

VORBEREITENDE VERSUCHE ZUR ANWENDUNG VON TETRAZOLIUMCHLORID BEI SCHNELLBESTIMMUNG DER KEIMFÄHIGKEIT VON TIMOTHEE

TYYNE RITVANEN

Laboratorium der AG. – Suomen Maanviljelijäin Kauppa Oy, Tampere

Eingegangen am 30. 5. 1953.

Neben den üblichen Keimmethoden hat man seit der Jahrhundertwende sog. Schnellmethoden zu entwickeln versucht, die dazu dienen sollen, die Keimfähigkeit von Samen zu bestimmen, ohne diese keimen zu lassen. Die meisten dieser Schnellmethoden gründen sich auf die Enzymwirkungen des Samens. Bei ihrer Beurteilung gilt als Kernfrage, ob irgendwelche Enzymwirkungen hinreichend eng mit der Keimfähigkeit von Saatgut zusammenhängen. Soweit sie nicht ganz gleichzeitig aufhören, sobald der Samen seine Keimfähigkeit verliert, führen die auf sie gegründeten Methoden nicht zu zuverlässigen Ergebnissen, welcherlei Reagenzien man zum Nachweis der Enzymwirkungen auch anwenden mag.

Als Grundlage der Schnellmethoden sind Versuche über die Wirkungen von Enzymen der Hydrolase- wie auch der Desmolasegruppe und hinsichtlich letzterer im besonderen sowohl über die Oxydase als auch über die Reduktasereaktionen angestellt worden. Man hat angenommen, dass besonders die Reduktionserscheinungen des Samens mit seiner Keimfähigkeit eng zusammenhängen. Einige Untersuchungen (2, 3, 4) weisen aber darauf hin, dass die Reduktionsreaktionen von Saatgut, das durch Frost, zu hohe Trockentemperatur oder Pilzbefall beschädigt ist, nicht ebenso schnell aufhört, wie seine Keimfähigkeit abnimmt.

Zum Nachweis der Reduktionsreaktionen von Saatgut hat TURESSONS (10) Methylenblau, EIDMANN (1) Selensalze, GADD (3) Malachitgrün und LAKON (6) Tetrazoliumsalze benutzt.

LAKON hat seit dem Jahre 1938 mit 2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumchlorid experimentiert. Das Schwinden der Keimfähigkeit geht nach LAKON (5) stufenweise derart vor sich, dass erst die Hauptwurzel des Embryos abstirbt, dann allmählich die Nebenwurzeln und endlich auch sein übriger Teil, wobei der Samen seine Keimfähigkeit völlig verliert. Nach LAKON hört die Wirkung der reduzierenden Enzyme in diesen Nekrosen des Embryos ganz auf. Die lebenden Teile hingegen reduzieren das farblose Tetrazolium zu rotem Formazan und färben sich zugleich auch selbst. Auf

Grund der von ihm angestellten Färb- und Keimversuche vermeint LAKON genau bestimmen zu können, ein wie grosser Teil des Samenembryos wenigstens gefärbt sein muss, damit der Samen zu keinem vermöge.

Da die Embryonen verschiedener Samenarten von verschiedenem Bau sind, hat LAKON für jede der von ihm untersuchten Samenarten eine eigene »Farbkarte« ausgearbeitet. Zu den untersuchten Samenarten gehören unter anderem viele Getreide- und Leguminosenfrüchte (6, 7), Kruziferen (8), einige Gemüsepflanzen (9) sowie einige Büsche und Bäume. Seine für einige Wiesenpflanzen (*Lolium* und *Phleum*) ausgearbeiteten Methoden mag LAKON wohl noch nicht veröffentlicht haben.

Da die LAKONSche Schnellmethode für Timothee bei einem Untersuchungsmaterial, dessen Keimfähigkeit 90 % überstieg¹⁾, entwickelt worden war, bestand Anlass die Zuverlässigkeit der Methode auch bei schlechter keimendem Saatgut experimentell zu untersuchen. Die Erprobung der Reduktionsmethode wurde des weiteren veranlasst durch die Kenntnis dessen, dass der Anteil der Frost- und Trockenschäden beim Timothee geringer als beim Getreide ausfällt und die Möglichkeit des Gelingens somit besser ist.

Das Versuchsmaterial

Die in die Versuche einbezogenen Timotheeproben waren Ertrag von 1952 aus Süd- und Mittel-Ostbottnien. Abgesehen von einigen Ausnahmen, handelte es sich um ungetrocknetes Saatgut, dessen Feuchtigkeit 14.2—21.3 % betrug. Die Menge entspelzter Samen belief sich auf 9.6—45.1 %. Die untersuchten 90 Proben gruppieren sich nach ihrer Keimfähigkeit folgendermassen:

Keimfähigkeit unter	20 %	=	3.3 %	der Proben
»	»	78 %	=	9.0 % » »
»	»	88 %	=	50.4 % » »

Die Hälfte des Materials war also so beschaffen, dass es in seiner Keimfähigkeit nicht den gewöhnlichen, in Finnland an Timothee gestellten Mindestforderungen entsprach.

Versuchsmethoden und -ergebnisse

Nach den von LAKON gegebenen Richtlinien²⁾ wird die Schnellbestimmung der Keimfähigkeit von Timothee mittels Tetrazolium folgendermassen ausgeführt: Man schält die Samen, lässt sie in Leitungswasser in Zimmertemperatur »über Nacht« quellen, wonach sie in der Querrichtung möglichst nahe dem Embryo durchgeschnitten werden. Die durchgeschnittenen Samenkörner legt man in 1 %ige 2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumchloridlösung und lässt sie unter Verwahrung im Dunkeln bis zum nächsten Tag sich färben. Nach dem Färbungsgrad der Embryonen werden die Timotheesamen folgendermassen eingeteilt:

¹⁾ Mündliche Mitteilung.

²⁾ Mündliche Mitteilung.

1. ganz gefärbt
2. Hauptwurzel ungefärbt
3. ungenügend gefärbt
4. ungefärbt

Als keimend werden die zu den Gruppen 1 und 2 gehörenden Samen gerechnet. Im folgenden werden diese beiden Gruppen zusammen der Kürze halber als *g u t g e f ä r b t* bezeichnet, im Gegensatz zu den ungenügend gefärbten und den ungefärbten. Alle Versuche wurden so ausgeführt, dass man von jeder Probe 4×100 Samen färbte und keimen liess. Beim Keimversuch benutzte man die übliche zwischen 10 und 35° wechselnde Temperatur sowie das Durchschneiden der Samen. Wegen der Kleinheit der Timothee-Embryonen wurden die Farben bei 6facher Vergrösserung betrachtet.

Wegen der gegebenen allgemein gehaltenen Anleitungen war zunächst die am besten geeignete Keimzeit bei Zimmertemperatur auszuprobieren. Dabei stellte es sich heraus, dass, wenn man die Samen über Nacht quellen liess, bei den schnell keimenden Proben schon nach 16 Stunden ein geringes Beginnen des Keimens zu beobachten war und nach 24 Stunden ein beträchtlicher Teil der Samen schon deutlich gekeimt hatte. War wiederum das Keimen bei $10-12^\circ$ Temperatur 24 Stunden vor sich gegangen, liess sich noch kein Keimen beobachten. Färbte man die auf die angegebenen Weisen gequellten Samen derselben Probe (N:o 51) 19 St in Zimmertemperatur, so ergaben sich folgende Wertungen der Farbe:

Quellen	$10-12^\circ\text{C}$	$18-20^\circ\text{C}$
ganz gefärbt	88	35
Hauptwurzel ungefärbt	2	11
ungenügend gefärbt	10	54
ungefärbt	—	—

Durch Zusammenziehen der beiden ersten Farbgruppen ergaben sich für das 24stündige Quellen bei $10-12^\circ\text{C}$ an gut gefärbten (keimenden) Samen 90 % und für das Quellen bei $18-20^\circ\text{C}$ 46 %. Bei einem Keimversuch wurde als Keimfähigkeit der Probe 89 % festgestellt. Die durch die höhere Quelltemperatur verursachte fehlerhafte Farbwertung beruhte darauf, dass die vorgeschobenen Keime beim Färben so dunkel geworden waren, dass man sie teilweise zu der Gruppe der ungenügend gefärbten zu zählen hatte. Die gewonnenen Resultate gaben Anlass, den Einfluss der Quellzeit und -temperatur auf das Färbungsergebnis eingehender zu untersuchen. Die Versuche wurden u.a. unter Benutzung der Probe 51 bei 19stündiger Färbungszeit in Zimmertemperatur ausgeführt. Die Kurven für die verschiedenen Quelltemperaturen und -zeiten sind in Fig. 1 dargestellt.

Ogleich das Färben nach einem Quellen bei 20°C und 30°C bedeutend schneller als bei 10°C vor sich geht, ist in keiner dieser Temperaturen nach 9stündigem Quellen keine so hohe Menge gut gefärbter Samen erlangt worden, wie das Keimfähigkeitsprozent es voraussetzte. Ebensowenig wird es unter Anwendung eines Quellens bei 45°C erreicht. Dies weist darauf hin, dass die Färbungsgeschwindigkeit bei

Timothee durch Erhöhen der Quelltemperatur nicht so stark beschleunigt werden könnte, dass das Quellen im Verlaufe eines gewöhnlichen Arbeitstages vor sich gehen könnte. Wenn sich das Quellen die Nacht über fortsetzt, wird die Beurteilung der Farbe um so unsicherer, je mehr man sich der 24stündigen Quellzeit nähert. Nur bei einer Quelltemperatur von 10—12° C kann die Quellzeit ohne Beeinträchtigung zwischen 18 und 24 St wechseln. Diese Quellweise ist bei der Ausführung der Versuche zur Färbungstemperatur angewandt worden.

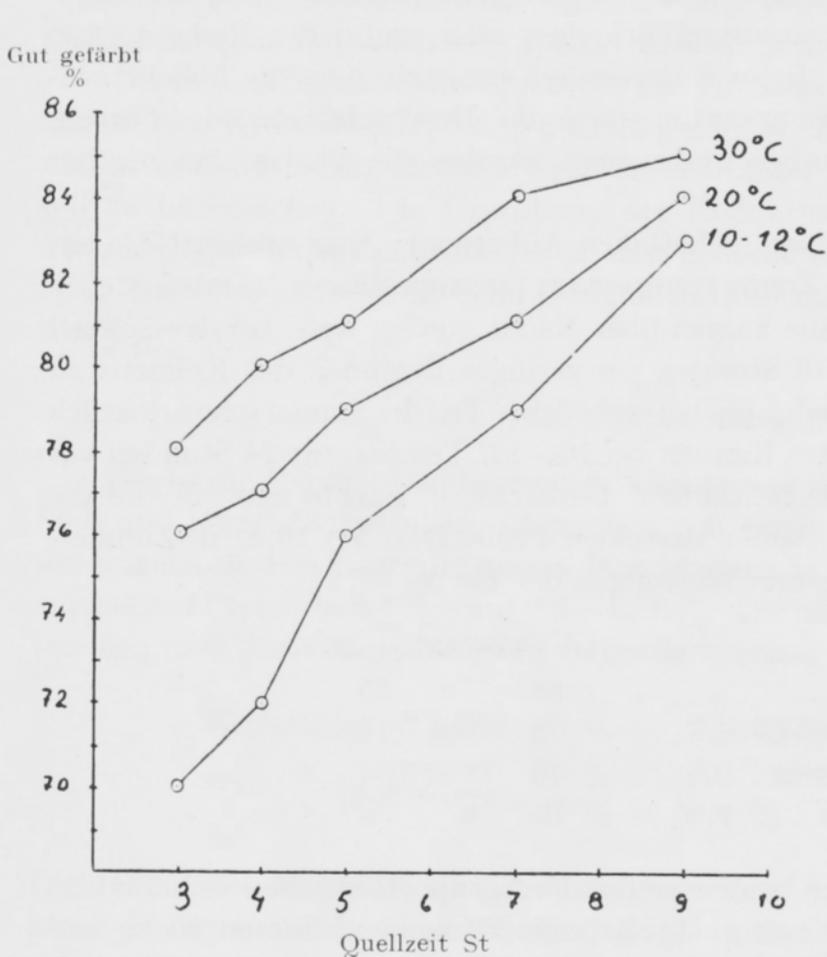


Fig. 1. Die Wirkung der Quelltemperatur auf das Färben.

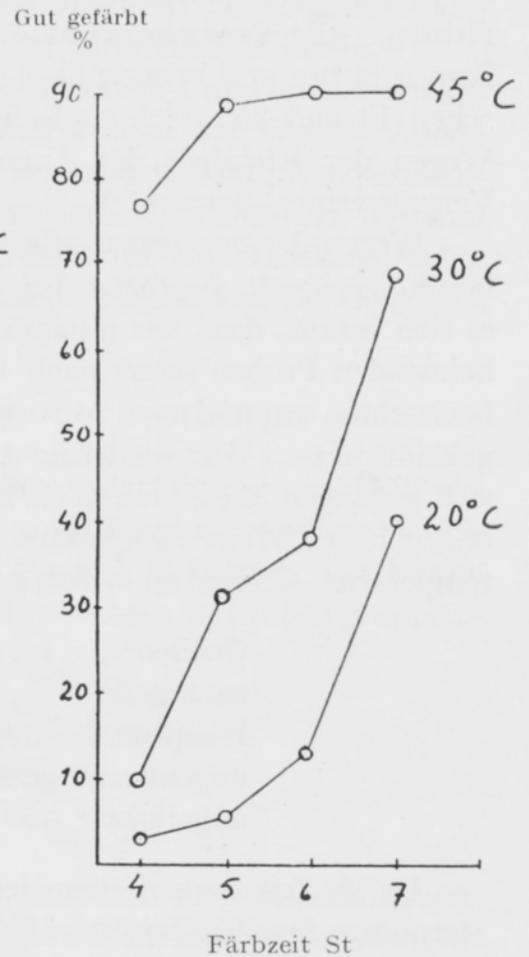


Fig. 2. Die Wirkung der Färbtemperatur auf die Färbgeschwindigkeit.

Da das Temperaturoptimum wenigstens einiger Dehydrasen 45° C beträgt, wurde diese Färbungstemperatur ausser der von 30° C und der von 20° C experimentell untersucht. Die Färbungsergebnisse der Probe 51 sind in Fig. 2 dargestellt.

Bei Färben in Zimmertemperatur ist das Ergebnis 7stündiger Färbung sehr niedrig geblieben, und auch noch bei 30° C ist nicht der richtige Wert erreicht worden, aber bei einer Temperatur von 45° C hat schon eine 5stündige Färbung ein mit dem Keimergebnis übereinstimmendes Resultat gegeben. Bei Anwendung der letzteren Temperatur färbten sich die Embryonen sehr stark und deutlich, während bei den niedrigeren Temperaturen die Intensität der Farbe so gering war, dass eine Menge Samen zu den ungenügend gefärbten gezählt werden mussten. Die Berücksichtigung der Farbintensität bei der Schnellbestimmung von Timothee scheint darum not-

wendig, weil die Beurteilung der Färbungsergebnisse der in der Erntezeit dunkel gewordenen, schwach keimenden Samen recht unbestimmt wird, wenn man bei der Färbung keinen hinreichend starken Farbton erlangt. Beim Färben in Zimmertemperatur (18—20° C) sind bei Benutzung einer 19—24stündigen Färbzeit zuverlässigere Ergebnisse erzielt worden. Die Färbtemperatur von 45° C setzt weitere Untersuchungen voraus.

Ferner wurde eine Methode erprobt, die GOODSSELL (4) bei der Schnellbestimmung der Keimfähigkeit von Mais angewandt hat. Mit der vorgeschlagenen 0.25 %igen Tetrazoliumlösung, dessen pH auf 12 gesteigert wurde, liessen sich aber keine zuverlässigen Ergebnisse erzielen.

Die eigentlichen Versuche zum Vergleich zwischen Keimmethode und Tetrazoliummethode wurden so ausgeführt, dass die geschälten Samen bei einer Temperatur von 10—12° C 18—24 Stunden gequell, danach geschnitten und in Zimmertemperatur 19—24 St gefärbt wurden. Auf Grund von neunzig Versuchsproben ergab sich als Korrelationskoeffizient $r = 0.98 \pm 0.006$. Von den Ergebnissen waren 60 % solche, bei denen das Färbprozent höher als das Keimprozent war, 9 % der Werte waren ganz gleich, und bei 31 % der Ergebnisse war das Keimprozent höher als das Färbprozent. Auf Grund des wenig umfangreichen Versuchsmaterials konnte eine solche Regelmässigkeit, dass für schlecht keimende Proben immer ein höheres Färbergebnis erhalten worden wäre, nicht beobachtet werden. Die Unregelmässigkeit dieses Schwankens zeigen folgende Zahlen:

Probe N:o	gefärbt %	keimend %
99	10	14
103	9	14
369	8	4
525	67	65
553	49	45

Am unsichersten ist die Beurteilung der Färbergebnisse bei solchen Proben, die z.B. durch regnerische Erntewitterung »dunkel« geworden sind. Obschon daneben vergleichende Keimversuche ausgeführt worden sind, ist es schwer gewesen, die Farbgrenze aufzufinden, an der die gut und die ungenügend gefärbten (die keimenden und die nicht keimenden) Samen voneinander unterschieden werden können. Die Grenze scheint wenigstens vorläufig nicht eindeutig zu sein. Die Abteilung für Pflanzenkrankheiten in der Landwirtschaftlichen Versuchsanstalt hat die bei einigen Proben besagter Art aufgetretenen Schimmelpilzgattungen bestimmt. Auf Grund dieser Bestimmungen stellt JAMALAINEN¹⁾ fest, dass nicht die Schimmelpilze, sondern einige andere Faktoren die Ursache der ungenügenden Keimfähigkeit und der dunklen Farbe der untersuchten Proben sind. Die Faktoren, die die Keim- und die Reduktionsfähigkeit des Timothees herabsetzen, bedürfen noch weiteren Untersuchungen.

¹⁾ Mündliche Mitteilung.

Tabelle 1. Vergleich zwischen den Keim- und den Färbergegebnissen für keimunreifen Timothee.

Probe N:o	Erster Keim- und Färbversuch			Zweiter Keimversuch	
	Datum	gekeimt %	gefärbt %	Datum	gekeimt %
32	10. 9. 52	88	95	10. 1. 53	94
34	13. 9. 52	65	86	3. 1. 53	82
35	10. 9. 52	71	94	26. 1. 53	90
41	18. 9. 52	84	92	22. 1. 53	90
46	18. 9. 52	72	93	22. 1. 53	89
53	22. 9. 52	80	96	22. 1. 53	95
242	16.10. 52	54	86	23. 1. 53	84
76	27. 9. 52	75	86	22. 1. 53	88
78	27. 9. 52	76	90	23. 1. 53	86

In Tabelle 1 sind Ergebnisse von Keim- und Färbversuchen mit keimunreifen Timotheeproben dargestellt.

Die in Tabelle 1 dargestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass man mit dieser Schnellmethode ein zutreffendes Bild auch von der Keimfähigkeit keimunreifen Timothees gewinnen kann. Dies hat als besonderer Vorzug der Methode zu gelten.

Die Bestimmung der Keimfähigkeit von Timothee durch die Färbungsmethode erfordert etwas mehr Arbeit als dieselbe Bestimmung mittels der Keimmethode. Besonders die Kontrolle der Farbe ist langsamer als die der Keimfähigkeit und fordert von ihrem Verrichter grössere Übung und Genauigkeit. Die Keimfähigkeit der Samen lässt sich mittels der Färbungsmethode in kaum 2mal 24 Stunden feststellen, bei der Keimmethode vergehen darauf 10—12mal 24 Stunden.

Zusammenfassung

Es wurde die Anwendung von 2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumchlorid bei der Bestimmung der Keimfähigkeit von Timothee untersucht. Auf Grund der angestellten Versuche wurde als Quelltemperatur 10—12° C und als Quellzeit 18—24 St sowie als Färbtemperatur 18—20° C und als -zeit 19—24 St gewählt. Indem nach dieser Methode mit dem Keimverfahren vergleichende Versuche ausgeführt wurden, ergab sich für 90 ungetrocknete Timotheeproben als Korrelationskoeffizient $r = 0.98 \pm 0.006$.

Bei Versuchen mit einer Färbtemperatur von 45° C wurde festgestellt, dass die Embryonen sich schon in 5 St deutlich färben. Die Benutzung dieser Temperatur erfordert aber weitere Untersuchungen, wie auch die Wirkung von Schadpilzen auf die Genauigkeit der Ergebnisse.

Dem Finnischen Betriebskultur-Fonds, durch dessen Stipendium ich mich unter der Leitung von Herrn Professor LAKON in die Anwendung der Tetrazoliummethode einarbeiten konnte, möchte ich in diesem Zusammenhang meinen ergebenden Dank zum Ausdruck bringen.

LITERATUR

- (1) EIDMANN, F. E. 1937. Ein neuer Weg der Saatgutprüfung. Forsch. dienst, 3, p. 448—455.
- (2) FUCHS, W. H. und BEILER, A. 1948. Die Anwendung der biochemischen Methode nach Lakon für Saatgutprüfung bei heisswassergebeizten Weizen. Nachr. blatt dtsh. Pfl. schutzdienst, 2, p. 127—129.
- (3) GADD, IVAR 1943. Vital Colouring of Pea Seed by Means of Malachite Green, Proc. intern. seed test ass., 13, p. 5—76.
- (4) GOODSSELL, S. F. 1948. Triphenyltetrazolium chloride for viability determination of frozen seed-corn. J. Amer. soc. agr., 40, p. 432—442.
- (5) LAKON, G. 1939. Das Schwinden der Keimfähigkeit der Samen insbesondere der Getreidefrüchte. Ber. dtsh. Bot. Ges., 57, p. 191—203.
- (6) —»— 1942. Topographischer Nachweis der Keimfähigkeit der Getreidefrüchte durch Tetrazoliumsalze. Ibid. p. 299—314.
- (7) —»— 1950. Nachweis der Keimfähigkeit der Erbsen nach dem topographischen Tetrazoliumverfahren. Saatgut-Wirtschaft, 3, p. 60—63.
- (8) —»— 1951. Die Feststellung der Keimfähigkeit der Kruziferen-Samen nach dem topographischen Tetrazoliumverfahren. Ibid. 6, p. 134—136.
- (9) —»— und BULAT, HELENE 1952. Die Feststellung der Keimfähigkeit der Spinatsamen nach dem topographischen Tetrazoliumverfahren. Ibid. 5, p. 166—168.
- (10) TURESSON, G. 1922. Über den Zusammenhang zwischen Oxydationenzymen und Keimfähigkeit in verschiedenen Samenarten. Bot. not., p. 323—335.

SELOSTUS

ALUSTAVIA KOKEITA TETRATSOLIUMKLORIDIN KÄYTÖSTÄ TIMOTEIN ITÄVYYDEN PIKAMÄÄRITYKSESSÄ

TYYNE RITVANEN

Suomen Maanviljelijäin Kauppa Oy:n laboratorio, Tampere.

On kokeiltu 2, 3, 5-trifenyltetratsoliumkloridin käyttöä timotein itävyyden pikamäärityksessä. Kuoritut siemenet paisutettiin 18—24 t. 10—12° C:n lämpötilassa, leikattiin poikittain mahdollisimman läheltä alkiota ja pantiin sen jälkeen 19—24 t:n ajaksi 1 %:een 2, 3, 5-trifenyltetratsoliumkloridiliuokseen 18—20° C:n lämpötilaan. Värin arvostelu suoritettiin siten, että itäviksi siemeniksi laskettiin kokonaan värjäytyneet sekä sellaiset siemenet, joissa vain pääjuuri oli väritön. Tutkittiin 90 kuivattamatonta timoteierää ja verrattiin tuloksia idätysmenetelmällä saatuihin tuloksiin. Vuorosuhdekertoimeksi saatiin $0,98 \pm 0,006$.

Kokeiltiin myöskin huonelämpötilaa korkeampien lämpötilojen käyttöä värjäyksessä. 45° C:n lämpötilassa värjäytyivät alkiot erittäin selvästi jo 5 t:n kuluessa. Lisätutkimukset osoittanevat, jotta tämä värjäystavan käyttö idätysmenetelmän kanssa yhtäpitäviin tuloksiin. Samaten on tutkittava tuhosienten vaikutusta tulosten tarkkuuteen.