SZENT ISTVÁN UNIVERSITÄT

GINKGO BILOBA L. ALS PERSPEKTIVISCHER STRASSENBAUM

Thesen der Dissertation

Noemi Koczka

Gödöllő

2001.

Doktorandenbildung:

Name:	Doktorandenbildung „Pflanzenwissenschaften“
Wissenschaften:	Pflanzenbau und Gartenbau
Vorstand:	Dr. Ferenc Virányi Professor, akademischer Doktor SZIE MKK, Lehrstuhl für Pflanzenschutz
Betreuer:	Dr. Judit Dimény Professorin, PhD agr.

Unterschrift des Vorstandes
der Doktorandenbildung

Unterschrift des Betreuers

1. Einleitung und Ziel der Arbeit

Man versucht die immer größer werdende Umweltverschmutzung durch strenge Regelungen und Anforderungen zu vermindern. Neben dem Einsatz von umweltfreundlichen Stoffen und Technologien spielen die natürlichen Abwehrsysteme eine wichtige Rolle. Die Pflanzen zum Beispiel sind fähig die Schadwirkungen durch Adsorption oder Neutralisierung bestimmter Substanzen zu mildern. Man kann zu dem Umweltschutz durch Aussetzen und Verbreitung von Pflanzenarten und -Sorten, die sich an die verschmutzten abiotischen Faktoren anpassen können oder aber sie tolerieren können, bedeutend beitragen.

Ginkgo biloba L. hat seinen Namen „lebendes Fossil“ gut verdient. Seine genetischen Informationen haben sich während der Jahrmillionen kaum verändert, was die Wirksamkeit seiner Abwehrmechanismen bestätigt. Der Ginkgobaum kommt unter den verschiedensten Umweltbedingungen vor. Er verfügt über eine große Immunität gegenüber Schädlingen und Schaderreger und er ist auch den antropogenen Umweltgiften gegenüber sehr resistent. Ginkgobäume findet man weltweit in den Großstädten, meist unter sehr verschmutzten und ungünstigen Bedingungen. Man soll auch den hohen Zierwert der Art erwähnen, den er seiner schönen Blattform und exotischer Erscheinung danken kann. Die Verbreitung des Ginkgobaums in Ungarn ist besonders empfehlenswert, da der Baum hier immer noch nur eine seltene Zierpflanze ist.

In der Literaturübersicht wird die botanische Beschreibung der Pflanzenart (Ursprung, Morphologie, Umweltansprüche, Widerstandsfähigkeit) detailliert dargestellt, da sie zu der Erklärung der durchgeführten Untersuchungen unbedingt zu kennen sind. Die Anwendungsmöglichkeiten des Ginkgobaums (Arzneipflanze, Zierpflanze, Lebensmittel) werden auch vorgeführt, für die man natürlich Exemplare mit verschiedenen Eigenschaften verwendet. Für die vorliegende Arbeit war die Anwendung als Straßenbaum ausschlaggebend. Als Zierpflanze sind die weiblichen Bäume wegen des unangenehmen Geruchs der äußeren Samenschicht nicht erwünscht. Zu der Bedarfsdeckung an männlichen Individuen wird die Geschlechtsbestimmung vor der sexualen Reife (Ginkgo setzt Blüten erst im Alter von 20-30 Jahren an) angestrebt, die trotz ihrer großen Bedeutung in dem Gartenbau immer noch nicht ganz gelöst ist.

Zielsetzung

1. Testen der Kadmium- und Salztoleranz des Ginkgobaumes, durch die sich die Stadttoleranz der Pflanze charakterisieren läßt.
2. Entwicklung von generativen Vermehrungsmethoden. Untersuchungen zu dem Zusammenhang zwischen Peroxidasenaktivität und Keimfähigkeit.
3. Autovegetative Vermehrung - Untersuchungen zu der Wirkung der Ursprung von Stecklingen (Geschlecht des Baumes, Basis- und Spitzenposition).
4. Analysen zu der Charakterisierung von Isoenzymen der Pflanze für die Geschlechtsbestimmung.

2. Material und Methode

2.1. Material

Für die Untersuchungen zwischen 1995-2000 lagen verschiedene Pflanzenteile (Wurzeln, Zweige, Knospen, Triebe, Blätter, Samen) von *Ginkgo biloba* L. - Induviduen von vier verschiedenen Orten als Material vor. Orte der Probennahme:

- Botanischer Garten der Szent István Universität (SZIE), Budapest,
- Botanischer Garten der Eötvös Loránd Universität (ELTE), Budapest,
- Augenklinik der Szent-Györgyi Albert Universität (SZOTE), Szeged,
- München, Innenstadt.

2.2. Methode

2.2.1. Untersuchungen zu der Kadmiumtoleranz

Die Untersuchungen wurden mit Pflanzen in Hydrokultur durchgeführt. Die jungen Pflanzen mit vier Blättern wurden in Nährlösungen, die Kadmium in verschiedenen Konzentrationen enthielten, umgesetzt. Die verwendeten Konzentrationen: 0, 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2}, 1 M Cd^{2+}. Probennahme fand fünfmal statt: 4, 28, 52, 76, 100 Stunden nach Beginn des Versuchs. Wurzeln und Blätter der Pflanzen wurden getrennt untersucht.

Nach Isolierung wurden Peroxidasenaktivität und Proteingehalt der Proben spektrofotometrisch bestimmt. Peroxidasenaktivität wurde jeweils auf den Proteingehalt der Probe bezogen (U/ mg Protein) angegeben. Die Analysen wurden dreimal wiederholt.

2.2.2. Untersuchungen zu der Salztoleranz

Die angewandte Methode ist gleich der bei den Untersuchungen zu der Kadmiumtoleranz beschriebenen Methode. Die verwendeten Konzentrationen: 0, 100, 200 és 400 mM NaCl. Probennahme fand fünfmal statt: 4, 18, 24, 42 und 48 Stunden nach Beginn des Versuchs. Wurzeln und Blätter der Pflanzen wurden getrennt untersucht.

2.2.3. Untersuchungen zu der Keimung

Die Samen wurden nach Abtrennung der Außenschicht in dem Kühlschrank (4° C) aufbewahrt. Die Keimfähigkeit wurde nach der Norm MSZ 6354-3:1991 durch Keimen zwischen Papier (Elementenzahl: 100 Stück, Wiederholungszahl: 4) und durch Aussaat in Boden (Elementenzahl: 10 Stück, Wiederholungszahl: 10) bestimmt.

Während der Jahren wurde die Wirkung von zwei Behandlungen untersucht: Die eine war Übergießen mit kochendem Wasser, die andere war mechanisches Schleifen. Bei jedem Versuch gab es natürlich auch eine unbehandelte Kontrollgruppe. Bonitiert wurde es bei dem Keimen zwischen Papiereinlagen nach 2, 4 und 8 Wochen, beziehungsweise bei dem Keimen in Boden nach 4 und 8 Wochen.

Für die biochemischen Analysen (Bestimmung der Peroxidasenaktivität) wurden Samen von gleicher Einlese verwendet und die Behandlungen waren auch gleich. Nach Homogenisierung und Isolierung wurde die Peroxidasenaktivität der Samen nach der bei den Untersuchungen zu der Stresstoleranz beschriebenen Methode bestimmt.

2.2.4. Vermehrung durch Stecklinge

Die Stecklinge stammten von männlichen und weiblichen Bäumen und wurden auch nach ihrer ursprünglichen Position (Basis oder Spitze) unterteilt. Eine Hälfte der Stecklinge wurde zu der Förderung der Bewurzelung durch Hormone behandelt, die andere Hälfte bildetete die Kontrollgruppe. Die Zahl der Stecklinge in einer Gruppe in dem Dreifaktorenversuch war 5 Stück, Wiederholungszahl: 3 (insgesamt also 120 Stück/ Versuch). Hartholz-Stecklinge wurden von älteren Ästen gesammelt. Länge der Stecklinge war 10-12 cm. Die Untersuchungen wurden mit Hartholz- und Weichholz-Stecklinge durchgeführt. Bonitiert wurde es nach 30 Tagen.

Die Hormonbehandlung bedeutete kurzes Eintauchen in eine Lösung zusammengesetzt von 1.0-2.0 mg/ ml 1,3-Indolyl-Buttersäure (IBS), 0.5-1.0 mg/ ml α-Naphtyl-Essigsäure (NES) und 20 % Dimethyl-Sulfoxid (DMSO).

2.2.5. Isoenzymanalyse durch Stärkegel-Elektrophorese

Das Material der Analyse waren Blätter und Wurzeln von geschlechtsreifen („alten“) männlichen und weiblichen (5-5 Stück), beziehungsweise Spitzenknospen, Blätter und Wurzeln von jungen („jungen“) (50 Stück) *Ginkgo biloba* L. Exemplaren.

Die Isoenzyme wurden durch Stärkegel-Elektrophorese abgetrennt.. Auf ein Gel wurden gleichzeitig 50 Proben aufgetragen.

Die untersuchten Enzyme: Shikimat-Dehydrogenase (SKDH), Malat-Dehydrogenase **(**MDH), Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH), 6-Phosphogluco-Dehydrogenase (6-PGDH), Glutamat-Dehydrogenase (GDH), Phosphogluco-Mutase (PGM) és Phosphogluco-Isomerase (PGI).

2.2.6. Isoenzymanalyse durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) und Isoelektrische Fokusierung (IEF)

Als Material der Analyse dienten verschiedene Pflanzenteile (Wurzeln, Knospen, Blätter) von männlichen und weiblichen Bäumen, bzw. von jungen Sämlingen. Die Isoenzyme wurden durch zwei Methoden untersucht:

- Polyakrylamid-Gelelektrophorese (PAGE): pH= 8.3
- Isoelektrische Fokusierung (IEF): pH=3-9 Gradientengel

Das untersuchte Enzym: Superoxid-Dismutase.

2.2.7. Isoenzymanalyse durch Isoelektrische Fokusierung

Die Proben stammten von männlichen und weiblichen Bäumen; es wurden Samen (zwei- und dreikantig), Keimlinge, Wurzeln, Zweige und Blätter untersucht. Blätter wurden während der Vegetationszeit mehrmals von verschiedenen Kronenteilen

(Haupt- und Seitentrieben) gesammelt. Die Isoelektrische Fokusierung erfolgte auf Gradientengelen pH=3-9.
Die untersuchten Enzyme: Peroxidase, Esterase.

2.3. Methode der Auswertung

Die biometrische Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe von dem Statistikprogramm MiniStat 3.2 (VARGHA és CZIGLER 1999). Die Behandlungen wurden mit dem T-Test, beziehungsweise mit Varianzenanalyse verglichen.

Die Isoenzymstrukturen wurden mittels Säulendiagrammen veranschaulicht, wo die Streifen die Stelle der einzelnen Isoenzyme und die Breite der Banden die Unterschiede in der Enzymaktivität darstellen. Die Stelle der Isoenzyme wurde bei der Stärke- und Polyacrilamidgel-Elektrophorese mit den Rf-Werten angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. Kadmiumtoleranz

Die *Wurzeln* reagierten auf den zunehmenden Kadmiumstress die zwei niedrigsten Konzentrationen (10^{-6}, 10^{-5} M Cd^{2+}) ausgenommen in jedem Fall mit signifikant erhöhter (1.2-7.2 x) Peroxidasenaktivität.

Während der Untersuchung war die Peroxidasenaktivität der *Blätter* viel kleiner als die der Wurzeln. Die Enzymaktivität in den Wurzeln war 6.4 - 14.3mal größer als in den Blättern. Der Stress löste aber in den Blättern eine größere Aktivitätssteigerung aus als in den Wurzeln. Die Peroxidasenaktivität der Blätter war im Vergleich zu der Kontrollgruppe die niedrigsten Konzentration (10^{-6} M Cd^{2+}) ausgenommen bei jeder Behandlung signifikant größer (2.1-9.3 x). Der Stress verursachte in beiden Pflanzenteilen mit Erhöhung der Kadmiumkonzentration und mit der Zeit eine immer stärkere Steigerung der Peroxidasenaktivität.

3.2. Salztoleranz

Sowohl in den *Wurzeln* als auch in den *Blättern* wurde die Peroxidasenaktivität mit Erhöhung der Salzkonzentration größer. Die Abweichungen von der Kontrollgruppe (Wurzeln: 3.2-5.6 x, Blätter: 1.1-3.5 x) und von den anderen Behandlungsgruppen waren bei jeder Probennahme signifikant.

3.3. Keimen

Die Keimfähigkeit hängt signifikant von der *Anzahl der Samenkanten* ab, die Samen mit zwei Kanten waren viel keimfähiger (84%) als die mit drei Kanten (62%). In der Peroxidasenaktivität der zwei-, bzw.dreikantigen Kernen war kein Unterschied zu finden, mit Hilfe dieser kann man die Samen also nicht unterscheiden.

Der *Standesort* bestimmt die Keimfähigkeit. In jedem Fall zeigten die Samen von der ELTE eine größere Keimfähigkeit (1.1-1.2 x) als die von der SZIE.

Der *Einlesetermin* hat auch eine bestimmende Wirkung auf die Keimfähigkeit. Die Keimfähigkeit der Anfang November (62-68 %) und Ende Februar (66-70 %) gesammelten Samen war signifikant schlechter als die der anderen Sammlungen. Am besten (78-88 %) keimten die Samen der Auflese im Dezember und im Januar.

Die Keimfähigkeit hängt auch von den *Keimungsbedingungen* ab. Die Samen zwischen Papiereinlagen keimten signifikant besser (1.2-1.3 x) als im Boden.

Anhand *der Lagerdauer* sind signifikante Unterschiede in der Keimfähigkeit der Samen zu bemerken, abhängig davon, ob sie direkt nach dem Einsammeln oder erst im Frühling gesät wurden. Bei der Aussaat im Frühling keimten die Samen besser (1.2-1.3 x) bei jedem Sammlungstermin. In den biochemischen Analysen im Februar und März zeigten die Samen von Ende November und Dezember eine signifikant höhere (1.1-1.8 x) Peroxidasenaktivität im Vergleich zu den anderen. Die Enzymaktivität war bei den Samen von Anfang November und Februar am niedrigsten.

In jedem Versuchsjahr wurde ein strenger Zusammenhang zwischen den *Samenbehandlungen* und der Keimfähigkeit gefunden. Die Kontrollgruppe wies den niedrigsten Keimprozent auf, sowohl die *wärmebehandelt*en (1.3-1.6 x) als auch die *geschliffenen* (1.2-1.6 x) Samen keimten signifikant besser. Zwischen den zwei Behandlungen gab es keinen statistischen Unterschied.

Die biochemische Analyse ergänzte die praktischen Erfahrungen sehr gut. Die Peroxidasenaktivität der behandelten Samen war signifikant höher als die der unbehandelten.

3.4. Vermehrung durch Stecklinge

Die unbehandelten Stecklinge wiesen eine Bewurzelungrate von 57-68 % auf. Das ist ein sehr gutes Ergebnis, da die Hälfte der bewurzelten Stecklinge von alten (8-10jährigen) Ästen abgeschnitten wurde.

Die Hormonbehandlung bewirkte einen signifikant stärkeren Bewurzelungsprozess (77-88 %) im Vergleich zu der Kontrollgruppe sowohl bei den Hartholz- als auch bei den Weichholz-Stecklingen. Es gab aber keine signifikante Differenz in der Bewurzelung zwischen den Geschlechtern oder zwischen den Hartholz- und den Weichholz-Stecklingen. In der Bewurzelung der Basis- und der Spitzen-Stecklinge ergab sich aber ein bedeutender Unterschied, die Basis-Stecklinge wiesen eine höhere Bewurzelungsrate (1.3-2.6 x) auf als die Spitzen-Stecklinge.

3.5. Isoenzymanalyse durch Stärkegel-Elektrophorese

In jedem Versuch konnte man die Aktivität der einzelnen untersuchten Enzyme in den verschiedenen Pflanzenteilen feststellen. Eine besonders gute Anfärbung zeigten Malat-Dehydrogenase, Glutamat-Dehydrogenase, Phosphogluco-Mutase und 6-Phosphogluco-Isomerase (Abb. 1, 2, 3, 4).

Bei der 6- Phosphogluco-Isomerase befanden sich die unterschiedlichsten und am meisten komplexen Isoenzymstrukturen. Bei den Wurzeln der jungen Pflanzen wurden zwei verschiedene Zymogramme im Verhältnis von 50-50 % gefunden.

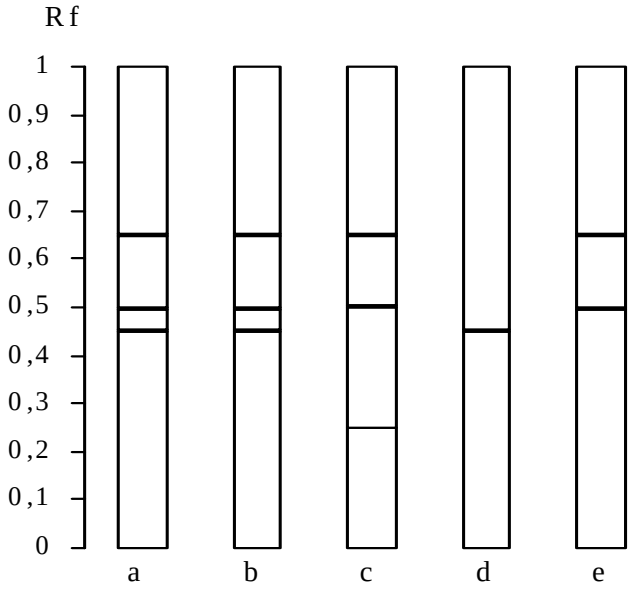

Abb. 1 Zymogramme der Malat-Dehydrogenase in Ginkgo (a/ Wurzeln von jungen Pflanzen, b/ Wurzeln von alten Pflanzen, c/ Blätter von jungen Pflanzen, d/ Blätter von alten Pflanzen, e/ Spitzenknospen von jungen Pflanzen)

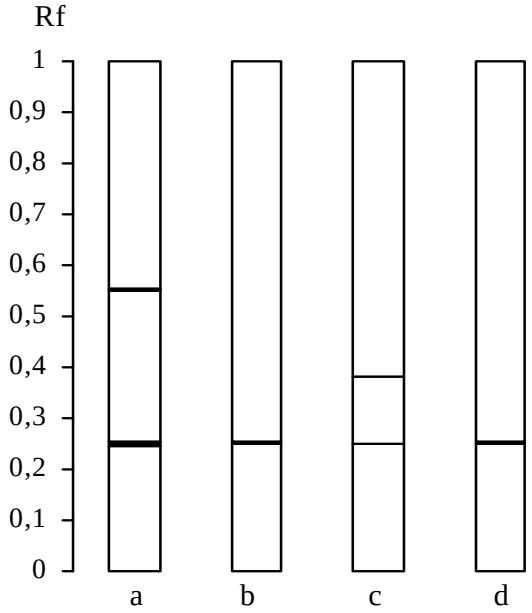

Abb. 2 Zymogramme der Glutamat-Dehydrogenase in Ginkgo (a/ Wurzeln von jungen Pflanzen, b/ Wurzeln von alten Pflanzen, c/ Blätter von jungen Pflanzen, d/ Blätter von alten weiblichen Pflanzen,)

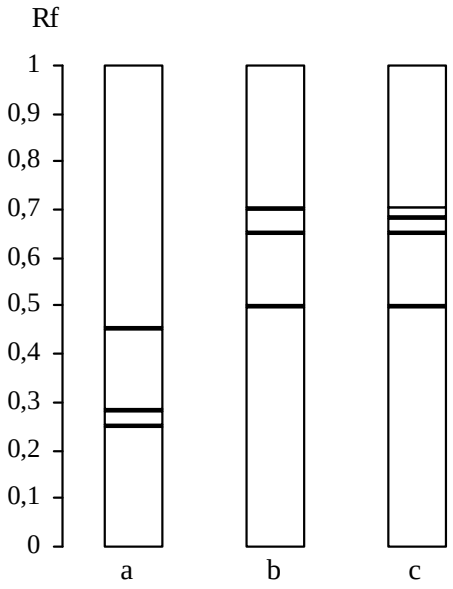

Abb. 3 Zymogramme der Phosphogluco-Mutase in Ginkgo (a/ Wurzeln von jungen Pflanzen, b/ Wurzeln von alten Pflanzen, c/ Blätter von jungen Pflanzen)

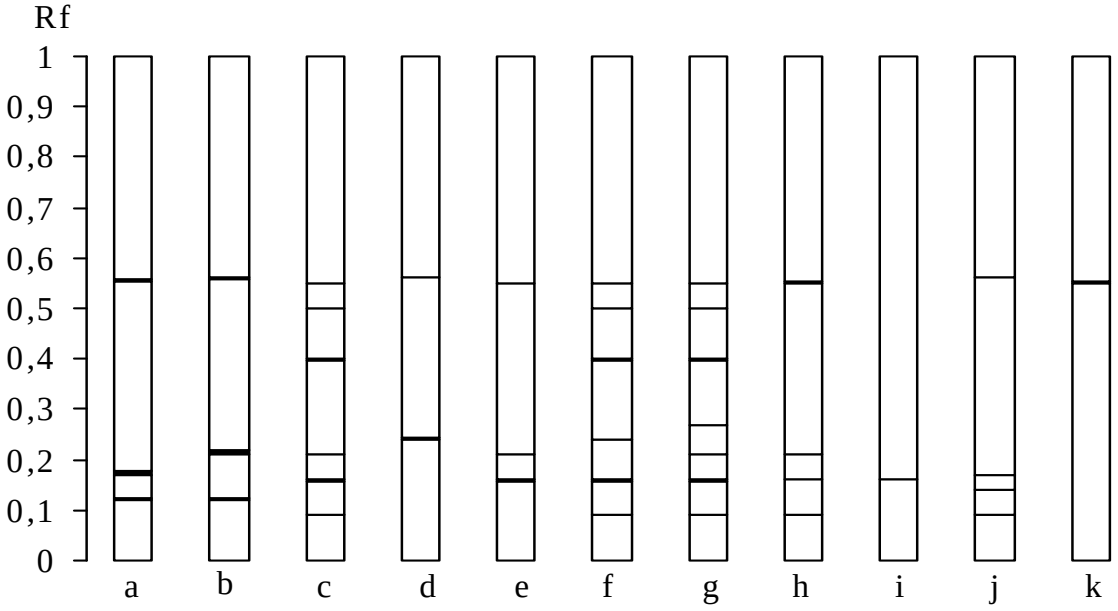

Abb. 4 Zymogramme der 6-Phosphogluco-Isomerase (a-b/ Wurzeln von jungen Pflanzen, c-f/ Wurzeln von alten weiblichen Pflanzen, g-i/ Wurzeln von alten männlichen Pflanzen, j/ Blätter von jungen Pflanzen, k/ Spitzenknospen von jungen Pflanzen)

3.6. Isoenzymanalyse durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) und Isoelektrische Fokusierung (IEF)

Nach beiden Methoden konnten sehr gut auswertbare negative Anfärbungen beobachtet werden. Die Zymogramme der Superoxid-Dismutase von Knospen alter Bäume unterschieden sich eindeutig nach dem Geschlecht. Auf Polyacrylamidgelen war bei den weiblichen Individuen nur eine Färbezone zu erkennen, bei den männlichen waren es vier; durch Isoelektrische Fokusierung zeigten sich bei den weiblichen Exemplaren eine und bei den männlichen drei Banden.

3.7. Isoenzymanalyse durch Isoelektrische Fokusierung

Peroxidase

Von jeden Pflanzenteilen konnte die Aktivität dieses Enzymes nachgewiesen werden. Ein Unterschied zwischen den Geschlechtern ergab sich aber nur bei den Wurzelextrakten. Bei den männlichen Individuen zeigten sich viel weniger Banden und die Aktivität der einzelnen Fraktionen war meistens auch kleiner.

Zwischen den Fundorten waren Unterschiede nur bei den Samen zu erkennen, die drei Zymogramme waren wesentlich anders. Zwischen den zwei- und dreikantigen Samen gab es keine Differenz.

Esterase

Bei der Esterase war die Aktivität des Enzymes (die Triebe und Knospen ausgenommen) von allen Pflanzenteilen nachzuweisen. In den Wurzeln gab es keinen Unterschied zwischen den Geschlechtern zu erkennen. Die Zymogramme der Esterase in den Blättern waren von den der anderen Pflanzenteilen ganz abweichend. Bei den im Frühling und im Sommer gesammelten Blättern war keine Differenz zwischen den Geschlechtern zu beobachten. Bei den Blättern vom Oktober ergab sich aber ein eindeutiger Unterschied zwischen den weiblichen und männlichen Bäumen in der Isoenzymaktivität.

Zwischen den Fundorten waren Unterschiede nur bei den Samen zu erkennen, die drei Zymogramme waren wesentlich anders. Die zwei- und dreikantigen Samen unterschieden sich nicht.

Neue wissenschaftliche Ergebnisse

1. In den Wurzeln und Blättern der in Hydrokultur mit Kadmium gehaltenen jungen Ginkgos erhöhte sich die Peroxidasenaktivität signifikant mit der steigenden Kadmiumkonzentration. Die Konzentrationen und die Reaktion der Pflanzen bewertet kann man sagen, dass die jungen Ginkgobäume eine sehr gute Kadmiumtoleranz aufweisen.

2. Der NaCl-Stress von verschiedener Stärke bewirkt eine signifikante Erhöhung in der Peroxidasenaktivität mit steigender Salzkonzentration. Nach den Ergebnissen ist festzustellen, dass die jungen Ginkgo-Pflanzen eine gute Salztoleranz haben.

3. Es wurde bewiesen, dass die Anzahl der Samenkanten das Geschlecht nicht verrät.

4. Nach mehrjährigen Versuchen wurde bestätigt, dass sich die Keimfähigkeit durch Samenbehandlungen (Übergießen mit kochendem Wasser oder Abschleifen) signifikant erhöhen läßt.

5. Anhand der Untersuchungen wurde festgestellt, dass das Geschlecht die Bewurzelung der Stecklinge nicht beeinflußt.

6. Zwischen der Bewurzelung der Hartholz- und Weichholz-Stecklinge ergab sich kein Unterschied, so sind beide Methoden zu der vegetativen Vermehrung von Ginkgo zu empfehlen.

7. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Gelelektrophorese für die Charakterisierung der Isoenzymstruktur verschiedener Pflanzenteile von *Ginkgo biloba* L. sehr geeignet ist. Besonders die Analysen mit der Esterase, Phosphogluco-Mutase, Glutamat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluco-Isomerase, Malat-Dehydrogenase und Superoxid-Dismutase sind perspektivisch.

8. Die Geschlechtsbestimmung von *Ginkgo biloba* L. nach den Isoenzymstrukturen ist höchstwahrscheinlich mit Hilfe von 6-Phosphogluco-Isomerase, Esterase, Peroxidase und Superoxid-Dismutase möglich.

4. Diskussion und Vorschläge

Stresstoleranz

Auf den Kadmiumstress reagierten die Wurzeln und Blätter von jungen Pflanzen in Hydrokultur anders, welche Beobachtung der von SHEORAN und GARG (1979), bzw. von SEHMER et al. (1995) entspricht. Die Stresssymptomen waren in den Blättern viel weniger zu bemerken. Das kann einerseits erklärt werden, dass die Schadwirkung die Wurzeln direkt erreichte. Andererseits können die Wurzeln das Kadmium akkummuliert haben, so gelangte es in die Blätter in wesentlich geringerer Menge. Darauf weisen nämlich Erfahrungen mit anderen Pflanzenarten hin, wo sich Kadmium nach dem Stress in den Wurzeln viel mehr anhäufte als in den Blättern (KORCAK 1989; SCHULTZ und LAMERSDORF 1989; HENDRY et al. 1992; CIESLINSKI et al. 1995; ARDUINI et al. 1996; ERDEI et al. 1998). *Man sollte deshalb die Untersuchungen zu der Wirkung von Kadmiumstress auf den Ginkgobaum mit der Messung des Kadmiumgehaltes von Wurzeln und Blättern ergänzen.* Die Akkumulation von Schwermetallen in den Pflanzen spielt eine wichtige Rolle, da durch Adsorption der Schadstoffe die Umweltverschmutzung wesentlich vermindert werden kann.

In den Untersuchungen zu der Kadmium- und Salztoleranz kann man die gleiche Tendenz sowohl in den Wurzeln als auch in den Blättern feststellen: Die Pflanze reagiert auf den zunehmenden Stress mit immer größerer Peroxidasenaktivität. Die gleiche Erfahrung machten HAWRYS (1984), NYMAN (1986), YAMANOUCHI

et al. (1987), BENDER et al. (1990), CHEN und KAO (1995), BREJ (1998) und PUCCINELLI et al. (1998) bei anderen Pflanzenarten nach Kadmiumstress, beziehungsweise SAHU und MISHRA (1987), WANG et al. (1987), CHEN et al. (1992), SHEOKAND et al. (1995), LOPEZ et al. (1996), PIQUERAS et al. (1996) und SWARAJ et al. (2000) nach Salzstress. Es sind aber auch Beobachtungen, nach denen sich die Peroxidasenaktivität nach dem Stress nicht veränderte oder eben gesunken ist (SAHOO és SAHU 1993;. OLIVEIRA et al. 1994; SEHMER et al. 1995, JAIN und GADRE 1998; SCHICKLER und CASPI 1999; MANDAL und SINGH 2000; WANG et al. 2000). Das kann damit erklärt werden, dass man die Stressreaktionen der verschiedenen Arten und Sorten nur unter gleichen Bedingungen und nach gleichen Bonitierungszeiten vergleichen kann. Die falsche Auswahl der Versuchsdauer und der Häufigkeit der Probennahme kann zu mangelhaften Beobachtungen führen. Man weißt ja, dass das Abwehrsystem der Lebewesen während des Stresses nach einer kurzen Alarmreaktion vorübergehend eine niedrigere Aktivität aufweist, nachher erhöht sich die Enzym- oder Hormonaktivität wesentlich. Die Stressreaktionen werden von der Wirksamkeit der Abwehrmechanismen abhängig nach bestimmter Zeit milder bis sie ganz verschwinden (Sterben des Lebewesens). Deshalb können auch bei der Veränderung der Peroxidasenaktivität gegensätzliche Prozesse beobachtet werden.

Die Peroxidasenaktivität in dem Normalzustand (ohne Stress) hängt auch von der Pflanzenart und –Sorte und von dem Alter der Pflanze ab (MATSCHKE 1985; LÁNG 1998; VINA et al. 1998; SREENIVASULU et al. 1999; TSUGANE et al. 1999; KOCZKA et al. 2000; ROUT et al. 2000). Den Absolutwert der Peroxidasenaktivität kann man also nur unter bestimmten Bedingungen vergleichen, die Stresstoleranz kann nach der Intensität der Stressreaktionen (nach der Abweichung von dem Normalzustand) bewertet werden.

Bei den Untersuchungen zu dem <u>Kadmiumstress</u> soll erwähnt werden, dass man in Versuchen mit anderen Pflanzenarten bei Konzentrationen von 2-1000 µM Cd^{2+}/ l schon eine signifikant höhere Peroxidasenaktivität und eine erhebliche Wachstumshemmung gefunden hat (BHANDAL und BALA 1989; BERTELS 1989; LI et al. 1992; CHEN és KAO 1995; BLINDE et al. 1996; GALLEGO et al. 1996; CHAOUI et al. 1997; JENTSCHKE 1999; KONG et al. 1999; TAHLIL et al. 1999; LESKÓ et al. 2000; LESKÓ 2001).

Die jungen Ginkgos erlitten bei den Konzentrationen 10^{-6}-10^{-5} M Cd^{2+} nur einen geringen Stress. Wenn man die Toxizität von Kadmium in Betracht zieht, kann man sehen, dass die höheren Konzantrationen in dem Versuch (10^{-4}- 1 M Cd^{2+}) eine sehr hohe Schwermetallbelastung bedeuteten, auf die die Pflanze mit signifikanter Steigerung der Peroxidasenaktivität reagierte. Die Versuchspflanzen starben nicht, sondern sie zeigten während der Untersuchung eine immer stärkere Stressreaktion. Man kann nach den Beobachtungen feststellen, dass die jungen Ginkgos gegenüber dem Kadmiumstress sehr tolerant sind.

In den Wurzeln und Blättern wurde nach <u>Salzstress</u> mit zunehmender Salzkonzentration eine signifikant höhere Peroxidasenaktivität gefunden.

Man soll betonen, dass nach der Literatur die meisten Versuche mit anderen Pflanzenarten bei niedrigeren Salzkonzenztrationen (0-225 mM NaCl) durchgeführt wurden (GOSSETT et al. 1993; SEHMER et al. 1995; SHEOKAND et al. 1995;

HURKMAN und TANAKA 1996; LOPEZ et al. 1996; PIQUERAS et al. 1996; BANKS et al. 1997; FOWLER et al. 1997; LIAO et al. 1997; ROXAS et al. 1997; COMBA et al. 1998). Von den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen war also die höchste (400 mM NaCl) besonders hoch. Die Stresssymptomen zeigten sich bei dem Ginkgo nicht einmal bei dieser Konzantration extrem.

Nach Bewertung der Stressreaktionen kann festgestellt werden, dass die jungen Ginkgopflanzen auch die Schadwirkungen von verhältnismäßig hohem Salzstress tolerieren können.

Es wird empfohlen, die Untersuchungen zu dem Kadmium- und Salzstress auch mit älteren Ginkgopflanzen durchzuführen und den Versuch mit der Analyse der Wirkung anderer Schwermetalle zu ergänzen. Die Toleranz gegenüber Schwermetallenbelastung ist eine wichtige Voraussetzung der Stadttoleranz. Durch die Bestätigung der hohen Toleranz gegenüber Umweltgiften kann man die Eignung des Ginkgobaumes zu Straßenbaum und seine potentielle Rolle in dem Umweltschutz betonen.

Untersuchungen zu der Keimung

Nach mehrjährigen Untersuchungen wurde festgestellt, dass der Fundort, die Einlesezeit der Samen, die Lagerdauer und die Lagerbedingungen eine signifikante Wirkung auf die Keimfähigkeit haben.

In jedem Versuch wiesen die Samen von dem Botanischen Garten der ELTE einen höheren Keimungsprozent auf als die der SZIE. Bei Ginkgo spielen Geschlechtsverhältnisse und Alter der Bäume eine entscheidende Rolle in den Keimprozessen (BÄRTELS 1989; DEL TREDICI 1989; DEL TREDICI 1991; MELZHEIMER 1992). In der ELTE stehen nebeneinander zwei weibliche und drei männliche Bäume in dem Alter von mindestens 200 Jahren, in der SZIE ist aber die Geschlechtsrate 1:1 und die Bäume sind auch „erst” 100 Jahre alt. Der Unterschied in der Keimfähigkeit ist also wahrscheinlich damit zu erklären.

Nach den Beobachtungen keimten die am frühesten heruntergefallenen und die erst nach dem Winter aufgelesenen Samen (62-70%). Die größte Keimfähigkeit (78-88%) zeigte sich bei Samen, die zwischen Ende November und Ende Januar gesammelt wurden. Die Klimabedingungen Ungarns in Betracht gezogen wird die Einlese am Ende November empfohlen, wenn die Samen schon in großer Menge, fast völlig heruntergefallen sind.

Es ist eine signifikante Differenz in der Keimfähigkeit zu erkennen abhängig davon, ob die Samen direkt nach der Sammlung oder erst im Frühling gesät wurden. Die im Frühling gesäten Samen keimten gleichmäßiger und in größerer Menge bei jeder Auflesezeit. Die während der Lagerung steigende Keimfähigkeit kann mit den seltsamen Befruchtungs- und Reifeverhältnissen des Ginkgobaumes und mit dem Abbau bestimmter keimungshemmenden Stoffe erklärt werden.

Die Samen verlieren ihre Keimfähigkeit nicht, wenn sie in einer Plastiktüte in dem Kühlschrank aufbewahrt werden.

Die zweikantigen Samen keimten besser und dynamischer (84%) als die dreikantigen (62%). In der Peroxidasenaktivität konnte aber kein Unterschied festgestellt werden. Außerdem kommen die Samen mit drei Kanten viel seltener vor

(nur ca.. 10 %). Nach diesen Beobachtungen widerlegt der Autor die Aussage von MELZHEIMER (1992), nach der die Anzahl der Samenkanten das Geschlecht verrate.

Der Ginkgobaum wird in Ungarn meistens generativ vermehrt. Die Keimung von Ginkgo wurde bereits mehrmals untersucht, aber Vergleichsversuche mit Samenbehandlungen wurden zum ersten Mal in dieser Arbeit durchgeführt.

Nach den mehrjährigen Erfahrungen ist die Keimfähigkeit nach Übergießen der Samen mit kochendem Wasser viel besser (1.3-1.6x). Die gleiche Beobachtung machte BÄRTELS (1989). Auch das mechanische Schleifen fördert die Keimung der Samen (1.2-1.6x). Durch physische Samenbehandlungen kann also eine signifikant bessere Keimfähigkeit erzielt werden.

Die biochemische Analyse der Stressreaktionen nach der Samenbehandlung und die Erfahrungen der Keimversuche stimmten überein, sodass die Wirkung der Behandlungen durch die Peroxidasenaktivität gut zu charakterieseren ist. Die Samen mit größerer Keimfähigkeit wiesen eine wesentlich höhere Peroxidasenaktivität (2.2-2.7x) auf. Die Samenbehandlung löst also eine Stressreaktion in dem Samen aus. Die höhere Aktivität, der „Bereitschaftszustand" fördert den Keimprozess. Die harte Außenschicht der Samen wird durch Abschleifen dünner und nach der Wärmebehandlung weicher, welche die Spaltung der Schale ermöglichen.

Die Samenbehandlungen (Abschleifen, Abgießen) sind sehr einfach durchzuführen, ihre Wirkung ist sehr günstig zu der Förderung der Keimung, deshalb werden sie besonders empfohlen.

Vermehrung durch Stecklinge

In den Versuchsreihen wurde eine Bewurzelungsrate von 57-68 % bei den unbehandelten Stecklingen gefunden. Die Hormonbehandlung (Hartholz-Stecklinge: 2000 mg/l IVS, 1000 mg/l NES, 20 v/v % DMSO; Weichholz-Stecklinge: 1000 mg/l IVS, 500 mg/l NES, 20 v/v % DMSO) förderte jedes Mal die Bewurzelung der Stecklinge. Die hormonbehandelten Stecklinge wiesen eine Bewurzelung von 77-86 % auf. Diese Beobachtung unterstützen auch andere Wissenschaftler (DIRR és HEUSER 1987; BÄRTELS 1989; DEL TREDICI 1991; HUH und STABA 1992; HAN et al. 1996; CAI et al. 1998; LI et al. 1998). Der Ginkgobaum läßt sich also durch Stecklinge gut vermehren.

Ein interessantes Merkmal für diese Pflanzenart, dass auch alte (8-10jährige) Äste eine starke Bewurzelung aufweisen. Das gleiche beobachteten DIRR und HEUSER (1987). Das ist sehr bemerkenswert, da meistens die juvenalen Pflanzenteile eine stärkere Bewurzelungskraft besitzen (HARTMANN et al. 1990; SCHMIDT 1995).

In den Untersuchungen gab es keinen Unterschied in der Bewurzelungsrate von den Hartholz- und den Weichholz-Stecklingen, beide sind also gut für vegetative Vermehrung von Ginkgo zu verwenden.

Zwischen der Bewurzelung der weiblichen und männlichen Stecklingen ist kein Unterschied zu erkennen, das Geschlecht der Mutterpflanze spielt also keine Rolle.

Es wurde beobachtet, dass die Bewurzelungsintensität am meistens von der ursprünglichen Position der Stecklinge bestimmt wird. Die Basis-Stecklinge wiesen in jedem Versuch eine stärkere Bewurzelung auf (1.3-2.6x) als die Spitzen-Stecklinge. Das entspricht den Beschreibungen der Fachliteratur (DIRR 1983; BÄRTELS 1989).

Für die Vermehrung sollte man also Basis-Stecklinge verwenden und die Bewurzelungsintensität kann man durch Hormonbehandlung wesentlich fördern.

Isoenzymanalysen durch Gelelektrophorese

Die Malat-Dehydrogenase zeigte eine besonders gute Anfärbung. Von dem in den Vorversuchen gefundenen Zymogramm mit drei verschwommenen Banden läßt sich darauf schließen, dass *durch eine spezifische Isolierung die komplexe Isoenzymstruktur der MDH zu bestimmen ist.*

Die Analyse mit der Glutamat-Dehydrogenase brachte auch vielversprechende Ergebnisse. Bei den Blätterextrakten gab es Unterschied zwischen den Geschlechtern. *Weitere Untersuchungen mit der GDH werden deshalb besonders empfohlen.*

Die Phosphogluco-Mutase ließ sich intensiv anfärben, die breiten Färbezonen fassen wahrscheinlich mehrere Banden in sich. Obwohl sich kein Unterschied unter den jungen Individuen ergab, *werden weitere Untersuchungen epfohlen*, um die völlige Isoenzymstruktur der PGM zu bestimmen.

Bei den Wurzelextrakten der jungen Pflanzen waren zwei unterschiedliche Zymogramme der 6-Phosphogluco-Isomerase in einem Verhältnis von 1:1 zu erkennen. *Anhand dieser Beobachtung nimmt man vor, dass durch Analyse dieses Enzymes die frühzeitige Geschlechtsbestimmumg (vor dem Erscheinen der Blüte) möglich ist. Das benötigt natürlich weitere Untersuchungen über mehrere Jahre, die Durchführung dieser Versuche wird einer Forschungsgruppe unbedingt empfohlen.*

Die Isoenzymstrukturen der Superoxid-Dizmutase von den Knospen unterschieden sich nach dem Geschlecht der Bäume. Die gefundenen Unterschiede sind eigentlich nur eine Differenz in der Aktivität der Isoenzyme, die männlichen und weiblichen Bäume haben nämlich einen anderen physiologischen Dynamismus (die männlichen blühen im Frühling früher und verlieren ihre Bätter im Herbst vor den weiblichen Individuen). Eine Geschlechtsbestimmung mittels der Superoxid-Dismutase ist also durch Analyse der Knospen in der Ruheperiod möglich.

Bei der Analyse der Peroxidase in den Wurzelextrakten ergab sich ein Unterschied zwischen den Geschlechtern sowohl in der Anzahl als auch in der Aktivität der Isoenzyme. Man kann also das Geschlecht der Ginkgobäume durch Untersuchung der Peroxidasenisoenzymstruktur von den Wurzeln bestimmen.

Bei der Esterase in den Wurzeln war ein Unterschied in der Aktivität der Isoenzyme von männlichen und weiblichen Individuen zu erkennen.

Die Erfahrungen zusammengefasst kann festgestellt werden, dass die Gelelektrophorese zu der Bestimmung der Isoenzymstrukturen der verschiedenen Pflanzenteile von *Ginkgo biloba* L. besonders geeignet ist. Ein wichtiger Vorteil der Gelelektrophorese ist, dass die Methode einfach und preisgünstig ist. Für die Analysen wird nur eine geringe Probenmenge gebraucht. *Für den Nachweis genetischer Unterschiede besonders perspektivisch sind die Analysen der Malat-Dehydrogenase, Glutamat-Dehydrogenase, Phosphogluco-Mutase und 6-Phosphogluco-Isomerase. Die Analysen der 6-Phosphogluco-Isomerase, Superoxid-Dismutase, Peroxidase und Esterase werden für die Geschlechtsbestimmung sehr empfohlen.*

Die Versuche der vorliegenden Dissertation waren erfolgreich, erbrachten aber natürlich neue Fragen und Aspekte, nach denen die Arbeit weiterzuführen ist.

5. Publikationen des Autors zu dem Thema der Dissertation

1. **Koczka N.** - Stefanovitsné Bányai É.: Esterase and peroxidase isozyme patterns of *Ginkgo biloba* L. from Hungarian area. I. International Meeting of Young Scientist in Horticulture. Proceedings, Lednice, 1998. 52.

2. **Koczka N.** - Kiss M. - Stefanovitsné Bányai É.: A *Ginkgo biloba* L. peroxidáz izoenzimei. [Isoenzyme der Peroxidase von *Ginkgo biloba* L.] Lippay János és Vas Károly Tudományos Ülésszak Összefoglalói, Budapest, 1998. 140-141.

3. **Koczka N.** - Stefanovitsné Bányai É.: A ginkgófa (*Ginkgo biloba* L.) botanikája. [Botanik des Ginkgobaumes (*Ginkgo biloba* L.)] Olaj Szappan Kozmetika, Budapest. 1998. 47 (5): 229-232.

4. **Koczka N.** - Stefanovitsné Bányai É.: A *Ginkgo biloba* L. ökológiai igényei és termesztése. [Klimaansprüche und Produktion von *Ginkgo biloba* L.] Olaj Szappan Kozmetika, Budapest. 47 (6): 275-277.

5. **Koczka N.** - Stefanovitsné Bányai É.: A ginkgófa (*Ginkgo biloba* L.) felhasználása. [Anwendung vom Ginkgobaum (*Ginkgo biloba* L.)] Olaj Szappan Kozmetika, Budapest. 1999. 48 (1): 14-16.

6. Stefanovitsné Bányai É. - **Koczka N.**: A *Ginkgo biloba* L. ivari elkülönítésének lehetősége. [Möglichkeit der Geschlechtsbestimmung von *Ginkgo biloba* L.] Olaj Szappan Kozmetika, Budapest. 1999. 48 (2): 64-67.

7. Stefanovits- Bányai, É. - **Koczka, N.** - Orlóci, L.: Charakterization of *Ginkgo biloba* L. by Isoelectric Focusing. Horticulture Plant Breeding to start with XXI century. Lublin, 1999. Proceedings 587-590.

8. **Koczka N.**: A ginkgófa (*Ginkgo biloba* L.) a környezetvédelemben. [Der Ginkgobaum (*Ginkgo biloba* L.) in dem Umweltschutz] V. Ifjúsági Tudományos Fórum. Konferencia Kiadvány, Keszthely. 1999. 93-97.

9. Szabó L. – **Koczka N.**: A ginkgófa. [Der Gingkobaum] Élet és Tudomány, Budapest. 1999. 54 (38): 1193-1195**.**

10. **Koczka N.** – Orlóci L. – Tölgyesi A. – Ferenczy A. Z.: Fizikai magkezelések hatása a *Ginkgo biloba* L. csírázására. [Wirkung von Samenbehandlungen auf die Keimung von *Ginkgo biloba* L.] Kertgazdaság, Budapest. 1999. 31 (4): 8-12.

11. Stefanovits-Bányai, É. - **Koczka, N.** - Orlóci, L.: Esterase and Peroxidase Isozyme Patterns of *Ginkgo biloba* L. from Botanical Garden. Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem Közleményei, Budapest. 1999. (vol. 59) 37-41.

12. **Koczka, N.** - Orlóci, L.: Möglichkeit der autovegetativen Vermehrung von *Ginkgo biloba* L. Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem Közleményei, Budapest. 1999 (vol. 59) 32-36.

13. **Koczka N.**: A ginkgófa szerepe a környezetvédelemben. [Rolle des Ginkgobaumes in dem Umweltschutz] Erdészeti Lapok, 2000 (135) : 112.

14. **Koczka,** N. – Stefanovits-Bányai, É. – Dimény, J. – Orlóci, L.: Salt tolerance of *Ginkgo biloba* L. 12th FESSP Congress. Budapest, 2000. August 21-25. Proceeding. 194.

15. **Koczka, N.** – Orlóci, L. – Ferenczy, A. Z. – Stefanovits-Bányai, É. – Dimény, J.: Effect of physical treatments on germination of *Ginkgo biloba* L. International Journal of Horticultural Science vol. 6(4).2000 :31-34.

16. **Koczka,** N. – Orlóci, L. – Dimény, J. – Stefanovits- Bányai, É.: Effect of cadmium stress on peroxidase activity of *Ginkgo biloba* L. IX. International Trace Microelement Symposium, Budapest, 2000. Proceedings. 159-165.

17. **Koczka N.** – Pogány M. – Dimény J. – Stefanovitsné Bányai É.: A *Ginkgo biloba* L. szuperoxid-dizmutáz izoenzimei. [Isoenzyme der Superoxid-Dismutase von *Ginkgo biloba* L.] Lippay János és Vas Károly Tudományos Ülésszak Összefoglalói, Budapest, 2000. 210-211.

18. **Koczka N.** – Orlóci L. – Dimény J. – Stefanovitsné Bányai É.: A *Ginkgo biloba* L. kadmiumtűrése. [Kadmiumtoleranz von *Ginkgo biloba* L.] Lippay János és Vas Károly Tudományos Ülésszak Összefoglalói, Budapest, 2000. 88-89.

19. **Koczka N.** – Stefanovitsné Bányai É. – Kosáry J.: A ginkgófa (*Ginkgo biloba* L.) lipoxigenázainak vizsgálata. [Untersuchungen von Lypoxigenasen von dem Ginkgobaum (*Ginkgo biloba* L.)] Lippay János és Vas Károly Tudományos Ülésszak Összefoglalói, Budapest, 2000. 208-209.

20. Stefanovitsné Bányai É. – Kiss A.S. – Szőllősi Varga I. - **Koczka N.**.: Előzetes vizsgálatok a *Ginkgo biloba* L. levelének elemösszetételéről. [Untersuchungen zu der Elementenzusammensetzung von *Ginkgo biloba* L.] 7. Magyar Magnézium Szimpózium, Siófok. Összefoglalók. 2001. 49-50.

21. **Koczka, N.** – Stefanovits-Bányai, É.: Preliminary studies on charakterisation of some isozymes of *Ginkgo biloba* L. by gelelectrophoresis. World Conference of Medicinal and Aromatic Plants, Budapest. Proceedings. 2001. 168.