schon im Zusammenhang mit dem Gaswechsel erwähnt wurde (S. 161), führt eine partiell anaerobe Atmung zur Anhäufung von Hemmstoffen. Nach Vegis (1955, S. 126) ist «in jungen Vegetationspunkten, bei denen Entstehung des Ruhezustandes zu beobachten ist, eine Begrenzung der Oxydation des in Atmungsvorgängen entstandenen Wasserstoffs zu bemerken». Die bei der Kohlehydratspaltung entstandenen Intermediärprodukte, die bei mangelnder Sauerstoffversorgung im Zitronensäurezyklus nicht oxydativ abgebaut werden können, werden nach Vegis zum Aufbau von Fetten bzw. Lipoiden verwendet, die in großer Menge in den Plasmamembranen

abgelagert werden und die Aktivität der Zellen vermindern. Über die Struktur und Synthese der Hemmstoffe ist allerdings nichts bekannt.

Nach diesen Ausführungen kann die Ruheperiode der Samen als eine Wechselbeziehung zwischen Endosperm und Embryo geschildert werden. Der Embryo besitzt schon lange vor der Samenreife die Fähigkeit zu keimen, d. h. sich zu einem zwerghaften Keimling auszudifferenzieren. Um dem aus dem unreifen Samen herauspräparierten Embryo eine normale Entwicklung auf künstlichem Nährboden zu gewährleisten, müssen ihm Stoffe dargeboten werden, die die vorzeitige Differenzierung zugunsten der weiteren Embryonalentwicklung hemmen. Van Overbeek (ref. Brink und Cooper, 1947) entdeckte in der Kokosnußmilch, die flüssiges Endosperm darstellt, einen «Embryofaktor», dessen thermolabile Komponente das Wurzelwachstum hemmt, während die thermostabile Komponente das kallusartige Wachstum des Embryos fördert und der Ausdifferenzierung zum Keimling entgegenwirkt. Werden unreife Embryonen von *Datura Stramonium* auf einem Nährboden gezogen, der kaltsterilisierte Kokosnußmilch enthält, so entwickeln sie sich normal wie ein im Samen eingeschlossener Embryo; werden sie dagegen auf einen synthetischen Nährboden gesetzt, so bilden sie junge Wurzeln. Blakeslee und Satina (1944) können bei ihren Versuchen mit Embryonen, die *Datura*-Kreuzungen entstammen, die Kokosnußmilch durch kaltsterilisierten Malzextrakt ersetzen. Kent und Brink (1947) finden einen entsprechenden Embryofaktor im kalt sterilisierten Tomatenextrakt, der das Wachstum isolierter *Hordeum*-Embryonen begünstigt. Ziebur und Mitarb. (1950) entdecken, daß der Tomatenextrakt auch durch Caseinhydrolysat ersetzt werden kann; 1% Caseinhydrolysat unterbindet die vorzeitige Differenzierung und führt zur Entwicklung eines reifen Embryos. Diese Regulation der Entwicklung hängt nicht bei allen Samen von den Ansprüchen des jungen Embryos an bestimmte Wuchsstoffverhältnisse ab, sondern kann, wie gerade bei *Hordeum*, das Resultat einer Wechselbeziehung zwischen Ernährungsbedürfnissen und physikalischen Faktoren sein, da die Keimungshemmung auch durch dem Caseinhydrolysat isotonische Saccharose- oder Mannitlösungen hervorgerufen werden kann. *Hordeum*-Embryonen können auf einem Nährboden mit 12,5% Saccharose gezogen werden (Ziebur und Brink, 1951), wodurch sich das Caseinhydrolysat erübrigt. Das natürliche Endosperm von *Hordeum* kann den gleichen osmotischen Effekt ausüben und besitzt zudem noch wachstumsfördernde Stoffe, die nicht nur die Entwicklung der eigenen Embryonen (*Hordeum*), sondern auch derjenigen von *Capsella* oder *Raphanus* fördern.

In diesem ersten Entwicklungsstadium des Samens hat das Endosperm offensichtlich die doppelte Funktion der Förderung des Embryonalwachstums durch spezifische Wirkstoffe und der Hemmung einer vorzeitigen Keimung durch Hemmstoffe und auch auf physikalischem Wege durch Erhöhung des osmotischen Wertes.

Nach einiger Zeit geht das Endosperm, eventuell in der von Vegis (1955) beschriebenen Weise, in einen Ruhezustand über, der ungefähr parallel mit dem Austrocknungsgrad des Nährgewebes (Wellington, 1956) und der Aufstapelung der Reservestoffe einsetzt (Pope, 1949). Zur gleichen Zeit entstehen offenbar weitere Keimungshemmstoffe, die nach den oben zitierten Autoren Endprodukte eines teilweise anaerob verlaufenden Stoffwechsels sein können.



Figur 16

Schema der Keimung als Wechselwirkung zwischen der Keimbereitschaft des Embryos und der Keimungshemmung durch das Endosperm

- == Keimbereitschaft des Embryos
- Keimungshemmung durch das Endosperm
- A Befruchtung
- B Samenreife
- C 50 % Keimung
- D 100 % Keimung (für *Iris* nach drei Jahren, siehe Werckmeister, 1937)
- mittlere Dauer der Nachreife

Der Embryo selbst geht bei *Iris* nicht in Ruhe über, sondern besitzt nach wie vor die Fähigkeit zum Auskeimen. Er vermag die Keimung aber nicht von sich aus zu realisieren, da sein Stoffwechsel von demjenigen des Endosperms abhängig ist. Erst nach der Entfernung entwicklungshemmender Stoffe aus dem Endosperm kann er sich zum jungen Keimling ausdifferenzieren.

Eine Unterbrechung der kontinuierlichen Entwicklung des Embryos tritt bei den meisten Samen auf; daran mögen sogar häufig eigentliche Keimungshemmstoffe beteiligt sein. Die unterschiedlichen Nachreifebe-

dürfnisse wären nur ein Maß für den Umfang der noch bestehenden Entwicklungshemmung zur Zeit der äußerlich erkennbaren Samenreife. Figur 16 soll diesen Gedankengang veranschaulichen. Mit der Abnahme der Keimungshemmung tritt bei konstanter Keimbereitschaft des Embryos eine erhöhte Keimfähigkeit auf. Samen, die nach der Ernte noch nicht keimfähig sind und einer Nachreife bedürfen, befinden sich in der frühen Phase der Entwicklungshemmung. Viel häufiger sind jedoch Samen, die zur Zeit der Samenreife den kritischen Punkt der Keimungshemmung bereits überschritten haben und unmittelbar darauf eine maximale Keimfähigkeit besitzen.

Zusammenfassung

Experimentelles

1. Zur Charakterisierung der Keimverzögerung bei Samen von *Iris Pseudacorus* L. wird die Entwicklung des im Samen eingeschlossenen Embryos mit der des isolierten Embryos unter aseptischen Bedingungen verglichen.
2. Die intakten Samen werden durch rhythmisch schwankende Versuchstemperaturen ($22^{\circ}/30^{\circ}$ C) zur Erhöhung der *Keimzahl* angeregt und dabei die Keimgeschwindigkeit des auskeimenden Embryos vergrößert. Die Entwicklung des *isolierten* Embryos wird durch solche Temperaturschwankungen *nicht* beschleunigt.
3. Die *Keimzahl* der Samen kann durch Anschneiden, noch stärker durch vollständiges Entfernen des Endosperms erhöht werden. Die *Keimgeschwindigkeit* des Embryos wird durch diese beiden Eingriffe ebenfalls erhöht, das *Streckungswachstum* des Sprosses wird jedoch *nicht* beschleunigt.
4. Durch das Entfernen der Samenschale wird die Zahl der Keimungen *nicht* erhöht.
5. Aus dem *Endosperm* lassen sich Stoffe extrahieren, die die *Entwicklung des isolierten Embryos hemmen*.
6. Der *isolierte* Embryo kann durch rhythmische Schwankung der Versuchstemperatur nicht zur Überwindung der durch Endospermextrakte verursachten Hemmung angeregt werden.
7. Im Endosperm *gekeimter* Samen können diese entwicklungshemmenden Stoffe nicht mehr gefunden werden.

Folgerungen

8. Die Keimverzögerung der Samen von *Iris Pseudacorus* L. beruht weder auf einer Impermeabilität der Samenschale noch auf einer mangelhaften Hydrolyse des Reservekohlehydrates, sondern muß auf Grund der experimentellen Befunde der Wirkung eines extrahierbaren *Keimungshemmstoffes* zugeschrieben werden.

9. Die Bildung wie auch der Abbau dieses Hemmstoffes findet im *Endosperm* statt. Die Entwicklung des im *Samen eingeschlossenen* Embryos wird durch die Hemmstoffe im *Endosperm* reguliert. Der Embryo selbst ist nicht ruhend, sondern keimt unmittelbar nach der Befreiung vom *Endosperm*.
10. Die Bedeutung des *Endosperms* für die Keimfähigkeit des Embryos und die Möglichkeit der Realisation eines Ruhezustandes im *Samen* durch Hemmstoffe wird diskutiert.

Die vorliegende Arbeit wurde am *Botanischen Institut der Universität Basel* unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. M. Geiger-Huber ausgeführt; für sein Interesse an meiner Arbeit und die Bereitstellung der nötigen Hilfsmittel möchte ich ihm herzlich danken. Fräulein B. Baumgartner bin ich für die sorgfältige Mitarbeit am experimentellen Teil der Arbeit und Herrn H. Müller für die Anfertigung technischer Hilfsmittel zu großem Dank verpflichtet.

Zitierte Literatur

Referierende Arbeiten

- Brink, R. A., and Cooper D. C., 1947. The endosperm in seed development. *Bot. Review*, **13**, (8/9), 423–541.
- Crocker, W., and Barton, L.V., 1953. The physiology of seeds. *Chronica Botanica Co.*, Waltham (Mass.).
- Evenari, M., 1949. Germination inhibitors. *Bot. Review*, **15**, 153–194.
- Toole, E. H., Hendricks, S. B., Borthwick, H. A., and Toole, V. K., 1956. Physiology of seed germination. *Ann. Rev. Plant Physiology*, **7**, 299–324.

Originalliteratur

- Barton, L.V., and Solt, M. L., 1947–49. Growth inhibitors in seeds. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **15**, 259–278.
- Blakeslee, A. F., and Satina, S., 1944. New hybrids from incompatible crosses in *Datura* through culture of excised embryos on malt media. *Science*, **99**, 331–334.
- Borriss, H., und Arndt, M., 1956. Entwicklung isolierter *Agrostemma*-Embryonen in Abhängigkeit vom Reife- und Nachreifezustand der Samen. *Flora*, **143**, (3), 492–498.
- und Schneider, G., 1955 a. Die Beziehungen zwischen N-Haushalt und keimungsphysiologischem Verhalten von *Agrostemma*-Samen. *Naturwissenschaften*, **42**, 102.
- — 1955 b. Über den Nachweis eines Peptids in den Samen von *Agrostemma githago* L. und seine keimungsphysiologische Bedeutung. *Naturwissenschaften*, **42**, 103.
- Brown, R., 1943. Studies on germination and seedling growth. *Annals of Botany, N. S.*, **7**, 275–296.
- Bünning, E., 1949. Zur Physiologie der endogenen Jahresrhythmik in Pflanzen, speziell in Samen. *Zeitschr. für Naturforschung*, **4b**, 167–176.
- Burlet, E., 1940. Über die pflanzliche Organkultur und ihre Anwendung bei physiologischen Untersuchungen. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.*, **50**, 519–544 (Diss. Basel).
- Colin, H., Augem, A., 1928. La mannane des graines d'*Iris*. *Bull. Soc. chim. biol.*, **10**, 822–825.
- Davis, W. E., 1929–30. Primary dormancy, afterripening and the development of secondary dormancy in embryos of *Ambrosia trifida*. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **2**, 285–303.

- Denny, F. E., Miller, L. P., and Guthrie, J. D., 1930. Enzyme activities of juices from potatoes treated with chemicals that break the rest period. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **2**, 417-443.
- Ehrenthal, I., Koch, R., Smith, F., Boggs, L., and Cuendet, L. S., 1950. Separation and identification of sugars using paper chromatography. *Nature*, **148**, 626.
- Elliott, B. B., and Leopold, A. C., 1953. An inhibitor of germination and of amylase activity in oat seeds. *Physiol. Plant.*, **6**, 65-77.
- Fischer, A., 1907. Wasserstoff- und Hydroxylionen als Keimungsreize. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, **25**, 108-122.
- Fisher, R. A., 1954. Statistical methods for research workers. Edinburgh, ed. 12.
- Flemion, F., 1933. Physiological and chemical studies of afterripening of *Rhodotypos kerrioides* seeds. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **5**, 143-159.
- Hatcher, E. S. J., and Gregory, F. G., 1941. Auxin production during the development of the grain of cereals. *Nature* **148**, 626.
- Hemberg, T., 1949. Significance of growthinhibiting substances and auxins for the rest-period of the potato tuber. *Physiol. Plant.*, **2**, 24-36.
- 1950. The effect of glutathione on the growthinhibiting substances in resting potato tubers. *Physiol. Plant.*, **3**, 17-21.
- Studies on the occurrence of free and bound auxin and of growth substances in the potato tuber. *Physiol. Plant.* **7**, 312-321.
- Horrocks, R. H., 1949. Paper partition chromatography of reducing sugars with benzidine as a spraying reagent. *Nature*, **164**, 444.
- Huber, H., 1951. Über den Einfluß der Belichtung auf die Wuchsstoffempfindlichkeit der Keimstengel von *Cucumis sativus* L. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.*, **61**, 499-539 (Diss. Basel).
- Keil, J., 1939. Die Bedeutung der Blausäure bei der Samenkeimung. *Jahrb. für wissenschaftl. Bot.*, **88**, 345-372.
- Kent, N. F., and Brink, R. A., 1947. Growth in vitro of immature *Hordeum* embryos. *Science*, **106**, 547-548.
- Khudairi, A. K., 1956. Breaking the dormancy of *Prosopis* seeds. *Physiol. Plant.*, **9**, 452-461.
- Laibach F., and Keil, J., 1937. Über die keimungshemmende Wirkung der natürlichen freien Blausäure. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, **55**, 579-583.
- Lasheen, A. M., and Blackhurst, H. T., 1956. Biochemical changes associated with dormancy and afterripening of Blackberry seeds. *Amer. Soc. Hort. Sci.*, **67**, 331-340.
- Luckwill, L. C., 1952. Growthpromoting and growthinhibiting substances in relation to dormancy of apple seeds. *Jour. Hort. Sci.*, **27**, 53-65.
- Magnus, W., 1920-21. Hemmstoffe und falsche Keimung. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, **38**, (19)-(26).
- Mayer, A. M., 1953. Quantitative aspects of the behaviour of coumarin as a germination inhibitor. *Physiol. Plant.*, **6**, 413-424.
- Mitchell, E. M., 1930. A microchemical study of hemicelluloses of endosperm and cotyledons. *Amer. J. Bot.*, **17**, 117-138.
- Neumcke, U., 1931. Untersuchungen über falsche Keimungen von *Phacelia tanacetifolia* Benth. *Planta*, **14**, 310-343.
- Partridge, S. M., 1948. Filter-paper partition chromatography of sugars. *Biochem. J.*, **42**, 238-250.
- 1949. Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars. *Nature*, **164**, 443 (1949).
- Poliakoff-Mayber A., Goldschmidt-Blumenthal, S., and Evenari, M., 1957. The growth substances content of germinating lettuce seeds. *Physiol. Plant.*, **10**, 14-19.

- Pope, M. N., 1949. Viviparous growth in immature barley kernels. Journ. Agric. Res., 78, 295-309.
- Pringsheim, E. G., 1930. Untersuchungen über die Samenquellung. Planta, 11, 528-581.
- Randolph, L. F., and Cox, L. G., 1943. Factors influencing the germination of *Iris* seeds and the relation of inhibiting substances to embryo dormancy. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 43, 284-300.
- Schropp, W., and Schander, K., 1933. Wasserkulturversuche mit der «A-Z-Lösung» nach Hoagland. Jahrb. für wissenschaftl. Bot., 78, 544-563.
- Steward, F. C., and Caplin, S. M., 1952. Investigations on growth and metabolism of plant cells. 3. Evidence for growth inhibitors in certain mature tissues. Ann. of Bot., N. S., 16, 477-489.
- Stokes, P., 1953. A Physiological Study of Embryo Development in *Heracleum sphondylium* L. 3. The Effect of Temperature on Metabolism. Ann. of Bot., N. S., 17, 157-173.
- Stokes, P., 1953. The Stimulation of Growth by low Temperature in Embryos of *Heracleum sphondylium* L. J. exp. Bot., 4, 222-234.
- Stoll, A., und Rüegger, A., 1952. Trennung und Bestimmung von Zuckern durch Papierchromatographie ihrer *p*-Nitrophenylhydrazone. Helv. physiol. Acta, 10, 385-394.
- Sutter, E., 1944. Die chemische Bestimmung des Heteroauxins und Versuche über seine Aufnahme durch die Pflanze. Ber. Schweiz. Bot. Ges., 54, 197-244 (Diss. Basel).
- Thimann, K. V., and Bonner, W. D., jr. 1948. Experiments on the growth and inhibition of isolated plant parts. 1. The action of iodoacetate and organic acids on the *Avena* coleoptile. Amer. Journ. Bot., 35, 271-280.
- Thornton, N. C., 1945. Importance of oxygen supply in secondary dormancy and its relation to the inhibiting mechanism regulating dormancy. Contrib. Boyce Thompson Inst., 13, 487-500.
- Toole, E. H., Toole, V. K., Borthwick, H. A., and Hendricks, S. B., 1955 a. Photo-control of *Lepidium* seed germination. Plant Physiol., 30, 15-21.
- — — — 1955 b. Interaction of temperature and light in germination of seeds. Plant Physiol., 30, 473-478.
- Vallance, K. B., 1952. The germination of the seeds of *Rhinantus Cristagalli*. Ann. of Bot., N. S., 16, 409-420.
- Vegis, A., 1955. Über den Einfluß der Temperatur und der täglichen Licht-Dunkel-Periode auf die Bildung der Ruheknospen, zugleich ein Beitrag zur Entstehung des Ruhezustandes. Symbolae Botanica Upsaliensis, 14, (1), 7-175.
- Wareing, P. F., and Foda, H. A., 1957. Growth inhibitors and dormancy in *Xanthium* seeds. Physiol. Plant., 10, 266-280.
- Wellington, P. S., 1956. Studies on the germination of cereals. 1. The germination of wheat grains in the ear during development, ripening and after-ripening. Ann. of Bot., N. S., 20, 105-120.
- Werckmeister, P., 1937. Über Herstellung und künstliche Aufzucht von Bastarden der Gattung *Iris*. Gartenbauwissenschaften, 10, 500-520.
- Woodward, C. C., and Rabideau, G. S., 1953. The composition of plant fractions extracted with 80 % alcohol. Plant Physiol., 28, 535-538.
- Ziebur, N. K., Brink, R. A., Graf, L. H., and Stahman, M. H., 1950. The effect of casein hydrolysate on the growth in vitro of immature *Hordeum* embryos. Amer. J. Bot., 37, 144-148.
- — 1951. The stimulate effect of *Hordeum* endosperms on the growth of immature plant embryos in vitro. Amer. J. Bot., 38, 253-256.