

Untersuchungen zu den Ursachen der Kühlungs- und Trocknungsempfindlichkeit tropischer Samen am Beispiel des Kakao

III. Ultrastruktur des Rindenparenchyms der Radikula trocknender Kakaosamen

GERHARD RÜHL und MANFRED DAMBROTH

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung

Einleitung

Die primären Ursachen des Keimfähigkeitsverlustes von Kakaosamen infolge Entwässerung über den kritischen Feuchtebereich von 17 - 19 % hinaus sind weiterhin ungeklärt (Rühl 1988 et al. a,b). Stellvertretend für unorthodoxe tropische Pflanzenarten soll die Trocknungs- und Kühlungssensitivität von Kakaosamen hinterfragt werden, um daraus Anhaltspunkte für eine geeignetere Langzeitlagerpraxis oder eine mögliche züchterische Verbesserung des Kakao hinsichtlich der Langzeitkonservierung zu erhalten.

Zur Klärung dieses Fragenkomplexes konnten Alterungs- oder Lagerungsexperimente bisher keinen Beitrag leisten (Luan und Hill 1980; Petruzzelli et al. 1982; Petruzzelli und Carella 1983; Villiers 1975; Chin 1978; Roos 1980; Roberts 1983). Die Komplexität der Versuchsparmeter mit der Ermöglichung von Keimung, Alterung, Trocknung und Kühlung machen eine Interpretation außerordentlich schwierig.

Die wenigen bisher ausgeführten systematischen Untersuchungen zur Trocknungssensitivität unorthodoxer Samen lassen sowohl für Heveasamen als auch für die Vermehrungskörper von *Avicennia marina* eine Mitwirkung von Membranen beim Keimfähigkeitsverlust vermuten. (Chin et al. 1981; Nautiyal und Purohit 1985 a-c). Exsudationsversuche gaben auch für Kakaosamen erste Hinweise auf eine Beteiligung bestimmter Membransysteme beim Keimfähigkeitsverlust infolge Wasserentzuges (Rühl 1988 et al. b).

Eine derartige irreversible Membranschädigung infolge Dehydratation wird in der Literatur sehr oft als mögliche primäre oder auch sekundäre Ursache eines Lebensfähigkeitsverlustes von Samen vermutet. Dabei existieren eine ganze Reihe als möglich eingeschätzter Mechanismen. Es ist jedoch nach wie vor ungeklärt, ob eine Veränderung der Protein- oder der Lipidkomponente dabei ausschlaggebend ist.

Indizien für das Auftreten von Membranveränderungen und das zeitliche Eintreten dieser Veränderungen lassen sich auch ultrastrukturellen Beobachtungen trocknender Gewebe entnehmen.

Für die Beurteilung, ob eine bestimmte subzelluläre Veränderung in Samen infolge Entwässerung als ein Anzeichen für eine primäre Schädigung in Frage kommt, ist stets eine Abgrenzung gegen ultrastrukturelle Veränderungen während der Reifetrocknung orthodoxer Samenarten, gegen die Ultrastruktur ruhender bzw. reifetrockener Samen sowie - im Falle der frühen Trocknungsphasen - gegen Prozesse, die in der frühen Keimung ablaufen, unerlässlich.

Unter diesem Aspekt liegt in der vorliegenden Arbeit das Augenmerk zunächst auf dem Rindenparenchym der Radikula. Die Analyse des Speicherparenchyms der Kotyledonen folgt im nächsten Abschnitt (Rühl und Biehl 1989). Epidermis und Leitgewebe sind von der Betrachtung ausgeschlossen worden. Die Beobachtungen basieren auf der Beschreibung der Ultrastruktur von Kakaosamen, die in ausgezeichneter Form von Jänicke (1971, 1973) angefertigt wurde. Als orthodoxe Vergleichsspezies diente die Erdnuß, deren Samen eine Feuchte von 5 - 6 % aufwiesen und eine Abgrenzung gegenüber der Situation in ruhenden orthodoxen Samen erlaubten.

2 Material und Methoden

2.1 Samenmaterial

Reife sowie vorreife Kakaofrüchte wurden vom Centro Agronomico Tropical de Investigacion y Enseñanza (CATIE) in Turrialba, Costa Rica, bezogen.

Fast alle Experimente mit Kakaosamen wurden an Früchten des Klons UF 613 durchgeführt. Für einige Untersuchungen wurden Früchte bekannter Entwicklungsalters (Handbestäubung) verwendet.

Die Kakaofrüchte wurden sofort nach der Ernte per Luftfracht versandt und konnten so 4 - 7 Tage nach der Ernte verarbeitet werden.

Frische Erdnußsamen (Sorte V 13) für Vergleichszwecke wurden vom Malaysian Agricultural Research and Development Institute (Mardi), Serdang, Malaysia, zur Verfügung gestellt.

2.2 Keimung

Die Samen von *Theobroma cacao* wurden nach dem Entfernen aus den Früchten von der anhaftenden Pulpa sowie der Testa befreit und auf angefeuchtetem Filterpapier in Petrischalen bei 30° C zum Keimen ausgelegt.

Ein Kakaosame galt als keimfähig, wenn er nach einem normalen Keimwurzelwachstum beim Aufbrechen der Keimblätter nach ca. 7 - 14 Tagen eine gesunde Sprossachse zeigte.

2.3 Trocknung

Zur Trocknung wurden die Samen nach Entfernung aus der Frucht von der Samenschale befreit und entweder bei 22 bzw.

30° C der Luft exponiert, oder mittels wäßriger Polyethylenglykollösungen (PEG 4000) bestimmter Konzentration auf eine gewünschte Hydratation entwässert.

2.4 Ermittlung der Samenhydratation

Zu diesem Zwecke wurden die Samen bis zur Gewichtskonstanz im Trockenschrank auf 110° C erhitzt. Generell trat nach 24 Stunden bei dieser Temperatur kein weiterer Gewichtsverlust ein. Der Wassergehalt ist, wenn nicht anders vermerkt, auf Frischgewichtsbasis (%H₂O/Frischgewicht) angegeben.

2.5 Elektronenmikroskopie

Für die chemische Fixierung wurden Gewebestücke der Keimachse vorreifer und reifer Kakaosamen verwendet. Die Präparation dieser Gewebelöckchen einer Kantenlänge von etwa 1 mm oder weniger erfolgte in 30 mM Monophosphatpuffer (pH 7,0).

Die Objekte wurden 3 - 12 Stunden bei Zimmertemperatur in einer Lösung fixiert, die 1,5 % Formaldehyd und 1,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Orthophosphatpuffer (pH 7,0) enthielt. Nach dem Auswaschen mit der Pufferlösung während 2 - 12 Stunden wurde das Material mit 1 %iger Lösung von Osmiumtetroxid (in 0,1 M Orthophosphatpuffer pH 7,0) 2 - 6 Stunden lang nachfixiert. Anschließendes Auswaschen wurde mittels einer 1 %igen wäßrigen Saccharoselösung vorgenommen. Kontrastiert wurde darauf eine Stunde lang bei Zimmertemperatur mittels einer 1 %igen wäßrigen Uranylacetatlösung mit 1 % Saccharosegehalt (Hirsch und Fedorko 1968) und nachfolgend mit 30 %igem Ethanol (ebenfalls mit 1 % Saccharose) etwa eine halbe Stunde lang ausgewaschen. Die Entwässerung der Proben wurde über Alkoholstufen (40, 50, 70, 80, 90, 95, 100 %ig) erzielt. Die dehydratisierten Objekte kamen letztlich über mehrere Stufen einer Ethanol/Epoxidmischphase zur Einbettung in Spurr's Epoxy (Spurr 1969). Die Polymerisationszeit betrug 16 Stunden bei einer Temperatur von 70° C.

Ultradünnschnitte wurden mit einem Mikrotom Om U 2 der Fa. Reichert unter Verwendung von Glasmessern angefertigt. Die zusätzliche lichtmikroskopische Analyse wurde an einem Leitz Ortholux Mikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung durchgeführt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen erfolgten an einem Phillips EM 300- Modell bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV und einer Platinblende eines Durchmessers von 30 µm. Die Ultradünnschnitte wurden dazu zunächst 15 Minuten mit 3 %iger wäßriger Uranylacetatlösung und nachfolgend 8 - 10 Minuten mit Bleiacetatlösung (Reynolds 1963) kontrastiert.

Im Falle der Kakao- und Erdnußsamen wurden mindestens 20 Schnitte pro Behandlungsart ausgewertet. Bei den Abbildungen handelt es sich stets um elektronenmikroskopische Aufnahmen.

2.6 Verzeichnis der im Text und in den Abbildungen verwendeten Abkürzungen

AP	Amyloplast
AV	Aleuronvakuole
Chr	Chromatin
Cl	Cytolysom
Cyt	Cytoplasma
D	Dictyosom

DNA	Desoxyribonucleinsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ib	"intraplastid body"
IZ	Intrazellularraum
L	Lipid
Lk	Lipidkörper
M	Mitochondrium
NMR	Kernresonanzspektroskopie
Nu	Nucleolus
PEG	Polyethylenglykol
Pg	Plastoglobulus
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
S	Stärkeeinschluß
SV	Sekundärvakuole
SWG	Samenwassergehalt
Ve	Vesikel
ZK	Zellkern
ZV	Zentralvakuole
ZW	Zellwand

Der Maßstab auf den Abbildungen entspricht - wenn nicht anders angegeben - der Länge von 1 µm.

3 Ergebnisse

Das Hauptaugenmerk in diesen Studien war auf die Rindenparenchymzellen der Radikula gerichtet. Außerdem wurden verschiedene Reifestadien von Kakaosamen untersucht. Von Interesse für eine derartige Betrachtung subzellulärer Veränderungen infolge Trocknung waren folgende Zellbestandteile: Aleuronvakuolen, Amyloplasten, Dictyosomen, Endoplasmatisches Reticulum, Lipidkörper, Mitochondrien, Ribosomen sowie der Zellkern. Zur Interpretation der Befunde wird diesen eine Analyse der Ultrastruktur trockener orthodoxer Erdnußsamen gegenübergestellt. Für den Versuch, ein allgemeingültiges unorthodoxes Prinzip aufzuspüren, werden zu Vergleichszwecken später auch Resultate der mikroskopischen Analyse von Mango- und Ölpalmsamen vorgestellt (Rühl et al. 1989, in prep.).

3.1 Ultrastruktur der Radikula trocknender Kakaosamen

Für diese Untersuchung wurden Kakaosamen in Lösungen einer PEG 4000- Konzentrationsreihe getrocknet und anschließend von jedem einzelnen Samen Kotyledonar- sowie Radikulagewebe fixiert und gewaschen. Der verbleibende Rest des Samens wurde einer Wassergehaltsbestimmung unterworfen und auf deren Basis diejenigen Samen ausgewählt, die eine möglichst lückenlose Reihe unterschiedlicher Hydratationen über den Bereich von 12 - 30 % ergaben. Die dazugehörigen Gewebelöckchen wurden weiter verarbeitet und mikroskopisch ausgewertet.

Dabei ließ sich sicherlich nicht vermeiden, daß innerhalb des Samens bei der Entwässerung mittels wäßriger Lösungen von PEG 4000 ein Wassergehaltsgradient entstand. Um trotzdem eine größtmögliche Vergleichbarkeit zu erzielen, wurden stets Blöckchen untersucht, deren eine Seite die Epidermis bildete, und außerdem Leitgewebereiche sowie deren Begleitzellen von der Betrachtung ausgeschlossen.

Die Parenchymzellen der Radikula im etwa 1,0 - 1,5 mm oberhalb der Wurzelspitze geschnittenen Bereich des Rindengewebes besitzen eine polygonale Gestalt mit einem Durch-

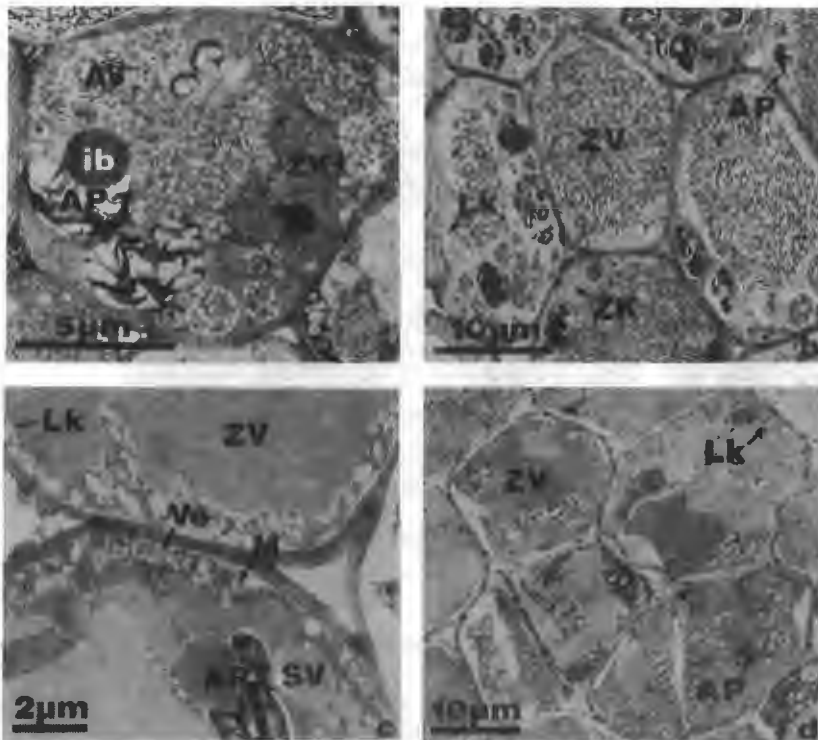


Abb. 1: Kakao, Radikula. Veränderungen in Rindenparenchymzellen infolge Trocknung

Gegenüber dem Zustand in frischen Samen (a; Samenwassergehalt: $34,5 \pm 2,3$ %) zeichnen sich die Zellen nur geringfügig getrockneter Samen durch eine generelle Kontraststeigerung aus (b; SWG: 31,4 %). Im kritischen Wassergehaltsbereich ist das Auftreten von Vesikelbändern und -anhäufungen entlang der Zellwand (c; SWG: 19,1 %) sowie das Abheben des Plasmalemmas von der Zellwand typisch (d; SWG: 16,7 %).

messer von annähernd $20 \mu\text{m}$. Auffallend in diesen Zellen sind die etwa $4 - 5 \mu\text{m}$ großen Stärkekörner und die unterschiedlich großen Proteinvakuolen (Abb. 1 a).

Die Stärkekörner liegen als Einschlüsse in Plastiden vor, die aufgrund des großen Stärkeanteils als Amyloplasten zu bezeichnen sind. Die Stärkeeinschlüsse liegen offenbar frei im Stroma. In den Plastiden stechen häufig angeschnittene, runde Körper ("intraplastid bodies") durch ihre intensive Färbung nach OsO_4 -Fixierung hervor (Abb. 1 a - c). Sie besitzen im Mittel einen Durchmesser von $2 \mu\text{m}$ und sind durch eine Membran vom Stroma getrennt (Jänicke 1971).

Vorangestellt sind einige Abbildungen (Abb. 1 a - d), die den generellen Aspekt des Rindenparenchyms aufzeigen sollen. Die in reifen Samen typische Situation der Rindenparenchymzellen zeigt Abbildung 1 a. Demgegenüber zeichnen sich Zellen nur geringfügig getrockneter Samen (Abnahme des Wassergehaltes von 34,5 auf 31,4 %) durch eine generelle Kontraststeigerung nach OsO_4 -Fixierung aus (Abb. 1 b).

Beim Eintritt in den kritischen Wassergehaltsbereich von Kakaosamen (17 - 19 %) treten verstärkt Vesikelbänder sowie -anhäufungen entlang der Zellwand auf (Abb. 1 c). Ebenfalls in diesem Feuchtebereich zeigt sich ein zunehmendes Abheben des Plasmalemmas von der Zellwand (Abb. 1 d).

Die gewählte Versuchsanstellung gestattete es, gezielt jene subzellulären Veränderungen zu erkennen, die bei der gleichen Hydratation auftreten wie der Keimfähigkeitsverlust der Kakaosamen. Da nur diese für die der Arbeit zugrunde liegende Fragestellung von Bedeutung sind, werden sie vor der Beschreibung weiterer ultrastruktureller Veränderungen abgehandelt. Diese wesentlichen Schädigungen auf subzellulärer Ebene betreffen den Zellkern, die Amyloplasten sowie in gewisser Hinsicht auch die Dictyosomen.

Der Zellkern ist in Rindenparenchymzellen der Radikulae frischer Samen durch eine starke Kontrastierbarkeit des Nucleolus sowie des Chromatins charakterisiert (Abb. 2 a). Im Verlaufe der Trocknung nimmt diese Kontrastierbarkeit ab (Abb. 2 b, c). Diese Abnahme betrifft dabei zunächst vornehmlich den Nucleolus, der bei einem Samenwassergehalt von etwa 19 % nur noch schemenhaft erkennbar ist, während das Chromatin noch deutlich sichtbar bleibt. Eine Samenhydratation von 17 % und weniger repräsentiert das in Abbildung 2 d gezeigte Bild. Weder ein Nucleolus noch das Chromatin sind weiterhin sichtbar; der Zellkern weist bei meist intakt erscheinender Doppelmembranhülle ein fast homogen anmutendes Stroma auf.

Anzumerken ist in diesem Zusammenhang noch, daß stets ein Gradient der subzellulären Veränderung von der Oberfläche der Radikula in das Zentrum bestand. Oberflächlich gelegene Zellen wiesen einen besseren Erhaltungszustand auf als die dem Leitgewebe benachbarten Zellen. Dies ist durchaus erklärlich, da der Wasserentzug der rundherum von den massigen Kotyledonen umgebenen Keimwurzel höchstwahrscheinlich über das Leitgewebe zu den Kotyledonen hin erfolgt.

Diese Tatsache erschwerte die Auswertung, da es für jeden Schnitt das Aufsuchen eines als typisch geltenden Gewebebereiches erforderte. Insofern ist es durchaus möglich, in oberflächlich gelegenen Rindenparenchymzellen auch bei Samenfeuchten von 14 % noch vereinzelt weniger stark veränderte Zellkerne zu finden. Dieses gilt allgemein auch für die folgenden Beobachtungen.

Eine weitere wichtige Veränderung der subzellulären Struktur von Rindenparenchymzellen der Radikula betrifft die Dictyosomen. In frischen Samen findet man sie recht häufig; sie bestehen in der Regel aus 4 - 6 Zisternen und weisen in ihrer

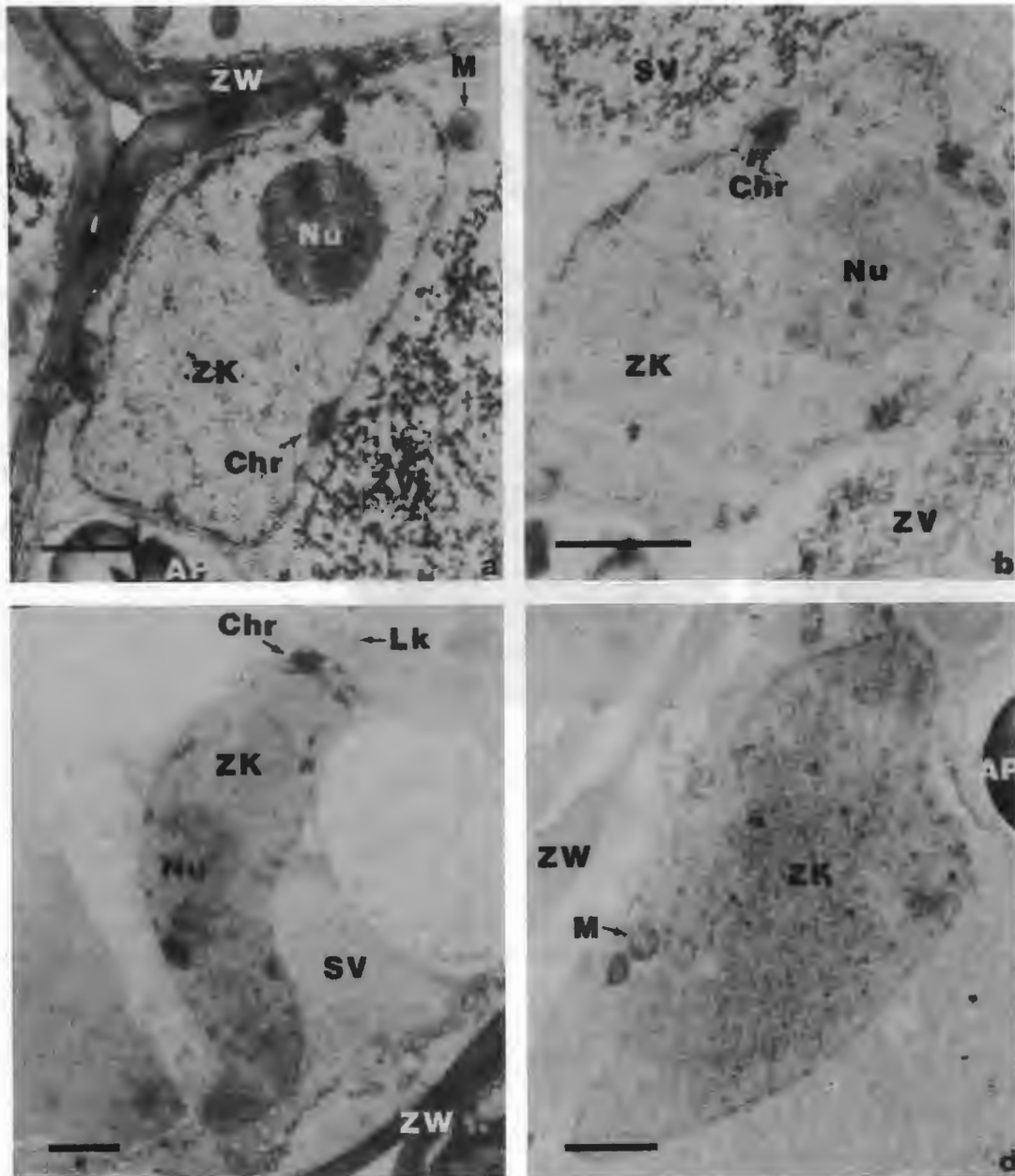


Abb. 2: Kakao, Radikula. Veränderungen des Zellkerns aus Rindenparenchymzellen infolge Trocknung. Auffälligste Veränderung des Zellkerns ist die Abnahme der Kontrastierbarkeit des Nucleolus sowie des Chromatins (a - c), die bei Wassergehalten unterhalb der kritischen Hydratation völlig verloren geht (d). Samenwassergehalte: a) frisch, $34,5 \pm 2,3$ %; b) 27,0 %; c) 19,0 %; d) < 17 %.

Nachbarschaft eine Anzahl kleinerer Vesikel auf (Abb. 3 a). Infolge Trocknung erscheint sowohl die Anzahl als auch das Volumen dieser Vesikel gesteigert (Abb. 3 b). Im Bereich der kritischen Hydratation sowie darunter findet man - wie bereits erwähnt - oft Vesikelanhäufungen in Zellwandnähe (Abb. 1 c, 3 c), in deren Nachbarschaft ab und zu ein Dictyosom angeschnitten ist. Das Erscheinungsbild der Dictyosomen in dem Fall gibt Abbildung 3 d wieder. In direkter Nähe des Dictyosoms findet man keinerlei Vesikel mehr, dafür aber jene traubenartig angeordneten, aufgeblähten Vesikel in einer gewissen Distanz und grundsätzlich in Zellwandnähe. Das Dictyosom selbst erscheint dabei strukturell unverändert; betrachtet

man dieses jedoch seiner Funktion entsprechend als ein dynamisches Gebilde und bezieht die abgeschnürten Vesikel mit ein, so muß man auch von einer mit dem Zeitpunkt des Keimfähigkeitsverlustes einhergehenden Veränderung dieses Zellbestandteiles sprechen.

Die deutlichste Veränderung der Rindenparenchymzellen infolge Dehydratation der Samen offenbaren jedoch die Amyloplasten (Abb. 4). In den Zellen der Radikula frischer Samen enthalten die Amyloplasten stets mehrere Stärkekörner und sind sehr häufig von rauhem ER umgeben. Der "intraplastid

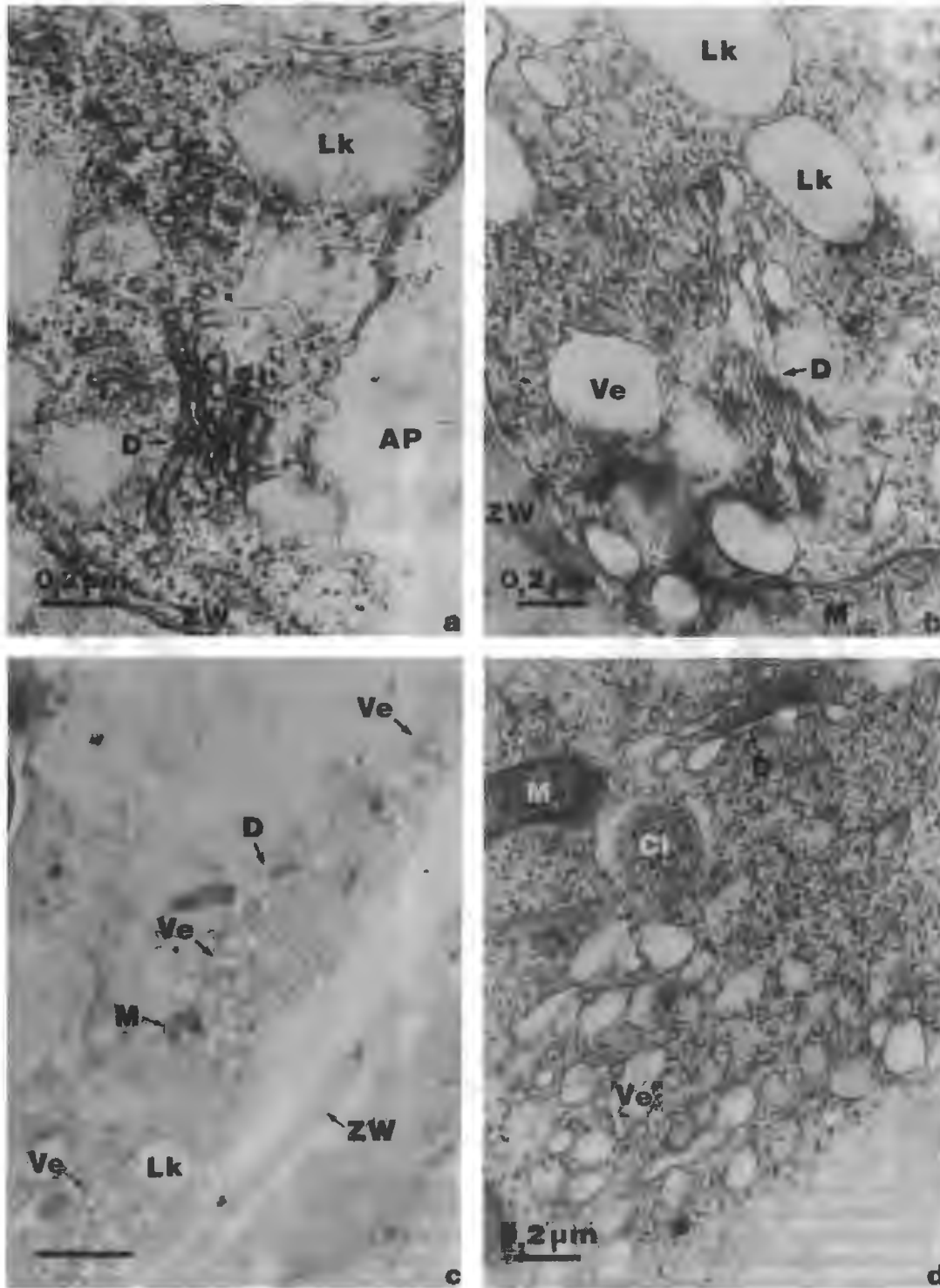


Abb. 3: **Kakao, Radikula. Veränderungen der Dictyosomen aus Rindenparenchymzellen infolge Trocknung.** Deutlich erkennbar ist eine mit fortschreitender Trocknung auftretende Zunahme der Vesikelanzahl in der Nähe der Dictyosomen (a - c). Bei Wassergehalten unterhalb der kritischen Hydratation findet man entlang der Zellwand sehr zahlreich Vesikelanhäufungen (c), in deren Nachbarschaft oft ein Dictyosom darstellbar ist (d; Ausschnitt aus c).
 Samenwassergehalte: a) frisch, $34,5 \pm 2,3\%$; b) $25,0\%$; c,d) $< 17,0\%$.

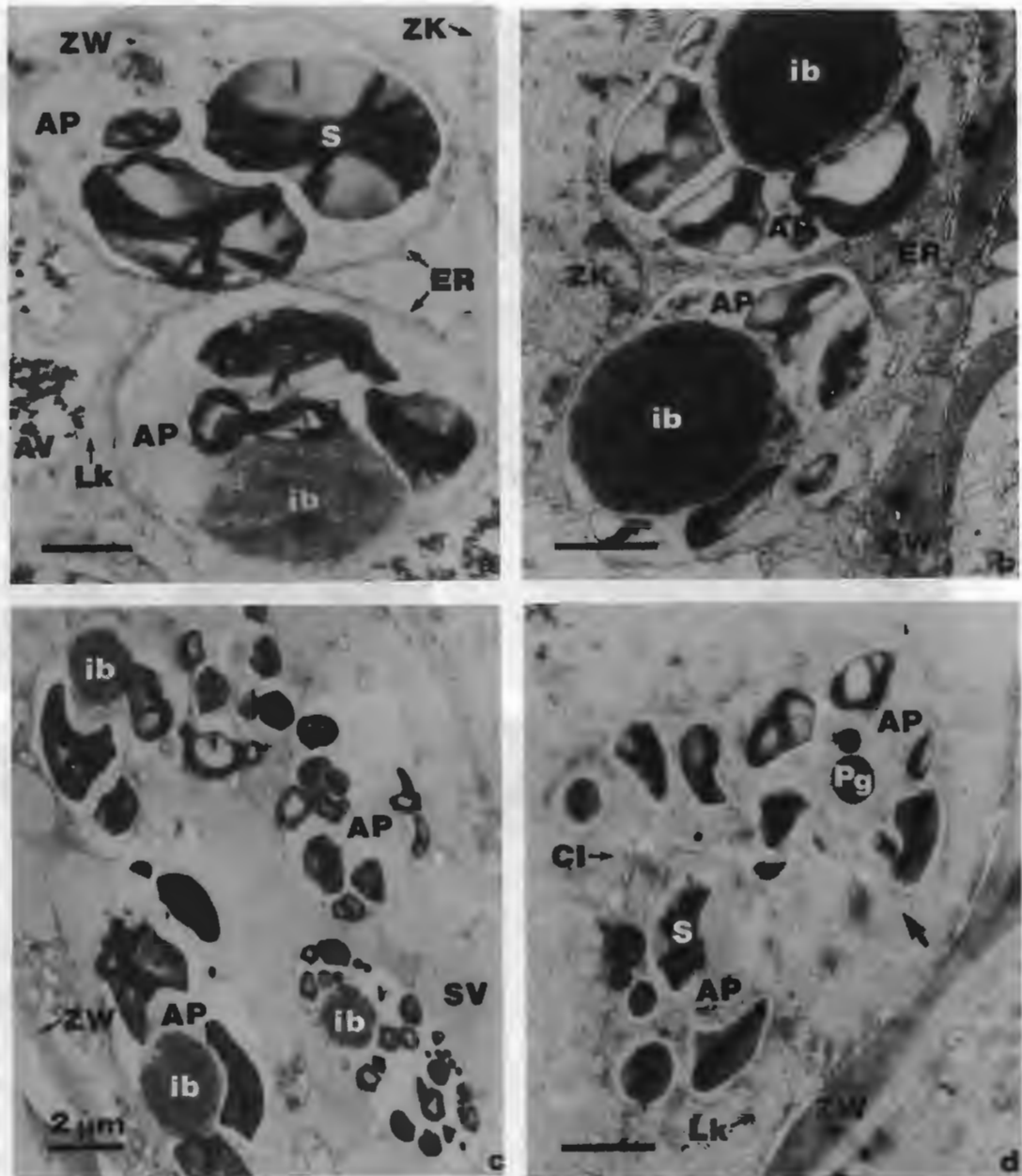


Abb. 4: Kakao, Radikula. Veränderungen der Amyloplasten aus Rindenparenchymzellen infolge Trocknung. Im frischen Samen sind die Amyloplasten sehr oft von rauhem ER umgeben, der "ib" nur relativ schwach kontrastierbar (a). Mit fortschreitender Entwässerung nimmt die Anzahl der Ribosomen am ER ab, die Kontrastierbarkeit des "ib" zunächst zu (b). Etwas oberhalb der kritischen Hydratation geht bereits in manchen Amyloplasten die Anordnung der Stärkekörner um den "ib" herum verloren, die Amyloplasten erscheinen in die Länge gezogen (c). Die Kontrastierbarkeit des "ib" nimmt anschließend wieder ab (c); Im kritischen Feuchtebereich treten überwiegend Amyloplastenformen auf, deren Doppelmembranhülle defekt ist (d). Es erscheinen stark kontrastierte Plastoglobuli (d). Bei Wassergehalten unterhalb von 17,0 % findet man vornehmlich nur noch einzelne, in das Zellumen eingestreute Stärkekörner. Samenwassergehalte: a) frisch, $34,5 \pm 2,3$ %; b) 25,0 %; c) 19,0 %; d) 17,0 %.

body" ist nach OsO₄-Fixierung relativ gering kontrastiert (Abb. 4 a). Dieser "intraplastid body" zeigt mit einsetzender Trocknung bis herab zu Wassergehalten von ca. 25 % zunächst eine beträchtliche Zunahme der Elektronendichte (Abb. 4 b). Synchron dazu reduziert sich die Anzahl der Ribosomen des ER, welches stellenweise quasi eine zweite Hülle um die Plastiden

bildet. Mit fortschreitender Dehydratation reduziert sich die Kontrastierbarkeit der "intraplastid bodies" und bei Wassergehalten unter 17 - 18 % sind solche in den Plastiden nicht mehr auffindbar (Abb. 4 d). Bei Samenhydratationen kleiner als 20 % kommt es außerdem zum Auftreten stark kontrastierter Plastoglobuli (Abb. 4 d).

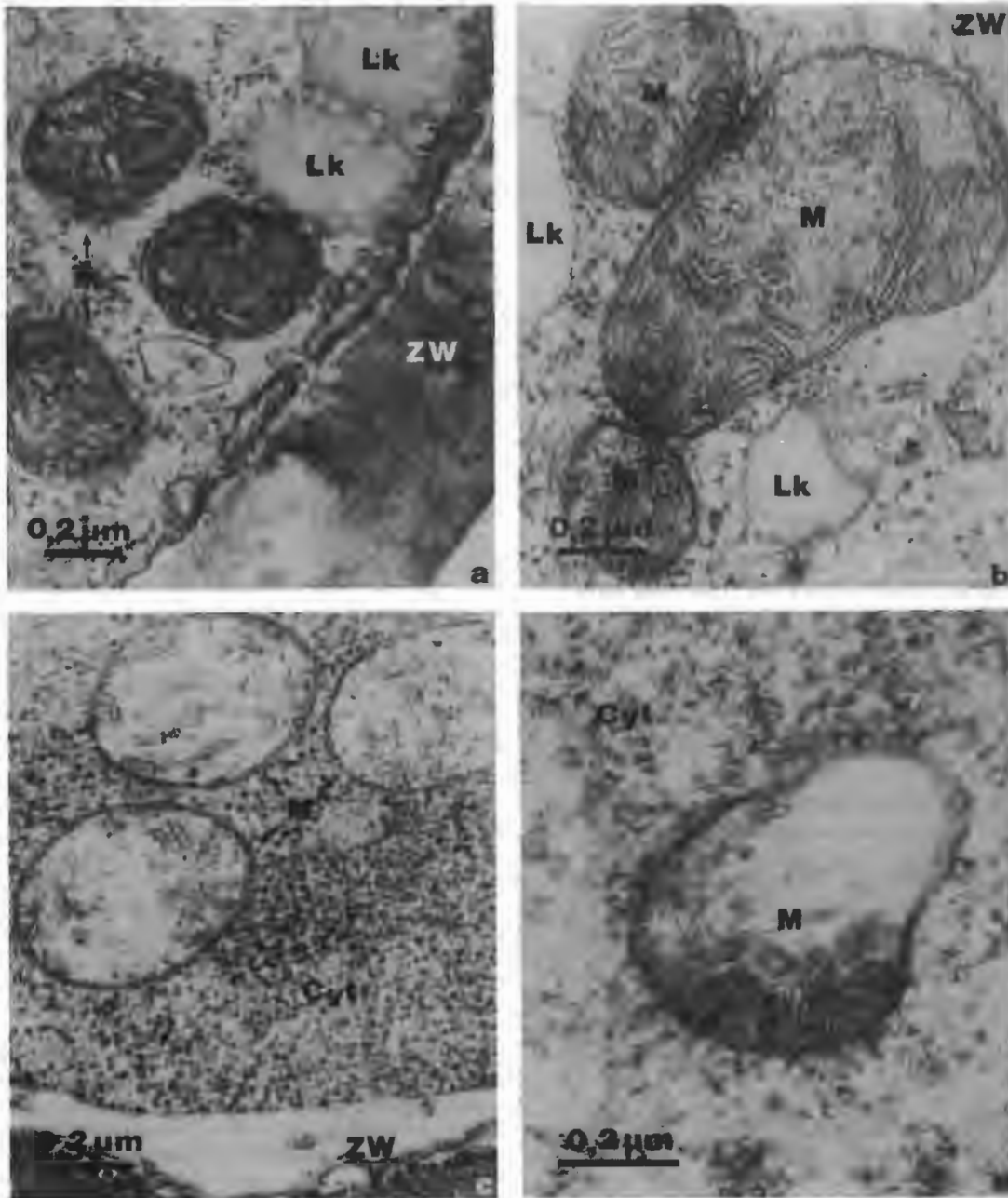


Abb. 5: Kakao, Radikula. Veränderungen der Mitochondrien aus Rindenparenchymzellen infolge Trocknung. Geringfügige Trocknung führt zunächst zu einer verbesserten Kontrastierbarkeit der Membranstrukturen (a → b). Bei weiterer Trocknung treten zunächst im Zentrum der Mitochondrien elektronentransparente Bereiche auf (c), die sich anschließend vergrößern (d), bis nahezu das gesamte Innere dieser Organellen transparent erscheint. Bei Samenfeuchten unterhalb der kritischen Hydratation treten häufig offensichtlich irreversibel geschädigte Mitochondrienformen auf. Samenwassergehalte: a) frisch, $34,5 \pm 2,3$ %; b) 31,4 %; c, d) < 19 %.

Die entscheidende Veränderung der Amyloplasten betrifft jedoch die begrenzende Doppelmembran dieser Organellen. Sind ursprünglich die Stärkekörner stets direkt um den "intraplastid body" angeordnet (Abb. 4 a, b), so wirken die Amyloplasten bei weiterer Entwässerung gedehnt und eine Ordnung betreffs der Stärkekörner ist aufgehoben (Abb. 4 c). Exakt bei Hydratationen von 17 - 18 % findet man überwiegend Pla-

stiden, deren Doppelmembranhülle nur noch bruchstückweise darstellbar ist (Abb. 4 d, s. Pfeil). Bei Wassergehalten unterhalb von 17 % existieren vornehmlich lediglich einzelne, in das Zellumen eingestreute Stärkekörner.

Die im folgenden beschriebenen subzellulären Veränderungen weiterer Zellkompartimente haben zwar keinen direkten

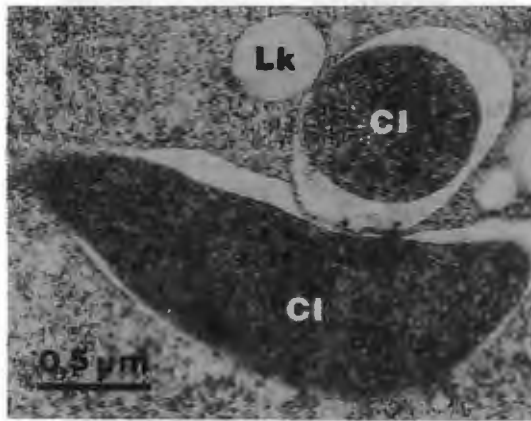


Abb. 6: Kakao, Radikula. Auftreten von Cytolysomen in Rindenparenchymzellen infolge Trocknung. Die Cytolysombildung tritt vereinzelt bereits bei Samenfeuchten von 23 % auf. Die Häufigkeit ihres Erscheinens nimmt jedoch mit sinkender Hydratation zu.

Bezug zum Zeitpunkt des Keimfähigkeitsverlustes von Kakaosamen infolge Trocknung, sollen aber dennoch kurz erwähnt werden.

Mitochondrien aus Rindenparenchymzellen der Radikula zeigen im frischen Kakaosamen das in Abbildung 5 a gezeigte Bild. Die Tubuli erscheinen leicht aufgebläht, das Stroma ist homogen dunkel kontrastiert. Geringfügige Entwässerung führt zu einer Verengung der Tubuli (Abb. 5 b).

Für den weitergehenden Trocknungsverlauf kann man die auftretenden Mitochondrienformen in einer Reihe abnehmender Strukturhaltung anordnen. Dabei treten allerdings vielfach Überschneidungen auf, so daß die Zuordnung der Formen zu bestimmten Hydratationen nur einen Anhaltspunkt darstellen kann.

Die erste erkennbare Veränderung beinhaltet das Auftreten elektronentransparenter Bezirke im Zentrum der Mitochondrien (Abb. 5 c). Dabei treten letztlich auch Mitochondrien auf, die elektronenoptisch nahezu leer erscheinende Matrixbereiche aufzeigen (Abb. 5 d), sowie offensichtlich irreversibel geschädigte Formen bei Wassergehalten deutlich unterhalb des kritischen Feuchtebereiches.

Interessant ist auch die Entstehung von Cytolysomen in den Rindenparenchymzellen bei Wassergehalten unterhalb von 23 % (Abb. 6). Die Häufigkeit des Auftretens dieser Strukturen nimmt dabei mit abnehmendem Wassergehalt bis zum Erreichen des kritischen Feuchtebereiches zu.

Veränderungen der anderen untersuchten Kompartimente - Aleuronvakuolen, Lipidkörper, Ribosomen - konnten im gesamten verfolgten Wassergehaltsbereich von 12,0 - 34,5 % nicht beobachtet werden, sieht man von der Freisetzung der Ribosomen vom ER, welches die Amyloplasten umgibt, ab.

Von der Darstellung ultrastruktureller Aspekte vorreifer Kakaosamen wurde abgesehen, da sich keine von reifen Kakaosamen abweichenden Beobachtungen ergaben.

Über die Polyhydroxyphenolspeicherzellen der Radikula läßt sich nur mit Sicherheit feststellen, daß der phenolische Vakuoleninhalt infolge Trocknung unverändert bleibt. Der Erhaltungsgrad des Cytoplasmas dieser Zellen läßt offensichtlich aufgrund des Fixierungs- und Entwässerungsvorganges bei der Probeneinbettung sehr zu wünschen übrig. Hinzu kommt noch, daß in diesen Zellen beim Schneiden der Probenblöckchen mit dem Mikrotom infolge des spröden Vakuoleninhaltes nahezu immer der cytoplasmatische Zellanteil zerstört wird.

Faßt man die Ergebnisse zusammen, so kommen drei Kompartimente aus den Rindenparenchymzellen der Radikula von Kakaosamen als Ursachen eines Keimfähigkeitsverlustes in Frage. Der Zellkern weist keinen kontrastierbaren Nucleolus und kein Chromatin mehr auf, der Vesikelfluß der Dictyosomen ist verändert und die Doppelmembranhülle der Amyloplasten wird geschädigt, sobald Kakaosamen auf Wassergehalte von 17 - 19 % getrocknet werden, also die kritische Wassergehaltsgrenze erreicht wird.

3.2 Ultrastruktur der Radikula trockener Erdnußsamen

Das für den Vergleich mit den eben geschilderten Befunden eingesetzte Samenmaterial war bereits für Transport- und Lagerungszwecke nach der Ernte auf einen Wassergehalt von 5 - 6 % dehydratisiert worden.

Die Rindenparenchymzellen der Keimachse von Erdnußsamen weisen einen Durchmesser von etwa 20 - 30 μm auf. Sie sind nahezu ausgefüllt von Lipidkörpern und Aleuronvakuolen (Abb. 7 a). Diese Lipidkörper besitzen einen Durchmesser von 0,5 - 2,0 μm, die Aleuronvakuolen von 2 - 5 μm. Amyloplasten findet man nur in sehr geringer Anzahl. Diese enthalten meist 2 - 3 Stärkeköerner. Weiterhin ist das Gewebe durch das Vorhandensein großer Interzellularen charakterisiert, die von verdickten Zellwänden umgrenzt sind (Abb. 7 a).

Der Schwerpunkt beim Vergleich der Rindenparenchymzellen von Erdnuß- und Kakaosamen liegt auf der Betrachtung der Amyloplasten, Zellkerne und Dictyosomen. Einschränkung muß jedoch gleich erwähnt werden, daß im trockenen Erdnußsamen - wie generell in dehydratisierten orthodoxen Samen (Perner 1965; Hallam et al. 1972; Abdul-Baki und Baker 1973; Sommer 1973) - eine generelle Reduktion der Funktionsstrukturen vorliegt. Das bedeutet, Kompartimente wie ER und Dictyosomen sind nicht auffindbar, Doppelmembranen sind in elektronenoptischen Untersuchungen nicht deutlich als solche erkennbar. Somit beschränkt sich die Betrachtung auf Lipidkörper, Aleuronvakuolen und Mitochondrien sowie auf die besonders betrachtenswerten Amyloplasten und Zellkerne.

Amyloplasten weisen generell eine begrenzende Membranstruktur auf, welche die in ein homogenes Stroma eingelagerten Stärkeköerner umschließt. Der Doppelmembrancharakter dieser Hülle ist nicht erkennbar (Abb. 7 c).

Die Zellkerne offenbaren auch in diesem stark entwässerten Zustand der Samen (5 - 6 % Feuchte) einen deutlich sichtbaren Nucleolus sowie ein gut kontrastierbares Chromatin (Abb. 7 b). Auch in diesem Falle ist die begrenzende Hüllstruktur zwar offensichtlich intakt, jedoch nicht als Doppelmembran zu identifizieren.

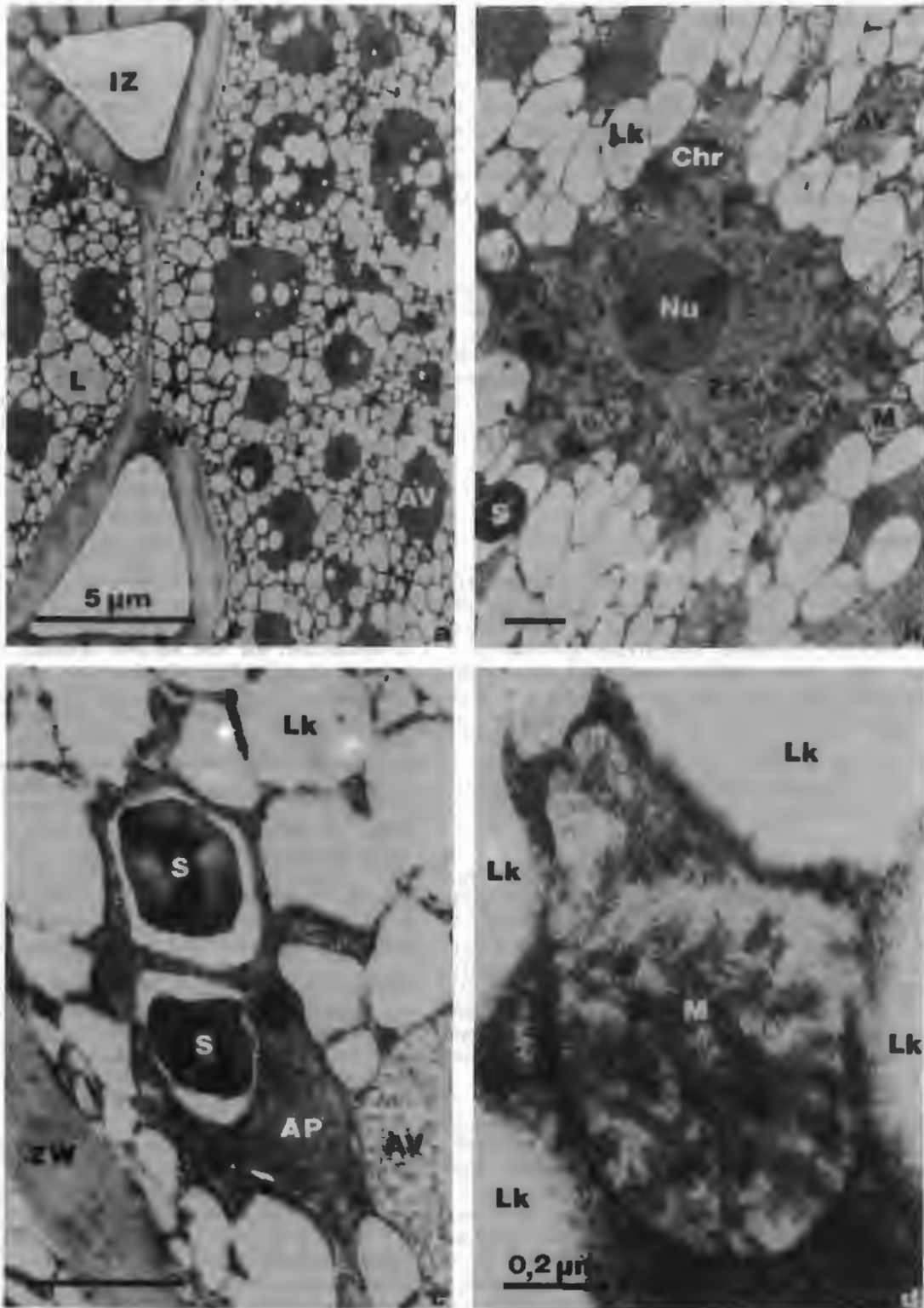


Abb. 7: Erdnuß, Radikula. Ultrastrukturelle Aspekte in Rindenparenchymzellen nach Trocknung auf eine Hydratation von 5 - 6 %.

Die Lipidkörperstruktur ist größtenteils erhalten, nur selten treten Bereiche auf, in denen wenige benachbarte Lipidkörper fusioniert sind (a). Der Zellkern enthält einen deutlich sichtbaren Nucleolus, aber keine als Doppelmembran erkennbare äußere Hülle (b). Eine Amyloplastenhülle ist zu sehen (c), die Mitochondrien enthalten überwiegend eine undeutliche Innenstruktur und eine nicht klar erkennbare sie umgrenzende Doppelmembran (d).

Mitochondrien zeigen stets mehr oder weniger große elektronentransparente Bezirke, die Tubuli sowie die begrenzende Doppelmembran erscheinen diffus (Abb. 7 d).

Die Aleuronvakuolen sind im elektronenmikroskopischen Ultradünnschnitt weiterhin voneinander isoliert und rundherum von Lipidkörpern umgeben (Abb. 7 a). Diese Lipidkörper sind nahezu immer in ihrer ursprünglichen Struktur und Größe erhalten, nur selten treten kleinere Lipidbereiche in den Zellen auf, die durch die Fusion weniger benachbarter Lipidkörper entstanden sind (Abb. 7 a, "L").

Bezüglich ultrastruktureller Veränderungen der Rindenparenchymzellen infolge Trocknung läßt sich somit aussagen, daß die gravierenden Unterschiede zwischen Kakaosamen und Erdnußsamen einerseits den Nucleolus und das Chromatin des Zellkerns sowie andererseits den generellen Erhaltungsgrad der Amyloplasten umfassen. Eine vergleichende Aussage zum Verhalten der Dictyosomen ist nicht möglich.

4 Diskussion

Betrachtet man zunächst die in dieser Arbeit dokumentierte Ultrastruktur trockener Erdnußsamen, so zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse mit der subzellulären Struktur anderer trockener Fortpflanzungseinheiten (Perner 1965; Yatsu 1965; Bain und Mercer 1966; Coccuci und Sturani 1966; Klein und Ben-Shaul 1966; Klein und Pollock 1968; Paulson und Sriva Stava 1968; Beevers und Poulson 1972; Schulz 1972; Swift und O'Brien 1972; Abdul-Baki und Baker 1973; Sommer 1973; Webster und Leopold 1977; Öpik 1980; Chabot und Leopold 1982; Horowitz 1983).

Kakaosamen zeigen hingegen bezüglich bestimmter Organellen ein abweichendes subzelluläres Bild infolge Trocknung. In den Rindenparenchymzellen der Keimwurzel tritt exakt im kritischen Feuchtebereich ein Aufbrechen der Doppelmembran ein, welche die Amyloplasten begrenzt. Vorangegangen war eine Kontrastminderung der "intraplastid bodies" sowie eine Abnahme der Ribosomenzahl am die Amyloplasten umgebenden ER. Dieser Befund könnte durchaus einen Anhaltspunkt für eine generelle Veränderung von Membranen in diesem Gewebe bedeuten.

Allerdings stellte Horowitz (1983) fest, daß Stärkekörner von Markerbbsen im Gegensatz zu Schalerbbsen gebrochen oder fragmentiert seien. Die Begrenzungsmembran der Stärkekörner runzliger Erbsensamen sei an vielen Stellen aufgebrochen. Den fragmentiertesten Stärkekörnern fehle eine Grenzkontur völlig, seien jedoch noch in ein System zusammenhängender Lipidkörper eingeschlossen. Dieselbe Autorin beobachtete außerdem eine graduelle Desintegration von Stärkekörnern und wertete dies als Anhaltspunkt dafür, daß die Stärkekörner früh in der Entwicklung bereits abgebaut werden. Den gleichen Schluß zog Boyer (1981) aus der Entdeckung, daß bei der Entwicklung runzlicher Erbsensamen eine Bildung von Rissen auftrete, die Körner also nicht wirklich zusammengesetzter Natur seien, sondern im reifen Samen bei Hydratation "explodierten".

Da diese ultrastrukturellen Besonderheiten bei Erbsen offensichtlich keinen Keimfähigkeitsverlust bedingen, stellt sich die Frage, ob der Verlust der Hüllstruktur der Amyloplasten in

getrockneten Kakaosamen selbst einen Lebensfähigkeitsverlust herbeiführen kann.

Die zweite Besonderheit im getrockneten Rindenparenchym ist das Erscheinen von traubenförmigen Vesikelanhäufungen in Plasmalemma Nähe, die ebenfalls im kritischen Feuchtebereich verstärkt in Erscheinung treten. Diese könnten einerseits einen Austritt von Membranmaterial aus dem Plasmalemma infolge Schrumpfens des Protoplasten signalisieren, wie sie auch von Steponkus (1984) für die frostinduzierte Dehydratation erwogen wird. Eine anschließende Rehydratation könnte einen ausreichend schnellen Einbau der Membranbestandteile nicht gestatten und ließe die Zellen kollabieren. Allerdings könnte auch eine schonende Einquellung in 100 % relativer Feuchte die Trocknungsschädigung nicht beseitigen (Rühl 1986).

Andererseits erscheinen Versuche der Applikation von Cytochalasin B bei Fruchtknoten von *Aptenia cordifolia* interessant (Kristen und Lockhausen 1983; Lockhausen und Kristen 1983), besonders da in der Nähe der Vesikelhaufen ab und zu ein Dictyosom angeschnitten war. Cytochalasin B verursache eine Anhäufung von Golgivesikeln um die Dictyosomen herum, möglicherweise infolge einer Unterbindung der Vesikelwanderung in Richtung Plasmalemma. Außerdem treten verstärkt große Vesikel auf, ein Tatbestand, der auch bei Kakaosamen - hier allerdings infolge Wasserentzuges auf das Niveau der kritischen Feuchte - zu beobachten war. Die Autoren vermuten, daß das natürliche Membrangleichgewicht gestört sei, also der Membranfluß zwischen Plasmalemma, ER und Golgiapparat. Diese Einschränkung der Vesikelbewegung sei eventuell die Folge einer Cytochalasin B-Wirkung auf die Tätigkeit von Mikrofilamenten durch Hemmung der Actinpolymerisation (Fox und Phillips 1981). D. h. es besteht durchaus die Möglichkeit, daß bei dem in reifen Kakaosamen herrschenden physiologischen Zustand ein Wasserentzug bis zur der kritischen Hydratation Bewegungserscheinungen auf subzellulärer Ebene unterbindet und keine Adaptationsprozesse an das gegebene Feuchteniveau bzw. keine Membranreparaturvorgänge mehr erlaubt, und somit letztlich sekundär Schädigungen anderer Kompartimente nach sich zieht.

Eine dritte das Keimachsgewebe betreffende, vom orthodoxen Verhalten abweichende, ultrastrukturelle Veränderung infolge Entwässerung betrifft den Zellkern. Bei sinkender Hydratation der Samen nimmt der Kontrast von Nucleolus und Chromatin ab und verschwindet bei Unterschreitung der kritischen Hydratation von Kakaosamen völlig.

Nun ist bekannt, daß im Nucleolus eukaryotischer Organismen die Synthese und Weiterbehandlung der Prä-rRNA abläuft (Brown und Gurdon 1964; Mc Concey und Hopkins 1964; Warner und Soeiro 1967; Weinberg und Penman 1970; Chen et al. 1983). Die Nucleolusorganisationsregion beinhalte einige 100 - 1000 Kopien von rRNA-Genen, welche in Form nucleolären Chromatins mit Proteinen assoziiert seien (Key 1976). Während Transkription der Prä-rRNA assoziierten zahlreiche ribosomale Proteine mit der entstehenden RNA. Dies führe zu einer weiteren Verarbeitung und Packung der Prä-rRNA im Nucleolus unter Bildung von Ribonucleoproteinkomplexen, die als präribosomale Partikel oder Präribosomen bezeichnet werden (Warner und Soeiro 1967).

Dieser Verlust der Kontrastierbarkeit des Chromatins und des Nucleolus bei sonst intakter Kernhülle tritt bei einem Wassergehalt von Kakaosamen ein, der noch keine Kontrastunter-

schiede aufgrund der gewählten Fixierung erwarten läßt. Dies unterstreicht auch der gute Kontrast dieser Zellstrukturen in Erdnußsamen einer Hydratation von 5 - 6 %. Somit wäre eine Erklärung des fehlenden Kontrastes eine Veränderung oder ein Verlust des Chromatins oder Nucleolusinhalt, der in beiden Fällen Auswirkungen auf die Proteinsynthese zeigen muß. Erfolgte nur eine Ausbreitung kondensierten Chromatins über den gesamten Kernquerschnitt, so erwartete man eine Kontraststeigerung des Kernplasmas; es trat jedoch bei sinkender Hydratation eher eine Kontrastminderung ein. Denkbar wäre als Erklärung auch eine Permeabilitätssteigerung der Kernmembran infolge verminderter Stabilisierung der Kernhülle bei Wasserentzug. Dies würde mit den anderen beobachteten Phänomenen der Zerstörung der Amyloplastenbegrenzung und dem Unterbinden des Vesikelflusses in Einklang stehen.

Sucht man in der Literatur nach vergleichbaren systematischen Beobachtungen der subzellulären Strukturen im Verlaufe der Trocknung unorthodoxer Samenarten, so findet man lediglich eine Arbeit, und zwar beschäftigt sich diese mit der Entwässerung der trockenungsempfindlichen Vermehrungskörper von *Avicennia marina* (Berjak et al. 1984). Die Autoren beschränken sich auf die Betrachtung der Zellen in den Wurzelprimordien. Zu Trocknungsbeginn ergäben sich ebenfalls Anzeichen einer gesteigerten subzellulären Aktivität. Die Matrix der Mitochondrien erschiene dichter, Ribosomen aggregierten unter Polysombildung und die Golgiaktivität sei gesteigert. Außerdem trete bereits in diesen frühen Trocknungsstadien eine bedeutende Cytolysombildung auf, die als ein Anzeichen einer beginnenden Vakuolisierung gewertet wird.

Der scharfe Abfall der Lebensfähigkeit im Verlaufe der weiteren Trocknung werde von einer Fortsetzung der Vakuolenbildung begleitet. Der totale Verlust der Lebensfähigkeit bei einer Hydratation von 110 % (Trockengewichtsbasis) sei charakterisiert durch beträchtlich geschädigte Organellen und das Vorherrschen von Monosomen. Da auch in ihrem Versuchsobjekt nicht alle Zellen gleichermaßen geschädigt waren, hält die Autorin es ebenfalls für möglich, daß bei einem kritischen Feuchtegehalt ein ebenso kritischer Prozentsatz geschädigter Zellen vorliege, der für den Lebensfähigkeitsverlust verantwortlich sei.

Ein großer Nachteil dieser Studie ist die außerordentlich lange Trocknungszeit der Vermehrungskörper. Sie verlieren ihre Lebensfähigkeit erst nach einer Zeitspanne von 10 - 14 Tagen, innerhalb derer die Hydratation lediglich von 170 % auf 110 - 120 % sinkt (Trockengewichtsbasis). So ist die anfängliche Stoffwechselaktivierung mit großer Wahrscheinlichkeit auf einsetzende Keimungsvorgänge zurückzuführen, die eine eindeutige Interpretation der Resultate weiterhin erschwert.

Chin et al. (1981) wählten die ebenfalls unorthodoxen Heveasamen als Objekt; sie betrachteten leider auch nur die Keimwurzelspitze. Außerdem führten sie keine stufenweise ablaufende Entwässerung durch, sondern dehydratisierten die Samen lediglich deutlich unter ihre kritische Hydratation. Als Resultat beschreiben sie zerrissene Zellwände und einen fragmentierten cytoplasmatischen Zellinhalt. Der Zellkern sei unregelmäßig und enthalte stark gefärbte Chromatinbereiche. In manchen Fällen sei eine Kernmembran schlecht erkennbar und ein Nucleolus nicht sichtbar. Die Gummipartikelchen seien ausgeflockt.

Eine Diskussion der in dieser Arbeit dokumentierten subzellulären Veränderungen von Kakaosamen infolge Entwässerung

mit den zitierten Befunden gestaltet sich aufgrund der abweichenden Versuchsanstellung, anderer Trocknungszeiten und -bedingungen, etc. sehr schwierig. Festzuhalten bleibt, daß eine geringfügige Trocknung einsetzende Keimungsprozesse offensichtlich nicht unterbindet und eine mögliche Erklärung des Keimfähigkeitsverlustes infolge Trocknung deren unkontrolliertes Abbrechen bei fortschreitender Entwässerung sein könnte. Ein zweiter Punkt ist, daß getrocknete Heveasamen sehr wohl gut kontrastiertes Chromatin und offensichtlich manchmal einen Nucleolus enthalten, eine Beobachtung, die an Kakaosamen nicht bestätigt werden konnte.

Ein interessanter Aspekt ergibt sich aus einer Beobachtung von Jänicke (1973). Während die Kakaosamen der Reifephase in verschiedenen Gewebebereichen elektronenoptisch bereits den Anschein einer beginnenden Mobilisierungsphase erweckten, verliefen in den anschließenden Keimungsstadien die submikroskopischen Veränderungen in den Samen ähnlich wie in orthodoxen Objekten. Das könnte bedeuten, daß in reifen und eventuell sogar reifenden Kakaosamen Zellen existieren könnten, die sich bereits in Keimungsstimmung befinden, neben solchen, die noch mit der Akkumulation von Reservestoffen beschäftigt sind. Diese Situation könnte auch die Tatsache erklären, daß niemals alle Zellen gleichmäßig stark geschädigt sind.

Abschließend seien den eigenen Befunden noch subzelluläre Aspekte der Keimwurzel überlagerter Kakaosamen gegenübergestellt (Luan und Hill 1980). Die Nachteile einer solchen Versuchsanstellung wurden bereits einleitend erwähnt. Beurteilt man zunächst nur die anfänglichen ultrastrukturellen Aspekte während der Lagerung, so stimmen sie erstaunlich gut mit den von Jänicke (1973) genannten Ultrastrukturveränderungen in keimenden Kakaosamen überein. Der Zeitraum, in dem der Beginn einer Schädigung hätte beobachtet werden können, wurde von den Autoren leider nicht abgepaßt.

Bezüglich des Zellkerns beschreiben die Autoren, er sei mit fortschreitender Lagerdauer weniger häufig zu beobachten. Sei er darstellbar, so sei die Kernmembran zunehmend diskontinuierlich und das elektronendichte Material des Kernplasmas wirke hinsichtlich der Verteilung immer "fleckiger". In geschädigten Zellen könne der Nucleolus nicht mehr als deutlich abgegrenzte Struktur erkannt werden.

Der Zellkern zeigt somit eher Gemeinsamkeiten mit trocknenden Ölpalm- und Mangosamen als mit dehydratisierenden Kakaosamen (Rühl et al. 1989, in prep.).

Die von Luan und Hill (1980) infolge Lagerung beobachteten Vesikel unterscheiden sich deutlich von den in dieser Arbeit präsentierten Vesikeltrauben aufgrund Trocknung. Es handelt sich um unregelmäßig geformte Vesikel mit stark variierender Größe, welche vermutlich beim Verfall cytoplasmatischer Bestandteile wie Mitochondrien, Plastiden oder des Plasmalemmas entstehen.

Interessant ist, daß die Autoren ebenfalls eine Auflockerung der Stärkekornanordnung im Amyloplasten beschreiben. Eine Zerstörung der Plastidendoppelmembranhülle konnten sie jedoch nicht feststellen, vermutlich da sie den entscheidenden Zeitpunkt des Lebensfähigkeitsverlustes nicht in ultrastruktureller Hinsicht analysierten.

Auch hinsichtlich der übrigen Zellbestandteile lassen sich kaum Gemeinsamkeiten mit den in dieser Arbeit geschilderten subzellulären Beobachtungen finden. Zieht man aus

diesem Vergleich ein Resümee, so wird deutlich, daß bei Lagerung - wie anfangs vermutet - offensichtlich ein Zusammenspiel wenigstens zweier Faktoren, Keimung und Trocknung, vorzuliegen scheint.

Zusammenfassend muß gesagt werden, daß eine Reihe der erwogenen Mechanismen der Trocknungsschädigung für Kakaosamen in Frage kommen. Da die Entwässerungszeitspanne relativ lang gewählt werden mußte und eine stärkere Schädigung besonders oberflächlich positionierter Gewebereiche nicht ausgeschlossen werden kann, ist keine exakte Zuordnung der experimentellen Befunde zu einer der denkbaren Mechanismen möglich. In Frage kommt sowohl eine durch Wasserentzug induzierte Desorganisation des Stoffwechsels, eine irreversible Membranschädigung, als auch die Schädigung ganz spezifischer subzellulärer Kompartimente wie der Amyloplasten in den Rindenparenchymzellen der Keimwurzel, welche wiederum sekundäre Reaktionen auslösen können. Auch eine Störung oder Unterbindung des Membranflusses sowie eine fortschreitende Verschlechterung des Kernzustandes, welche im kritischen Feuchtebereich letale Ausmaße annehmen, können nicht außer Acht gelassen werden.

Weitere Hinweise läßt die Betrachtung der Ultrastruktur des Speicherparenchyms der Keimblätter trocknender Kakaosamen erhoffen (Rühl und Biehl 1989). Besonders der Aufbau der Kakaosamen macht eine primäre Schädigung der massigen, die Keimachse vollständig einschließenden Kotyledonen sehr wahrscheinlich.

Zusammenfassung

Die Lagerung besonders tropischer Samen bereitet derzeit noch große Probleme. Eine konventionelle Trockenkaltlagerung, die in der Praxis bei Sammlungen pflanzengenetischer Ressourcen angewendet wird, führt in den meisten Fällen zu einem sofortigen Lebensfähigkeitsverlust der Samen. Da eine Langzeitlagerung der Samen tropischer Pflanzenarten jedoch aus vielerlei Gründen wünschenswert ist, wurden die der konventionellen Saatgutlagerung zugrundeliegenden Parameter "Trocknung" und "Kühlung" hinsichtlich ihrer Wirkung auf Kakaosamen - stellvertretend für unorthodoxe tropische Samenarten - untersucht.

Aufbauend auf den bereits publizierten Befunden sollte die Beobachtung der Ultrastruktur trocknender Kakaosamen weitere Anhaltspunkte für die primäre Ursache der Trocknungssensitivität von Kakaosamen liefern. Es konnte gezeigt werden, daß sich bestimmte subzelluläre Veränderungen in Rindenparenchymzellen der Radikula mit dem Zeitpunkt des Verlustes der Keimfähigkeit von Kakaosamen korrelieren lassen. Mögliche primäre Ursachen dieses Lebensfähigkeitsverlustes von Kakaosamen infolge Entwässerung werden diskutiert.

Investigations in the causes of sensitivity to cold and water stress of tropical seeds, represented by cacao seeds

III. Ultrastructure of the parenchyma cells in radicles of desiccating cacao seeds

At present, particularly the storage of tropical seeds involves great problems. Conventional cold storage of seeds in a desiccated status, which is applied in plant genetic resources

practice, in most cases immediately results in a viability loss of the seeds. Since the long term storage of tropical seeds is desirable due to several reasons, the parameters "desiccation" and "cooling", which build the basis of conventional seed storage, have been investigated in respect to their effect on cacao seeds as a representative of recalcitrant seeds producing tropical crops.

Basing on the already published results, the ultrastructure of dehydrating cacao seeds should give further details on possible primary causes of the sensitivity to water stress. It could be shown, that specific subcellular changes in parenchyma cells of the radicle can be correlated with the point of germinability loss of cacao seeds. Possible primary causes of this viability loss of cacao seeds following desiccation are discussed.

Literatur

Abdul-Baki, A.A. und Baker, J.E.: Are changes in cellular organelles or membranes related to vigour loss in seeds? - Seed Sci. Technol. 1, (1973), S. 89 - 125.

Bain, L.M. und Mercer, F.V.: Subcellular organization of the developing cotyledons of *Pisum sativum* L. - Aust. J. Biol. Sci. 19, (1966), S. 49 - 67.

Beevers, L. und Poulson, R.: Protein synthesis in cotyledons of *Pisum sativum* L. I. Changes in cell-free amino acid incorporation capacity during seed development and maturation. - Plant Physiol. 49, (1972), S. 476 - 481.

Berjak, P., Dini, M., Pammenter, N.W.: Possible mechanisms underlying the differing dehydration responses in recalcitrant and orthodox seeds: desiccation-associated subcellular changes in propagules of *Avicennia marina*. - Seed Sci. Technol. 12, (1984), S. 365 - 384.

Boyer, C.D.: Starch granule formation in developing seeds of *Pisum sativum*: effect of genotype. - Am. J. Bot. 68, (1981), S. 659 - 665.

Brown, D.D. und Gurdon, J.B.: Absence of ribosomal RNA synthesis in the nucleolate mutant of *Xenopus laevis*. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 51, (1964), S. 139 - 146.

Chabot, J.F. und Leopold, A.C.: Ultrastructural changes of membranes with hydration in soybean seeds. - Amer. J. Bot. 69, (1982), S. 623 - 633.

Chen, Y.M., Huang, D.H., Lin, S.F., Lin, C.Y., Key, J.L.: Fractionation of nucleoli from auxin-treated soybean hypocotyl into nucleolar chromatin and preribosomal particles. - Plant Physiol. 73, (1983), S. 746 - 753.

Chin H.F.: Production and storage of recalcitrant seeds in the tropics: seed problems. - Acta Hort. 83, (1978), S. 17-21.

Chin, H.F., Aziz, M., Ang, B.B., Hamzah, S.: The effect of moisture and temperature on the ultrastructure and viability of seeds of *Hevea brasiliensis*. - Seed Sci. Technol. 9, (1981), S. 411 - 422.

Fox, J.E.B. und Phillips, D.R.: Inhibition of actin polymerization in blood platelets by cytochalasins. - Nature 292, (1981), S. 650 - 652.

- Hallam, N.D., Roberts, B.E., Osborne, D.J.: Embryogenesis and germination in rye (*Secale cereale* L.). - *Planta* 105, (1972), S. 293 - 309.
- Hirsch, J.G. und Fedorko, M.E. - *J. Cell Biol.* 38, (1968), S. 629 - 632.
- Horowitz, J.: Ultrastructural observations of cotyledons in dry and developing seeds of round and wrinkled lines of *Pisum*. - *Micron and Microscopica Acta* 14, (1983), S. 207 - 217.
- Jänicke, J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Samen und Blättern von *Theobroma cacao* L. (Kakao). - Examensarbeit, Tierärztliche Hochschule Hannover, (1971).
- Jänicke, J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Embryonen von *Theobroma cacao* L. (Kakao) während der Embryogenese und der Samenkeimung. - Dissertation, Tierärztl. Hochschule Hannover, (1973).
- Key, J.L.: Nucleic acid metabolism. - In: *Plant Biochemistry*. (eds.: Bonner, J. und Varner, E.), Acad. Press, New York, (1976), S. 463 - 500.
- Klein, S. und Ben-Shaul, Y.: Changes in cell fine structure of lima bean axes during early germination. - *Can. J. Bot.* 44, (1966), S. 331 - 340.
- Klein, S. und Pollock, B.M.: Cell fine structure of developing lima bean seeds related to seed desiccation. - *Amer. J. Bot.* 55, (1968), S. 658-672.
- Kristen, U. und Lockhausen, J.: Estimation of golgi membrane flow rates in ovary glands of *Aptenia cordifolia* using cytochalasin B. - *Europ. J. Cell Biol.* 29, (1983), S. 262 - 267.
- Lockhausen, J. und Kristen, U.: Effects of cytochalasin B on the mitochondria and the golgi apparatus in ovary gland cells of *Aptenia cordifolia*. - *Zeitschr. f. Pflanzenphysiol.* 110, (1983), S. 191 - 199.
- Luan, H.Y. und Hill, M.J.: Ultrastructural changes associated with seed deterioration in cocoa (*Theobroma cacao* L.). - 19th ISTA Congress, Vienna, June 6-13, (1980), Preprint No. 9, Section I.
- Mc Conkey, E.H. und Hopkins, J.W.: The relationship of the nucleolus to the synthesis of RNA in HeLa cells. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51, (1964), S. 1197 - 1204.
- Nautiyal, A.R. und Purohit, A.N.: Seed viability in sal. I. Physiological and biochemical aspects of seed development in *Shorea robusta*. - *Seed Sci. Technol.* 13, (1985a), S. 59-68.
- Nautiyal, A.R. und Purohit, A.N.: Seed viability in sal. II. Physiological and biochemical aspects of ageing in seeds of *Shorea robusta*. - *Seed Sci. Technol.* 13, (1985b), S. 69-76.
- Nautiyal, A.R. und Purohit, A.N.: Seed viability in sal. III. Membrane disruption in ageing seeds of *Shorea robusta*. - *Seed Sci. Technol.* 13, (1985c), S. 77-82.
- Öpik, H.: The ultrastructure of coleoptile cells in dry rice (*Oryza sativa* L.) grains after anhydrous fixation with osmium tetroxide vapour. - *New Phytol.* 85, (1980), S. 521 - 529.
- Paulson, R.E. und Srivastava, L.M.: The fine structure of the embryo of *Lactuca sativa*. I. Dry embryo. - *Can. J. Bot.* 46, S. 1437.
- Perner, E.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Zellen von Embryonen im Zustand völliger Samenruhe. I. Mitteilung: Die zelluläre Strukturordnung in der Radicula luftgetrockneter Samen von *Pisum sativum* L. - *Planta* 65, (1965), S. 334 - 357.
- Petruzzelli, L., Lioi, L., Carello, G., Morgutti, S., Coccuti, S.: The effect of fusicoccin and monovalent cations on the viability of wheat seeds. - *J. Exp. Bot.* 33, (1982), S. 118 - 124.
- Petruzzelli, L. und Carella, G.: The effect of ageing conditions on loss of viability in wheat (*Triticum durum*). - *J. Exp. Bot.* 34, (1983), S. 221 - 225.
- Reynolds, E.S.: The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. - *J. Cell Biol.* 17, S. 208 - 212.
- Roberts, E.H.: Loss of seed viability during storage. - *Adv. Res. Technol. Seeds, ISTA, Part 8*, (1983), S. 9 - 34.
- Roos, E.E.: Physiological, biochemical, and genetic changes in seed quality during storage. - *Hort. Sci.* 15, (1980), S. 781 - 784.
- Rühl, G.F.: Untersuchungen zu den Ursachen der Kühlungs- und Trocknungsempfindlichkeit von Kakaosamen. - Dissertation, Techn. Universität Braunschweig, (1986).
- Rühl, G.F., Dambroth, M. und Biehl, Böle: Untersuchungen zu den Ursachen der Kühlungs- und Trocknungsempfindlichkeit tropischer Samen am Beispiel des Kakao. I. Einfluß des Samenentwicklungszustandes. - *Landbauforschung Völkenrode* 38 (3), (1988a), S. 220 - 234.
- Rühl, G.F., Dambroth, M. und Biehl, Böle: Untersuchungen zu den Ursachen der Kühlungs- und Trocknungsempfindlichkeit tropischer Samen am Beispiel des Kakao. II. Trocknungsparameter und Exsudation trocknender Kakaosamen und Kakaosamenorgane. - *Landbauforschung Völkenrode* 38 (3), (1988b), S. 235 - 251.
- Rühl, G.F., und Biehl, Böle: Untersuchungen zu den Ursachen der Kühlungs- und Trocknungsempfindlichkeit tropischer Samen am Beispiel des Kakao. IV. Ultrastruktur des Speicherparenchyms der Kotyledonen trocknender Kakaosamen. - *Landbauforschung Völkenrode* 39 (1), (1989), S. 15 - 27.
- Schulz, D.: Darstellung der submikroskopischen Strukturen lufttrockener Moossporen. - *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 85, (1972), S. 193 - 202.
- Sommer, J.: Elektronenmikroskopische Analyse des Aktivitätswechsels bei Samen von *Agrostemma githago* L. während der Reifung, Ruhe und Keimung. - Dissertation, Technische Universität Hannover, (1973).
- Spurr, A.R.: A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. - *J. Ultrastr. Res.* 26, (1969), S. 31 - 43.
- Steponkus, P.L.: Role of the plasmamembrane in freezing

injury and cold acclimation. - Ann. Rev. Plant Physiol. 35, (1984), S. 543 - 584.

Swift, J.G. und O'Brien, T.P.: The fine structure of the wheat scutellum before germination. - Aust. J. Biol. Sci. 25, (1972), S. 9 - 22.

Villiers, T.A.: Genetic maintenance of seeds in imbibed storage. - In: Crop genetic resources for today and tomorrow. (eds.: Frankel, O.H. und Hawkes, J.G.), Cambridge University Press, Cambridge, London, New York, Melbourne, (1975), S. 297 - 316.

Warner, J.R. und Soeiro, R.: Nascent ribosomes from HeLa cells. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58, (1967), S. 1984 - 1990.

Webster, B.D. und Leopold, A.C.: The ultrastructure of dry and imbibed cotyledons of soybean. - Amer. J. Bot. 64, (1977), S. 1286 - 1293.

Weinberg, R.A. und Penman, S.: Processing of 45S nucleolar RNA. - J. Mol. Biol. 47, (1970), S. 169 - 178.

Yatsu, L.Y.: The ultrastructure of cotyledonary tissue from *Gossypium hirsutum* L. seeds. - J. Cell Biol. 25, (1965), S. 193 - 199.

Verfasser: Rühl, Gerhard, Dr. rer. nat.; Dambroth, Manfred, Prof. Dr., Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), Leiter: Prof. Dr. Manfred Dambroth.