

For comparison, callus cultures of rape were established and grown on the Revised Tobacco Medium<sup>3,4</sup> which contains less sucrose (only 30 g/l) than the medium specified in the Table and lacks casein hydrolyzate, yeast extract and kinetin.

## Results and Discussion

It was found that by elevating the sucrose content of the medium and by supplementing it with natural products such as coconut milk, casein hydrolyzate, yeast extract and kinetin, the growth of rape tissue cultures increased significantly. The growth index values of such cultures on the new medium ranged between G. I. 12 and G. I. 15. About 250 cultures of rape were successfully established on this medium without any case of failure regarding callus development. In contrast, the growth index of callus cultures grown on the R. T.-medium did not exceed G. I. 1.8. About 20% of the seedlings ceased to grow on this medium and did not develop into callus.

It is apparent that rape tissue cultures are to be considered among those plant tissue cultures which have the most complicated nutritional requirements.

The pre-incubation of the seedlings for 24—48 hours on the nutritional medium in Petri dishes, before being finally inoculated is a useful modification in the tissue culture technique, which has not, so far, been described by earlier investigators. This step serves the sterility testing of the individual seedlings prior to final inoculation. It is made use of the fact that the growth of contaminating microorganisms is much faster on the nutritional media than that of the plant tissues. Infected seedlings thus become surrounded by microbial growth zones on agar after 1 to 2 days of incubation at 30°C, this zone being visible to the unaided eye. Prolonged incubation should be avoided, since the microbial zone soon spreads on the agar medium and infects the sterile seedlings. Considering that as many as 20 to 30 seedlings can be tested for sterility in a single Petri dish containing only 15—20 ml medium, it becomes obvious how useful this simple modification can be in saving time and equipment.

Financial support by the "Alexander von Humboldt-Stiftung" is gratefully acknowledged.

Received 2<sup>nd</sup> September 1974.

## Studien über die Wirkung von 2-Chlortrimethylammoniumchlorid (CCC) in der Weizenpflanze\*

Von W. Seibel, W. Nierle und A. W. El Bayá\*\*

Aus der Bundesforschungsanstalt für Getreideverarbeitung, Detmold

Im Feldversuch wurde C-14 Chlorcholinchlorid Weizenpflanzen appliziert und dessen Schicksal während der Kornreife untersucht. Radioaktivität wurde teilweise im Lecithin und Lysolecithin gefunden. Daneben fand sich auch radioaktives Cholin. Anhand von Keimungsversuchen wurde gezeigt, daß CCC zwar eine Erhöhung der Chlorophyllmenge bewirkt, sonst aber keinen Einfluß auf die Bildung von  $\beta$ -Carotin, Lutein, Lutein-epoxid, Violaxanthin und Neoxanthin sowie Galaktosyldiglyceriden und Phosphatiden hat. Somit kann eine Beeinflussung der Photosynthese durch CCC in den frühen Stadien des Pflanzenwachstums ausgeschlossen werden.

Aus der Vielzahl von natürlichen und künstlichen pflanzlichen Wuchsstoffen und Wachstumsregulatoren hat sich das 2-Chlortrimethylammoniumchlorid (CCC) als synthetischer Wachstumsregulator im Getreidebau in den letzten Jahren immer mehr durchgesetzt. Besonders beim Weizenanbau bewirkt es bei den meisten Sorten eine starke Halmverkürzung, die ihrerseits zu einer Verbesserung der Standfestigkeit des reifen Getreides führt, so daß mehrere Düngergaben zur Erreichung höherer Erträge ermöglicht werden. Während man heute sehr genau weiß, welche Veränderungen im Habitus der Pflanze durch CCC-Behandlung hervorgerufen werden können, herrscht über den inneren Mechanismus, der diese Veränderungen hervorruft, noch Unklarheit. Darüber hinaus

### Studies on the Action of 2-Chlorotrimethyl Ammoniumchloride (CCC) on the Wheat Plant

In field trials C-14 chlorocholinechloride was applied to wheat plants and its fate was studied during ripening of wheat. Radioactivity was found partly in lecithin and lysolecithin. In addition, radioactive choline was found. Based on germination studies, it was shown that CCC increases the amount of chlorophyll, however it has no influence on the formation of  $\beta$ -carotene, lutein, luteinepoxide, violaxanthine and neoxanthine as well as galactosyl diglycerides and phosphatides. Therefore, in the early stages of plant growth CCC does not appear to influence the photosynthesis.

ist auch nur sehr wenig über das Schicksal des mit dem Cholin chemisch verwandten Tetraalkyl-Ammoniumsalzes in der höheren Pflanze bekannt.

Zu dem in der vorliegenden Arbeit behandelten Thema finden sich sehr widersprüchliche Angaben in der Literatur. Keinerlei Abbau von CCC beobachteten *H. Bier* und *H. Faust*<sup>1</sup>, während *J. Jung* und *M. M. El Fouly*<sup>2</sup> von einem starken Abbau zu Cholin und Betain berichten. *E. T. Schneider* et al.<sup>3</sup> beobachteten an Getreidekeimpflanzen einen starken Abbau von CCC zu Cholin. Dies wird von *H. Bergmann*<sup>4</sup> dadurch erklärt, daß in Getreidekeimpflanzen besonders bei hohen Wirkstoffkonzentrationen Enzyme frei werden können, die einen Abbau ermöglichen.

\* Vortrag anlässlich der DGF-Vortragstagung in Berlin am 1. Oktober 1973.

\*\* Anschrift der Verfasser: Prof. Dr. W. Seibel, Dr. W. Nierle und Dr. A. W. El Bayá, Bundesforschungsanstalt für Getreideverarbeitung, 493 Detmold, Schützenberg 12.

<sup>1</sup> *H. Bier* u. *H. Faust*, Wiss. Z. d. Univ. Rostock, math.-naturwiss. R. 687 [1967].

<sup>2</sup> *J. Jung* u. *M. M. El Fouly*, Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 114, 128 [1966].

<sup>3</sup> *E. T. Schneider* et al., Canad. J. Biochem. 45, 395 [1967].

<sup>4</sup> *H. Bergmann*, Dissertation, S. 6, Universität Jena, 1970.

Mit markiertem CCC konnten wir<sup>5</sup> dagegen im Keimungsstadium der Entwicklung keinerlei Hinweise auf einen CCC-Abbau erhalten.

Bei der Untersuchung dieser Fragen ist es sicherlich von Interesse, ob Pflanzenhormone wie CCC einen Einfluß auf die Bestandteile der Chloroplasten wie Galaktosyldiglyceride, Phospholipide und Plastidenpigmente haben, denen in der vegetativen Phase der Pflanze eine besondere Bedeutung zukommt.

#### Material und Methodik

Zur Untersuchung gelangte die Weizensorte Kolibri, wobei entsprechend der Bestimmung der Keimfähigkeit die jungen Pflanzen in Petrischalen mit destilliertem Wasser bzw. 0.1%igen Lösungen von Gibberilinsäure, Indolessigsäure und Chlorcholinchlorid begossen wurden. Die Pflanzen wuchsen unter künstlicher Beleuchtung in einer Wachstumskammer auf. An dieser Stelle sei besonders darauf hingewiesen, daß wir für diese Versuche eine besondere Wachstumsperiode ausgesucht haben, die uns wegen der vereinfachten Versuchsdurchführung besonders geeignet erschien. Die Applizierung von CCC erfolgt in der Praxis nicht in der Keimungsphase. In der Landwirtschaft wird das CCC den Weizenpflanzen nach der Bestockung bei einer Größe von ca. 20 bis 25 cm durch Aufsprühen appliziert, so daß in erster Linie eine Aufnahme über die Blätter stattfindet.

Nach 12 Tagen erfolgte die Extraktion der Lipide aus den grünen Pflanzen mit heißem Isopropanol und anschließend mit einem Gemisch von Chloroform und Methanol. Die Glycerolipide wurden dünnschichtchromatographisch (1. Chloroform/Methanol/Wasser für die Phospholipide und 2. Chloroform/Methanol/Essigsäure für die Galaktolipide) durch Sprühreagenzien und anhand von Vergleichssubstanzen identifiziert<sup>6,7</sup>.

Die Chlorophylle wurden nach der Methode von R. Ziegler und R. Egle<sup>8</sup> in 80%igem Aceton quantitativ adsorptionsphotometrisch gemessen. Zur Untersuchung der Plastidenpigmente wurden die Pflanzenorgane in einem Küchenmixer mit Aceton extrahiert und die Pigmente in Petroläther aufgenommen. Danach erfolgte eine dünnschichtchromatographische Auftrennung nach den bewährten Methoden von A. Hager<sup>9</sup> sowie K. Egger und A. G. Dabbagh<sup>10</sup>.

#### Einfluß des CCC auf die Blattbestandteile

Da Indolessigsäure und Gibberilinsäure im Getreideanbau keine Verwendung finden, soll in der vorliegenden Arbeit nur auf den Einfluß von CCC auf die Pigmente und die Lipidausstattung des Blattes eingegangen werden. In den mit CCC behandelten Blättern wurde ein deutlich höherer Chlorophyllgehalt im Vergleich zu den normalen Blättern gemessen. Der Anstieg im Chlorophyllgehalt war mit einer merklichen Zunahme an Carotinoiden verbunden. Weiterhin wurde festgestellt, daß durch CCC-Einwirkung der Galaktolipidspiegel parallel zum Chlorophyll- und Pigmentgehalt ansteigt. Es

muß deshalb vermutet werden, daß der exogene Bioregulator CCC die Photosynthese in den Blättern zu intensivieren vermag. I. K. Gray und Mitarb.<sup>11</sup> haben auf einen Zusammenhang zwischen der Chlorophyll- und Galaktosyldiglyceridsynthese in Abhängigkeit von der Lichtintensität in der Pflanze hingewiesen. Er vermutet, daß die Lichtintensität den Chlorophyllgehalt und die typischen Chloroplasten-Glykolipide beeinflusst. Auf Grund unserer eigenen Befunde übt das CCC einen lichtunabhängigen Einfluß auf die Chlorophyll- und Chloroplastenlipide aus, da alle Pflanzen unter denselben Bedingungen aufwuchsen. Der naheliegende Schluß, daß durch die Intensivierung der Photosynthese eine Erhöhung der Stoffproduktion bewirkt wird, d. h. daß dann auch bei Weizen nach CCC-Behandlung ein erhöhter Ertrag zu erwarten wäre, wird in der Tat in der landwirtschaftlichen Praxis beobachtet<sup>12</sup>.

Im Gegensatz dazu wird durch den Befall mit Beulenbrand, der nach O. Abousteit<sup>13</sup> die Chlorophyllsynthese unterbindet und den Stoffwechsel der Lipide verändert, eine Ertragserniedrigung hervorgerufen. Diese Tatsache bedeutet eine zusätzliche Bestätigung der ertragsteigernden Wirkung durch die Intensivierung der Photosynthese nach der CCC-Behandlung.

#### Das Schicksal von CCC in der Weizenpflanze

Nachstehend soll auf das Schicksal des der Pflanze applizierten CCC eingegangen werden. Die verbreitete Anwendung dieser nicht natürlich vorkommenden Verbindung im Weizenanbau und gewisse toxikologische Bedenken werfen die berechnete Frage über ihren Verbleib im Nahrungsmittel „Getreide“ auf. In früheren eigenen Versuchen konnte gezeigt werden, daß entgegen mancher widersprüchlicher Angaben in der Literatur im reifen Getreidekorn Rückstände von CCC vorhanden sind. Diese Untersuchungen gaben jedoch noch keine Auskunft darüber, ob das auf die Pflanze aufgebrachte CCC ohne Abbau in der Pflanze quantitativ verbleibt oder ob ein Umbau in die cholinhaltigen Lipidklassen erfolgt.

Wenn die eingangs erwähnten Literaturangaben über einen Abbau des CCC zu Cholin und Betain zutreffen und die von S. Sherr und C. Byk<sup>14</sup> gemachten Feststellungen, daß Cholin in *Neurospora crassa* 47 904 direkt zu Phosphatidylcholin umgelagert wird, auch für die höhere Pflanze gelten, muß die Pflanze einmal in der Lage sein, das an den Kohlenstoff fest gebundene Chloratom des Chlorcholinchlorides durch eine Hydroxylgruppe zu substituieren und zum anderen müssen cholinhaltige Verbindungen im Stoffwechsellpool aufgefunden werden.

Zur Durchführung dieser Versuche besprühten wir Weizenpflanzen der Sorte Kolibri in einem Gefäßversuch, wie in der Praxis üblich, vor der Bestockung mit Chlorcholinchlorid (1,2/C14) markiert (spezifische Aktivität 4.81 M Ci n M) und überließen das Gefäß in einem Weizenfeld den normalen Witterungsbedingungen bis zur Ernte. Das markierte Chlorcholinchlorid wurde trägerfrei in der in der Praxis angewandten Konzentration

<sup>5</sup> W. Nierle, Jahresbericht 1972 „Forschung im Geschäftsbereich des Bundesministers für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten“.

<sup>6</sup> H. Wagner, Fette · Seifen · Anstrichmittel **63**, 1119 [1961].

<sup>7</sup> Y. Hamza, Dissertation, Universität Münster, 1968.

<sup>8</sup> R. Ziegler u. R. Egle, Beitr. Biol. Pflanzen **41**, 11 [1965].

<sup>9</sup> A. Hager u. T. Meyer-Bertenrath, Planta **69**, 198 [1966].

<sup>10</sup> K. Egger u. A. G. Dabbagh, persönliche Mitteilung.

<sup>11</sup> I. K. Gray, M. G. Rumsby u. J. C. Hawke, Phytochemistry **6**, 107 [1967].

<sup>12</sup> H. Brandenburger, Bericht über die Getreide-Tagung 1971, Granum-Verlag, Detmold.

<sup>13</sup> O. Abousteit, unveröffentlichte Versuche.

<sup>14</sup> S. Sherr u. C. Byk, Biochim. biophysica Acta **239**, 243 [1971].

(1 kg pro Hektar umgerechnet) appliziert. Durch dünn-schichtchromatographische Reinheitsprüfung konnte die Anwesenheit von labilem Cholin ausgeschlossen werden. Durch ungünstige Witterungsverhältnisse und starke Verunkrautung des Feldes ließen sich leider nur sehr wenig Ähren ernten, die darüber hinaus noch im Laboratorium notreifen mußten. Die Lipide der fein zermahlene Körner wurden mit Butanol/Wasser unter Rückfluß extrahiert, die nicht lipidartigen Substanzen nach der Methode von *D. Folch*<sup>15</sup> abgetrennt und ihrerseits getrennt untersucht. Der qualitative Nachweis der Radioaktivität erfolgte mittels Autoradiographie.

Während die Hauptmenge der im Korn nachweisbaren Radioaktivität (ca. 90 %) in der wäßrigen bzw. methanolischen Phase des Extraktes zu finden war und neben CCC und Cholin aus mehreren teilweise aminostickstoffhaltigen, d. h. Ninhydrinpositiven Verbindungen besteht, findet sich die restliche Aktivität im Lipidextrakt auf



Lecithin (radioaktiv)  
Lysokephalin  
Lysolecithin (radioaktiv)

Abb. 1. Dünnschichtchromatogramm der Weizenlipide  
Trennschicht: Kieselgel G; Laufmittel: Chloroform : Methanol : Wasser = 65 : 25 : 4; Sprühreagenz: Molybdänsäure-Reagenz nach *Dittmar* und *Lester*

Lecithin und Lysolecithin verteilt (Abb. 1). Daneben wurde eine noch nicht näher identifizierte Fraktion mit höherem Rf-Wert gefunden. Da letztere in ihrer Aktivitätsmenge unbedeutend klein war, ergab sich ein Aktivitätsverhältnis

$$\frac{\text{Lysolecithin}}{\text{Lecithin}} \frac{451}{195} \text{ JpM} = 2.31$$

Dieses Zahlenverhältnis bestätigt die Ergebnisse früherer Untersuchungen über die Biosynthese des Lysolecithins aus dem Lecithin während des Reifeprozesses und ist gleichzeitig ein Beweis dafür, daß sich aus dem CCC gebildetes Cholin im Stoffwechsel ohne Einschränkung ebenso verhält wie von der Pflanze synthetisiertes. Andererseits ist es aber auch eine Bestätigung für den mangelhaften Reifezustand des Weizens (Tabelle und Abb. 2).

<sup>15</sup> *D. Folch, M. Lees u. G. H. Sloane Stanley, J. biol. Chemistry* **226**, 497 [1957].

### Veränderung der cholinhaltigen Lipide in Abhängigkeit vom Wassergehalt während der Reifung des Weizens

Wassergehalt [%]	Phospholipide [%], bezogen auf Gesamtlipide		Verhältnis Lysolecithin/Lecithin
	Lysolecithin	Lecithin	
68.8	5.5	23.5	0.23
55	10.6	12.3	0.87
47	16.2	14.4	1.13
34.6	9.6	4.8	2.0
23.4	13.6	5.1	2.7
20.6	18.8	6	3.1
16.5	14.5	2.8	5.2

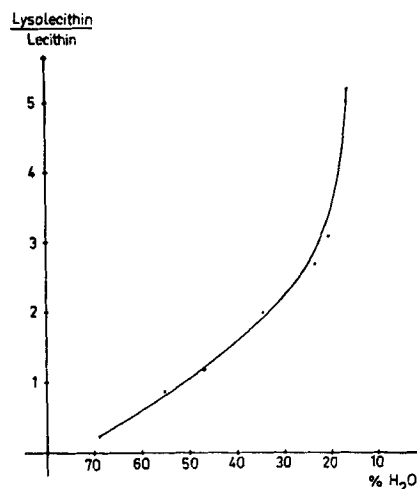


Abb. 2. Verhältnis Lysolecithin/Lecithin in Abhängigkeit vom Wassergehalt während der Reifung des Weizens

### Diskussion

Der Nachweis von radioaktivem Lecithin und Lysolecithin neben radioaktivem Cholin in Pflanzen nach Behandlung mit markiertem Chlorcholinchlorid läßt den

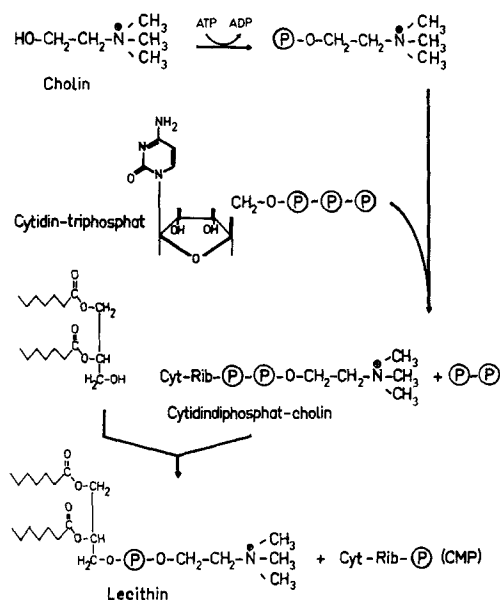


Abb. 3. Biosynthese der Glycerinphosphatide

von E. P. Kennedy et al.<sup>16</sup> und M. R. Steiner et al.<sup>17</sup> vorgeschlagenen Biosyntheseweg für Phosphatidylcholin in *Saccharomyces cerevisiae* auch für die höheren Pflanzen gültig erscheinen. Danach wird Phosphatidylcholin aus CDP-Cholin und Diglyceriden gebildet (Abb. 3). Ausgehend von dieser Annahme und unter Beachtung unserer Versuchsergebnisse, besonders aber durch den Nachweis von erheblichen Mengen an radioaktivem Cholin muß geschlossen werden, daß die Pflanze in der Lage ist, die feste Bindung zwischen dem Chlor- und dem Kohlenstoffatom im CCC zu spalten. Die von H. Müller<sup>18</sup> beobachtete Abnahme des CCC-Gehaltes in behandeltem Blumenkohl in Abhängigkeit von der Kopfgröße dürfte

<sup>16</sup> E. P. Kennedy u. S. B. Weiss, *Biol. Chem.* 222 [1956].

<sup>17</sup> M. R. Steiner u. R. L. Lester, *Biochim. biophysica Acta* 260, 222 [1972].

<sup>18</sup> H. Müller, *Qualitas Plantarum Mater. vegetabiles* XXII, 65 [1972].

unseres Erachtens nicht mit einer „Verdünnung“ erklärt werden, sondern wird auf der Beteiligung des CCC an der Bildung cholinhaltiger Lipidklassen beruhen. Möglicherweise reagiert auch Adenosintri-phosphat mit CCC unmittelbar unter Abspaltung von Chlor zum Monophosphorsäureester des Cholins. Dann könnte die wachstumshemmende Wirkung des CCC auch dadurch begründet sein, daß in der Zelle durch pH-Wert-Veränderung eine Blockierung gewisser Enzymsysteme hervorgerufen wird. Der Cholinester seinerseits könnte dann durch teilweise Übertragung seine Phosphorsäure verlieren und zum Cholin umgewandelt werden, das nun im Stoffwech-sel-pool zur Bildung von Phosphatidylcholin zur Verfügung steht. Dadurch wäre das Vorhandensein von aktivem Cholin sowie dessen normales Verhalten in der Pflanze leicht erklärbar.

Eingegangen am 10. Dezember 1973.

## Die Weiterentwicklung der Codex Alimentarius Standards für Öle und Fette

Von H. Wessels\*

Aus der Bundesanstalt für Fettforschung, Münster/Westf.

Es wird über die Weiterentwicklung der Codex Alimentarius Standards für Öle und Fette berichtet, über die auf der 7. Sitzung des Codex Komitees in London beraten wurde. Erörtert wurden u. a. Grenzwerte für die Fettsäurezusammensetzung der einzelnen Öle und Fette, das Problem der Lösungsmittelrückstände sowie die Frage der Entwicklung neuer Standards für erucasäurearmes Rüböl, für kalorienreduzierte Streichfette (low calorie spreads) sowie für Cocos-, Palm- und Palmkernöl. Schon jetzt ist erkennbar, daß die bereits verabschiedeten Recommended Standards sowohl die entsprechenden Harmonisierungsarbeiten in der Europäischen Gemeinschaft als auch die internationale Entwicklung des einschlägigen Lebensmittelrechts wesentlich beeinflussen.

Über die in Zusammenarbeit von Food and Agricultural Organisation (FAO) und World Health Organisation (WHO) entwickelten Codex Alimentarius Standards für Öle und Fette, die zum großen Teil bereits als Recommended Standards vorliegen, wurde bereits früher berichtet<sup>1</sup>. Über die Weiterentwicklung dieser Standards sowie über die Entwicklung neuer Standards für andere Fette und Fettprodukte wurde auf der 7. Sitzung des Codex Komitees für Öle und Fette vom 25.—29. März 1974 in London beraten, an der Vertreter von 35 Ländern sowie verschiedener internationaler Organisationen teilnahmen.

Angestrebt wird von der FAO/WHO zum Schutze des Verbrauchers und zur Förderung des internationalen Handels eine weltweite Anerkennung der Standards und damit eine Einbeziehung der Standards in das jeweils geltende Lebensmittelrecht der einzelnen Mitgliedsländer.

\* Anschrift des Verfassers: Dr. H. Wessels, Direktor und Professor an der Bundesanstalt für Fettforschung, 4400 Münster/Westf., Piusallee 76.

<sup>1</sup> H. Wessels, *Fette · Seifen · Anstrichmittel* 73, 293 [1971], 73, 443 [1971], 73, 591 [1971].

### Further Development of Codex Alimentarius Standards for Oils and Fats

Further development of Codex Alimentarius standards for oils and fats, which was discussed at the 7th meeting of the Codex Committee in London, is reported. Limits of fatty acid composition of individual oils and fats, problems of solvent residues as well as the development of new standards for low-calorie rapeseed oil, low-calorie spreads, coconut oil, palm oil and palm kernel oil were discussed at the above meeting. It has already been realized that the Recommended Standards have a significant impact both on harmonization work within the European Community and international development of food legislation.

Wenn auch dieses Ziel wegen der außerordentlich unterschiedlichen wirtschaftlichen, klimatischen und politischen Voraussetzungen in naher Zukunft kaum zu erreichen sein wird — bisher haben lediglich einige Entwicklungsländer die Standards für Öle und Fette uneingeschränkt akzeptiert — so dürfte doch die Entscheidung der Codex Alimentarius Kommission, künftig auch die Annahme von Standards mit Abweichungen — auch erheblichen — vorzusehen, vielen Ländern eine Annahme erleichtern.

Schon jetzt ist aber erkennbar, daß die vorliegenden Empfohlenen Standards die Entwicklung des Lebensmittelrechts weltweit beeinflussen. Das gilt in besonderer Weise auch für die entsprechenden Harmonisierungsarbeiten in der Europäischen Gemeinschaft.

Im Rahmen der Weiterentwicklung der Standards für Öle und Fette stehen z. Z. folgende Probleme zur Diskussion:

#### 1. Die Fettsäurezusammensetzung der einzelnen Öle und Fette (Identitätsmerkmale)

Die bereits seit 1967 diskutierten Grenzwerte für die Fettsäurezusammensetzung der Öle und Fette wurden