

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

### V. Kritische Temperatur und Exsudation gekühlter Kakaosamen und Kakaosamenorgane

GERHARD RÜHL, MANFRED DAMBROTH und BÖLE BIEHL

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung

#### Einleitung

Hinsichtlich der Trocknungs- und Kühlungstoleranz unterscheidet man orthodoxe und unorthodoxe ("recalcitrante") Samenarten (Roberts 1973). Die bereits früher präsentierten Untersuchungen befaßten sich mit der Trocknungssensitivität von Kakaosamen, einem extremen Vertreter der unorthodoxen Samenarten (Rühl et al. 1988a,b; Rühl und Dambroth 1989; Rühl und Biehl 1989).

Auch eine Kühlungssensitivität ist in der Literatur häufig für Kakaosamen beschrieben worden, wenn auch die Angaben zu letalen Temperaturen recht widersprüchlich sind (Pyke et al. 1934, Pyke 1935, Hunter 1959, Boroughs und Hunter 1961, Swarbrick 1964, Zinc und Rochelle 1964, Barton 1965).

Bezüglich der Ursachen dieser Kühlungsempfindlichkeit sind die Literaturhinweise recht spärlich. Sie beschränken sich meist nur auf die reine Beobachtung von Lagerungsexperimenten bei niedrigen Temperaturen mit Phänomenen wie Braunfärbung (Pyke et al. 1934) oder dem Auslaufen der Gerbstoffe aus den Polyphenolspeicherzellen (Ibanez et al. 1965).

Somit erschienen entsprechende Untersuchungen zur Eingrenzung des primär infolge Temperatursenkung in Mitleidenschaft gezogenen Kompartiments sehr reizvoll. Unter Anwendung einer abgewandelten Kühlmethode sollte zunächst die exakte kritische Temperatur von Kakaosamen ermittelt sowie der Einfluß der Parameter Kühlrate und Samenhydratation während der Applikation niedriger Temperaturen auf die Lebensfähigkeit der Samen getestet werden. Exsudationsversuche dienen erneut der Überprüfung der Rolle von Membranen beim Keimfähigkeitsverlust von Kakaosamen infolge Temperaturabsenkung. Über Veränderungen der subzellulären Struktur infolge Kühlung wird die nächste Publikation berichten (Rühl et al. 1989, in press).

#### 1 Material und Methoden

##### 1.1 Samenmaterial

Reife sowie vorreife Kakaofrüchte wurden vom Centro Agronomico Tropical de Investigación 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 bekannten 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.

##### 1.2 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.

##### 1.3 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 Polyethylenglycollösungen (PEG 4000) bestimmter Konzentration auf eine gewünschte Hydratation entwässert.

##### 1.4 Kühlung

Die Kühlung erfolgte durch Einbringen der Samen in eine auf eine definierte Temperatur vorgekühlte, annähernd mit den Samen isotonische wässrige PEG 4000-Lösung, um möglichst schnell unter Ausschluß von Einquellvorgängen die gewünschte Temperatur zu erreichen. Auch hierfür wurden die Samen vor der Behandlung aller sie umgebenden Hüllstrukturen (Fruchtwand, Samenschale) entledigt.

##### 1.5 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 (%H<sub>2</sub>O/Frischgewicht) angegeben.

##### 1.6 Messung der Exsudationsrate einquellender Samen

Von der Testa befreite frische sowie vorgetrocknete reife Samen und Samenorgane wurden in dest. Wasser gegeben

und die zeitliche Veränderung der Leitfähigkeit der Imbibitionsflüssigkeit bei einer Temperatur von 30° C über einen Zeitraum von 6 - 7 Stunden bestimmt. Es wurden stets 5 ganze Kakaosamen bzw. 8 Kotyledonen in 40 ml oder 7 Keimachsen in 15 ml bidestilliertem Wasser imbibiert und parallel dazu die Wasseraufnahme der Samen und Samentteile durch Differenzwägung bestimmt. Im Falle der Erdnußsamen wurden 20 Kotyledonen in 40 ml A. bidest. bzw. 10 Keimachsen in 15 ml A. bidest. eingequollen.

### 1.7 Ermittlung der Wasseraufnahme von Kakaο- und Erdnußsamen

Jeweils 3 Kakaosamen, 6 Kotyledonen bzw. 3 Radikulae wurden eingewogen und sofort in A. bidest gegeben. Im Falle von Erdnußsamen wurden stets 10 Samen, 20 Keimblätter sowie 10 Keimachsen eingesetzt, da die zur Verfügung stehende Samenmenge erheblich größer war. Nach bestimmten Einquellzeiten wurden die Samen oder Samentteile kurz mit Papier trockengetupft und sofort gewogen. Die sich ergebende Differenz zwischen Ein- und Rückwaage wurde als aufgenommene Wassermenge bezeichnet.

### 3 Ergebnisse

Die mangelnde Kühlfähigkeit von Kakaosamen stellt das zweite Hindernis auf dem Weg zur Entwicklung einer Langzeitlagermethode dar. Deshalb lag es nahe, auch nach den Ursachen dieses Problems zu suchen, besonders da es möglich

erschien, daß ein generelles Phänomen beide Effekte verursacht, die Kühlungs- und Trocknungssensitivität.

Ansätze boten die Kühlgeschwindigkeit, die Samenhydratation während der Kühlung, die Exsudation von Kakaosamen nach Inkubation in Lösungen bestimmter, definierter Temperatur sowie die Betrachtung der Ultrastruktur von Kakaosamen im Vergleich zu orthodoxen Erdnußsamen nach Applikation von Temperaturen, die eine Kühlschädigung induzieren sollten ( Pyke et al. 1934, Rees 1963, Chako und Singh 1971).

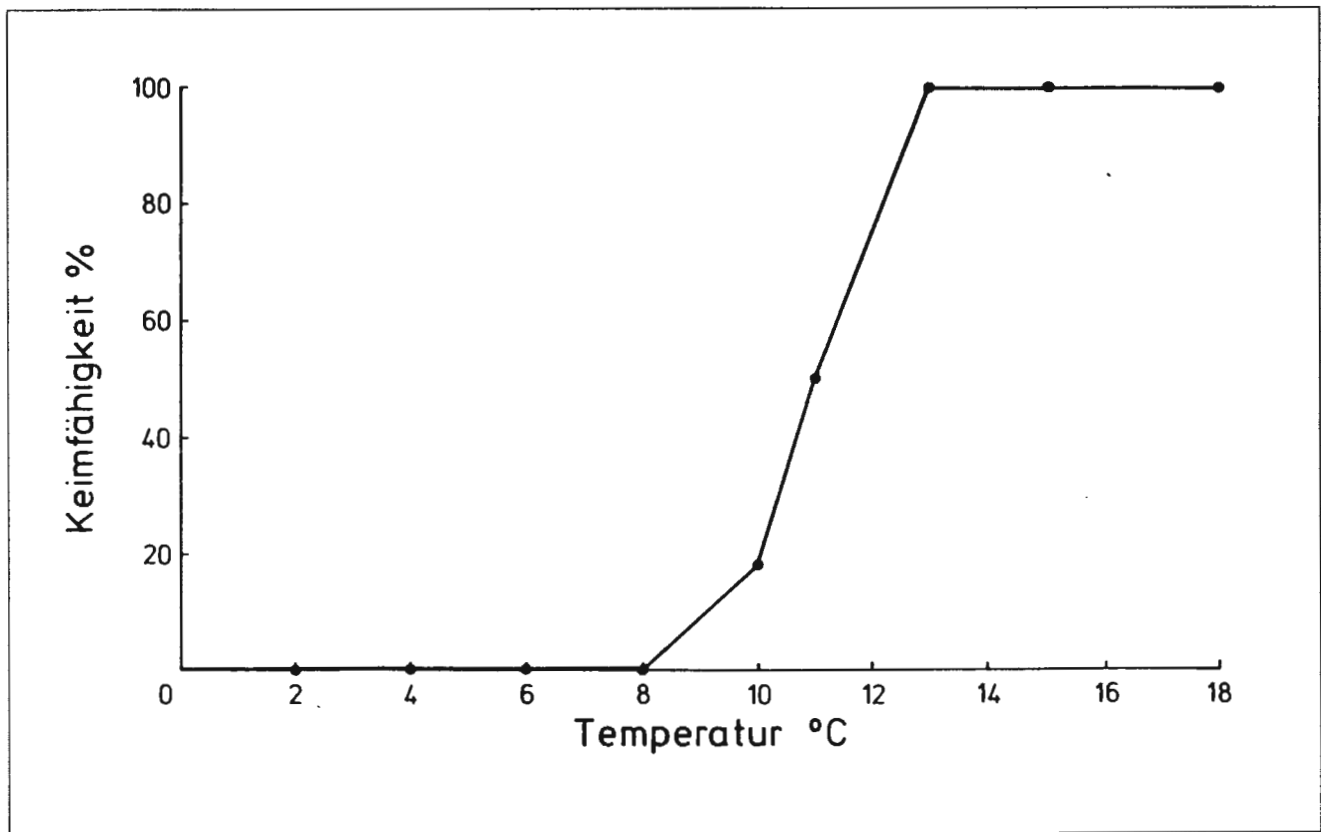
### 2.1 Kühlmethode

Die Kühlung der unorthodoxen Kakaosamen fand stets in einer 32 %igen Lösung von PEG 4000 statt. Diese PEG 4000-Konzentration hatte sich für Kakaosamen als am besten geeignet erwiesen, da reife Kakaosamen darin weder eine nennenswerte Ab- noch eine Zunahme ihres Frischgewichtes zeigten (Rühl 1986).

Eine Kühlung an der Luft bot sich deshalb nicht an, da einerseits die Samen während des Kühlprozesses eine gewisse Trocknung erführen, andererseits - z.B. bei Umgehung dieser Dehydratation durch Positionierung über einer gesättigten Kupfersulfatlösung - der Zeitpunkt, an dem die Samen eine bis ins Innere reichende Kühlung auf die gewünschte Temperatur erfahren haben, mit Hilfe dieser Methode nicht abschätzbar ist.

Abbildung 1: Keimfähigkeit gekühlter Kakaosamen

Verwendet wurden reife Kakaosamen einer Hydratation von  $33,1 \pm 1,6$  %, einer Keimfähigkeit von 100 % sowie eines mittleren Frischgewichtes von  $1,8 \pm 0,2$  g/Same. Die Samen wurden eine Stunde lang in vortemperierter 32 %iger wässriger Lösung von PEG 4000 belassen. Die Aufrechterhaltung der Temperatur wurde mittels Klimakammern (Reichart-Kammern, Fa. BBC-York) erreicht. Eingesetzt wurden stets 20 Samen pro gewählter Temperatur. Angegeben sind die Mittelwerte aus zwei Wiederholungen.



Im Falle des Eintauchens von Kakaosamen in eine Lösung von PEG 4000 konnte man hingegen davon ausgehen, daß die Samen mit absoluter Sicherheit nach einer Stunde durchgekühlt waren und diese somit bereits nach dieser relativ kurzen Zeitspanne auf Schädigungen untersucht werden konnten.

Erdnußsamen konnten hingegen bedenkenlos in Polyethylenbeuteln über einen Zeitraum von 24 Stunden hinweg gekühlt werden, da sie ohnehin bereits auf 5 - 7 % Feuchte getrocknet worden waren.

## 2.2 Ermittlung der für Kakaosamen kritischen Temperatur

Die Literaturangaben zur Temperatur, bei deren Unterschreitung Kakaosamen ihre Keimfähigkeit verlieren, sind recht widersprüchlich. Die Werte dazu schwanken zwischen 5° C (Zinc und Rochelle 1964) und 15,5° C (Pyke et al. 1934).

Für die Korrelation von Veränderungen bestimmter Eigenschaften der Kakaosamen (Exsudationsratensteigerung, Ultrastruktur) mit dem Keimfähigkeitsverlust war es jedoch unbedingt erforderlich, die kritische Temperatur exakt zu ermitteln.

Reife Kakaosamen eines mittleren Wassergehaltes von 33 % wurden zu diesem Zwecke eine Stunde lang in vortemperierter 32 %iger wässriger Lösung von PEG 4000 belassen. Da stets 20 Samen in 500 ml PEG 4000-Lösung gegeben wurden, konnte keine nennenswerte Erwärmung der Lösung eintreten. Die Aufrechterhaltung der Temperatur während des Kühlprozesses gewährleisteten Klimakammern (Reichart-Kammern der Fa. BBC-York).

Eine derartige einstündige Inkubation zeigte für reife Kakaosamen einen kritischen Temperaturbereich von 10 - 12° C auf (Abb. 1).

Vergleichend angestellte Experimente mit etwas vorreifen Kakaosamen (Wassergehalt: 62,3 ± 4,2 %) bestätigten diesen Temperaturbereich auch für einen derartigen Entwicklungszustand von Kakaosamen unter denselben Versuchsbedingungen.

Die Keimtests gekühlter Kakaosamen offenbarten in diesem Zusammenhang ein sehr bemerkenswertes Phänomen. Obwohl die Kotyledonenoberfläche geschädigter Samen sehr bald eine dunkelbraun bis schwarze Färbung aufwies, konnte man in den ersten vier Tagen der Imbibition erstaunlicherweise noch ein Vorschieben der Radikula um durchschnittlich 5 mm, im Extremfall bis zu 15 mm, beobachten. Die Radikulaoberfläche war dabei stets einheitlich braun gefärbt.

Dieses Verhalten kann man dahingehend deuten, daß durch Kühlung selektiv nur bestimmte Samenteile geschädigt werden, nämlich die Keimblätter von Kakaosamen.

Ein weiteres Indiz für diesen Sachverhalt bildet eine Untersuchung von Casa s et al. (1965), in der die Autoren infolge Kälte nur eine Veränderung der Atmungsrate von Keimblättern, nicht jedoch der Keimachse konstatierten.

In den folgenden Experimenten zur Kühlung von Kakaosamen wird aus diesem Grunde stets ein Vergleich zwischen Radikula- und Kotyledonargewebe vorgenommen.

Erdnußsamen einer Hydratation von 5 - 7 % konnten, wie

erwartet, ohne Einbuße der Lebensfähigkeit auf -20° C gekühlt werden. Einquellung auf eine Feuchte von etwa 40 % führte zwar - ebenfalls erwartungsgemäß - zu einem Verlust dieser Gefiertoleranz, nicht aber zur Ausbildung einer Empfindlichkeit gegenüber Temperaturen von 1 - 8° C.

## 2.3 Einfluß der Kühlgeschwindigkeit auf den Verlust der Lebensfähigkeit von Kakaosamen infolge Kühlung

Die überdurchschnittliche Größe von Kakaosamen könnte durchaus dazu führen, daß bei Kühlung mit hohen Kühlraten eine Schädigung durch Aufbau eines Temperaturgradienten eintritt, der sich von der Kotyledonenoberfläche ins Zentrum des Samens erstreckt. Eine schrittweise Verringerung der Kühlgeschwindigkeit sollte den Einfluß eines derartigen Effektes zeigen bzw. ausschließen.

Die Kakaosamen befanden sich erneut in 32 %iger wässriger PEG-Lösung. In diesem Falle besaß die Lösung zu Versuchsbeginn Zimmertemperatur, das Volumen der PEG-Lösung war je nach gewünschter Kühlgeschwindigkeit größer oder kleiner gewählt. Die Kühlung wurde erneut unter Verwendung der Reichart-Kammern (Fa. BBC-York) erzielt.

Betrachtet wurden sowohl reife Kakaosamen (Hydratation: 34,5 ± 2,8 %) als auch vorreife Samen (Hydratation: 67,8 ± 5,0 %).

Appliziert wurden Kühlgeschwindigkeiten von 0,5° C, 0,2° C, 0,1° C sowie 0,04° C pro Minute. Das Ergebnis läßt sich schnell zusammenfassen:

Keine der gewählten Kühlraten führte zu einer Verringerung der Kühlungsempfindlichkeit der beiden gewählten Entwicklungsstadien von Kakaosamen. Zeitentnahmen demonstrierten weiterhin, daß selbst der kritische Temperaturbereich in der ermittelten Größenordnung (s. 2.1) aufrechterhalten bleibt.

## 2.4 Kühlung von Kakaosamen in Abhängigkeit von ihrer Hydratation

Dieser Versuchsansatz sollte prüfen, ob eventuell der hohe Wassergehalt der Kakaosamen zu deren Kälteempfindlichkeit beiträgt und ob eine Verringerung der Samenfeuchte eine Kühlung dieser Samen ermöglicht.

Zu diesem Zwecke wurden Kakaosamen mittels einer Konzentrationsreihe wässriger Lösungen von PEG 4000 auf unterschiedliche Hydratationen bis nahe an den kritischen Feuchtebereich heran getrocknet und anschließend in den PEG-Lösungen eine Stunde lang auf 5° C gekühlt.

Verglichen wurden erneut reife Kakaosamen mit einer Feuchte von 32,3 ± 1,9 % bei einer Keimfähigkeit von 100 % und vorreife Samen einer Hydratation von 77,2 ± 6,4 % sowie einer Keimfähigkeit von nur 50 %. Keiner der auf diese Weise behandelten Samen überlebte die Kühlung (Abb. 2 und 3).

Führt man sich erneut das Indiz vor Augen, welches auf eine selektive Schädigung der Kotyledonen von Kakaosamen hindeutet (s. 2.2) und erinnert man sich der Tatsache, daß die Keimachse stets eine höhere Hydratation innehat als die Keimblätter (Rühl et al. 1988 b), so erscheint es durchaus möglich, daß gerade das Gegenteil, also eine Einquellung der

Abbildung 2: **Kühlung reifer Kakaosamen in Abhängigkeit von ihrer Hydratation**

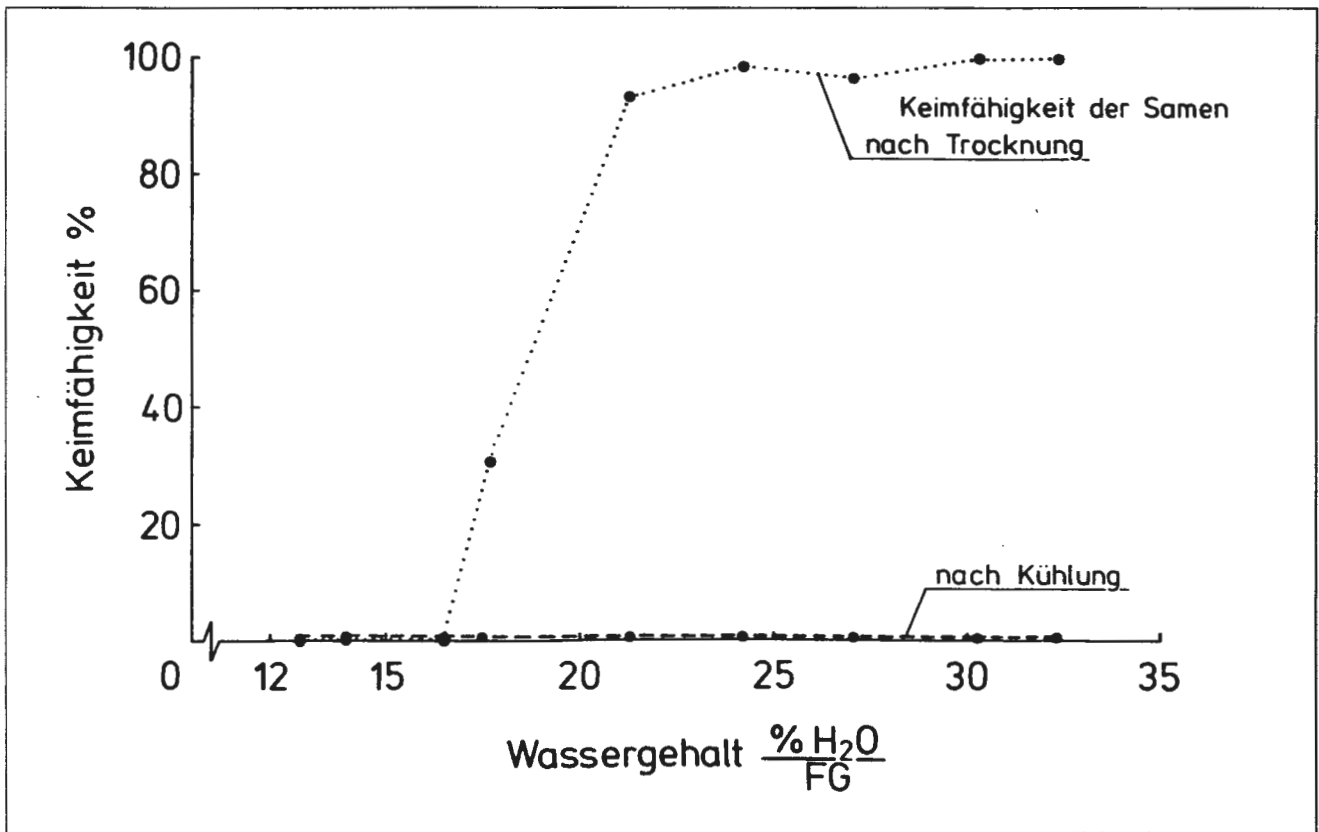
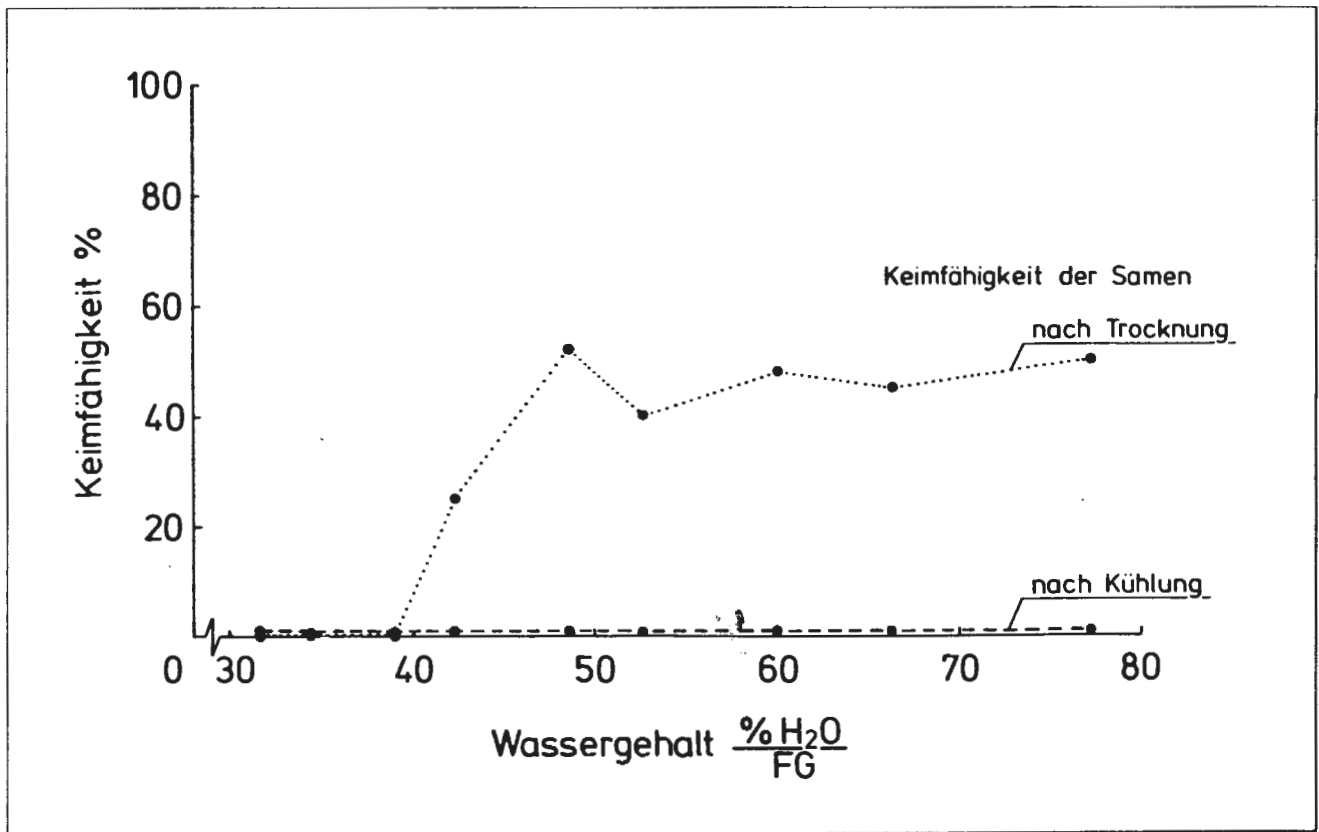


Abbildung 3: **Kühlung vorreifer Kakaosamen in Abhängigkeit von ihrer Hydratation**



Legende zu den Abbildungen 2 und 3:

Verwendet wurden reife Kakaosamen einer Hydratation von  $32,3 \pm 1,9$  %, einer Keimfähigkeit von 100 % sowie eines mittleren Frischgewichtes von  $2,0 \pm 0,2$  g/Same (Abb. 1) sowie vorreife Kakaosamen einer Hydratation von  $77,2 \pm 6,4$  %, einer Keimfähigkeit von 50 % und einem mittleren Frischgewicht von  $0,9 \pm 0,4$  g/Same (Abb. 2).

Die Entwässerung erfolgte durch Einbringen der Samen in wässrige Lösungen von PEG 4000 unterschiedlicher Konzentration (20-70%). Die Trocknungsdauer betrug 72,2 h, die Trocknungstemperatur  $22^\circ\text{C}$ .

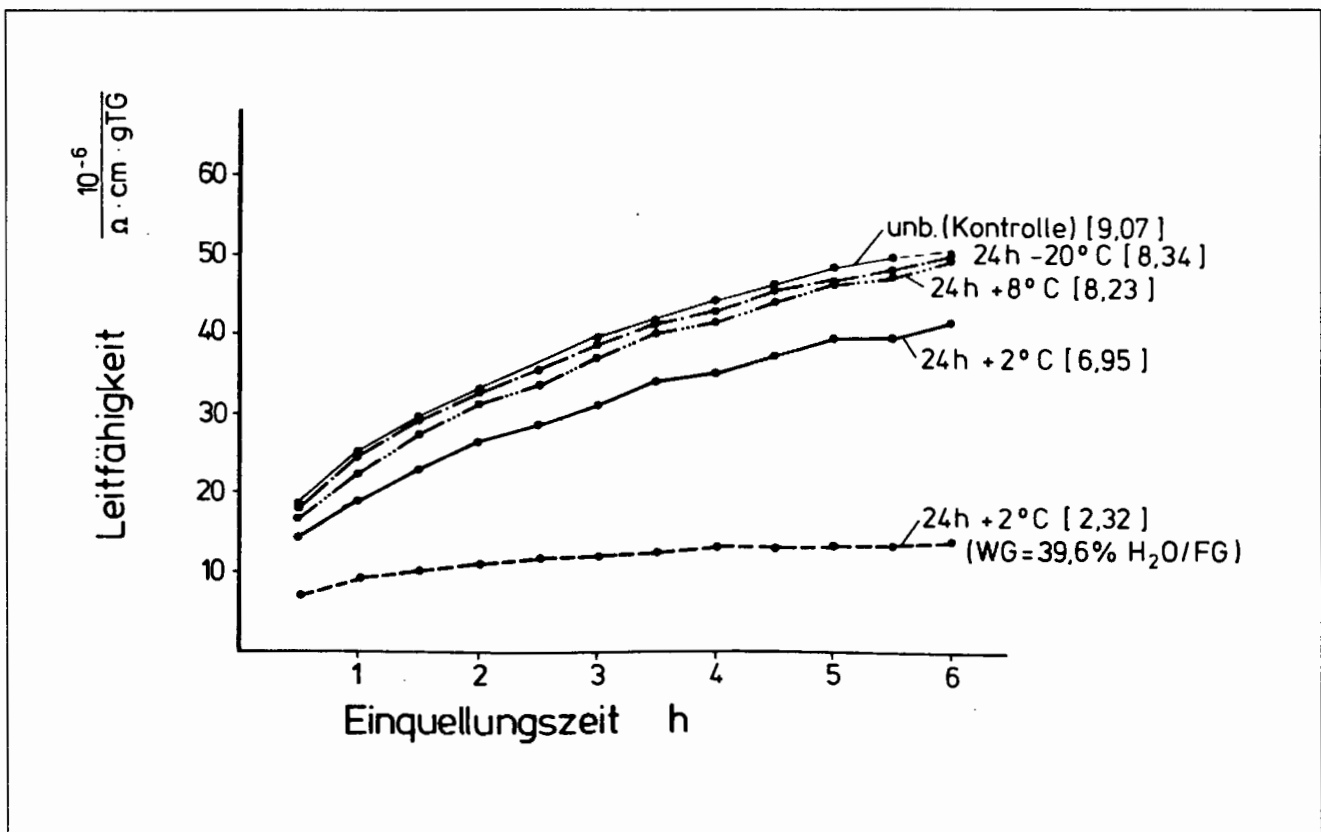
Die anschließende Kühlung wurde in den PEG-Lösungen durchgeführt, welche zu diesem Zwecke in ein Kältebad ( $5^\circ\text{C}$ ) gestellt wurden. Die Kühldauer von 1 h wurde von dem Zeitpunkt an gerechnet, an dem die PEG-Lösung die Temperatur von  $5^\circ\text{C}$  erreichte.

Eingesetzt wurden 30 Samen pro PEG 4000-Konzentrationsstufe. Von diesen wurden nach der Trocknung 6 Samen zur Wassergehaltsbestimmung verwendet sowie je 12 Samen für die Keimtests nach Trocknung bzw. nach anschließender Kühlung eingesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte aus 2 Wiederholungen.

Kotyledonen für die Vermeidung einer Kühschädigung notwendig sein könnte.

Dieses Experiment wurde lediglich mit reifen Kakaosamen vorgenommen, die bei 20 bzw.  $30^\circ\text{C}$  in A. dest auf Wassergehalte bis zu 51 % eingequollen wurden. Eine derartige Imbibition erzielte hinsichtlich der Kotyledonen eine Anhebung der Hydratation von 32,8 % auf 49,8 %. Aber auch dieser Feuchtegehalt der Samen vor Kühlungsbeginn konnte die Kälteempfindlichkeit der Kakaosamen nicht aufheben.

Abbildung 4: Exsudation gekühlter Erdnußkotyledonen



Fazit bleibt, daß die Ursache der Kälteempfindlichkeit von Kakaosamen offensichtlich unabhängig vom Feuchtegehalt dieser Samen ist.

## 2.5 Exsudation gekühlter Kakao- und Erdnußsamen

Es wurde bereits in einem früheren Artikel zu dieser Publikationsreihe ausgeführt, daß eine erhöhte Exsudationsrate von Samen oder Samenteilen stets ein gutes Indiz für eine Veränderung von Zellmembranen, besonders des Plasmalemmas darstellt (Rühl et al. 1988 b). Somit erschien die Anwendung dieser Methode auf gekühlte Organe des Kakaosamens besonders erfolgsträchtig hinsichtlich der Klärung der Frage, ob Grenzflächenveränderungen in Kakaosamen auch infolge Kühlung eine entscheidende Rolle spielen können.

Der Vergleich mit Erdnußsamen sollte erneut der Absicherung dienen, daß eine Exsudationssteigerung gekühlter Kakaosamenorgane bei Einquellung ein typisch unorthodoxes Verhalten darstellt.

Von Bedeutung konnte auch in diesem Falle nur eine sprunghafte Änderung der Exsudationsrate im kritischen Temperaturbereich sein, welche außerdem irreversibel über den Beobachtungszeitraum von 6 Stunden aufrechterhalten bleiben mußte.

Gemessen wurde wiederum nur die Zunahme der Leitfähigkeit des Einquellwassers sowie parallel dazu die Wasseraufnahme des Samenmaterials.

Legende zu Abbildungen 4 und 5:

Verwendet wurden reife Erdnußsamen einer Hydratation von 5 - 6 %, einer Keimfähigkeit von 90 % und eines mittleren Frischgewichtes von  $0,35 \pm 0,05$  g/Same.

Einquellung auf einen Wassergehalt von 39,6 % wurde bei 22° C in A. bidest vollzogen.

Einfrieren bzw. Kühlen der Samen erfolgte in Polyethylenbeuteln in einer Kühltruhe (-20° C), einem Kühlraum (+2° C) sowie einem Kühlschranks (+8° C). Die Leitfähigkeit des Einquellwassers wurde im Versuch mit einem Meßgerät der Fa. Philips (Mod. PW 9501) bestimmt.

Während der Messung wurde eine Temperatur von 30° C aufrechterhalten.

Angabe sind die Mittelwerte aus 4 Wiederholungen. Hinter der Bezeichnung der Kurven sind die gemittelten Exsudationsraten in eckigen Klammern vermerkt.

### 2.5.1 Exsudation gekühlter Erdnußsamen

Diese Untersuchung beschränkte sich auf die Betrachtung der einzelnen Samenorgane, also die Keimachse und die Keimblätter.

Die eingesetzten Erdnußsamen besaßen eine Hydratation von 5 - 7 %. Mit der unbehandelten Kontrolle verglichen wurden Samenorgane aus Erdnußsamen, die eingeschlossen in Polyethylenbeuteln 24 Stunden lang einer Temperatur von -20° C, +2° C bzw. +8° C ausgesetzt worden waren.

Erforderlich war weiterhin für einen direkten Vergleich mit Kakaosamen die Kühlung (24 Stunden +2° C) eingequollener Erdnußsamen, um bei einem etwa vergleichbaren Wassergehalt den Einfluß der Kühlung auf die Exsudationsrate der Samenorgane zu prüfen.

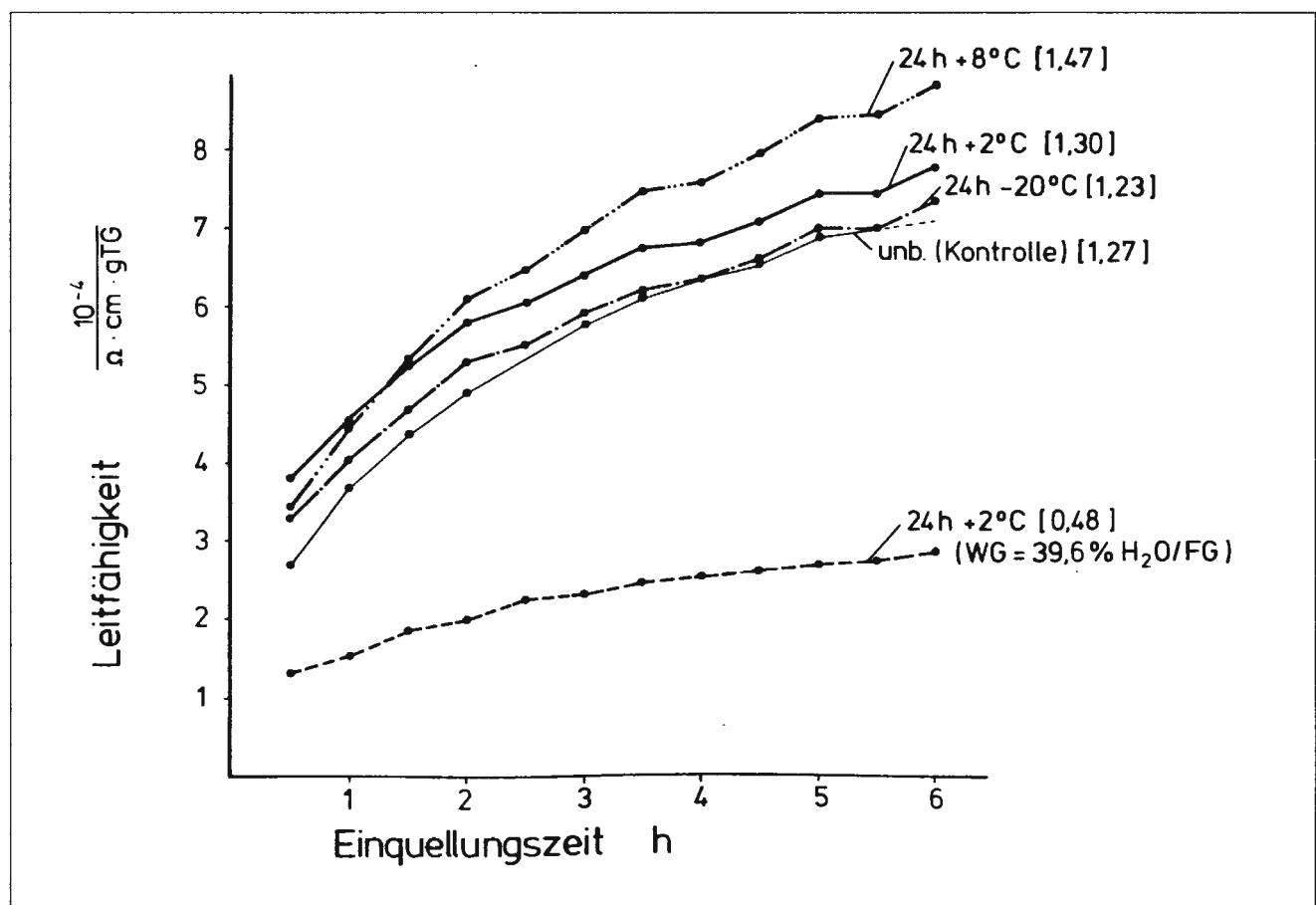
Abbildungen 4 und 5 zeigen das für Samenorgane orthodoxer Samen erwartete Bild. Bis auf die Proben mit erhöhtem Wassergehalt verlaufen alle Exsudationskurven nahezu parallel. Auch die 24 Stunden auf eine Temperatur von 8° C gekühlten Erdnußsamen weichen hinsichtlich der Exsudationsrate ihrer Keimachsen ein wenig stärker von der unbehandelten Kontrolle ab (16 %). Bedenkt man jedoch, daß die Keimfähigkeit der verwendeten Erdnußsamen - trotz gründlicher visueller Auslese erkennbar geschädigter oder bereits angekeimter Samen - lediglich 90 % beträgt, so erscheint diese Abweichung kaum bedeutsam.

Die erheblich geringere Exsudationsrate bereits vor der Kühlung eingequollener Erdnußsamen ist ebenfalls verständlich, da die Plasmagrenzflächen voll hydratisierter Zellen eine bessere Diffusionsbarriere für Elektrolyte darstellen als diejenigen stark entwässerten Gewebes.

### 2.5.2 Exsudation gekühlter Kakaosamen

Im Gegensatz zu Untersuchungen der Exsudation von Erdnußsamen wurden im Falle von Kakaosamen neben den Samenorganen auch die ganzen Samen in die Betrachtung mit

Abbildung 5: Exsudation gekühlter Erdnußradikulae



Legende zu den Abbildungen 6 - 8:

Verwendet wurden reife Kakaosamen einer Hydratation von  $32,9 \pm 2,6$  %, einer Keimfähigkeit von 100 % sowie eines mittleren Frischgewichtes von  $1,7 \pm 0,2$  g/Same. Die einstündige Kühlung wurde durch Einbringen der Samen in vortemperierte (Reichart-Kammern) 32 %ige wässrige PEG 4000-Lösung erzielt.

Die Leitfähigkeit des Einquellwassers wurde im Versuch mit einem Meßgerät der Fa. Philips (Mod. PW 9501) ermittelt.

Während der gesamten Messung wurde eine Temperatur von  $30^{\circ}\text{C}$  aufrechterhalten.

Angegeben sind die Mittelwerte aus 4 Wiederholungen. Hinter der Bezeichnung der Kurven sind die gemittelten Exsudationsraten in eckigen Klammern vermerkt.

einbezogen. Dabei wurde sich auf die Testung reifer Samen beschränkt.

Die Kühlung der Samen wurde durch Einbringen in vortemperierte 32 %ige Lösungen von PEG 4000 erzielt. Für die einstündige Aufrechterhaltung der Temperatur sorgten wiederum Reichart-Kammern.

Betrachtet man zunächst die Situation isolierter Keimblätter (Abb. 6), so zeigt sich sehr eindrucksvoll, daß eine sprunghafte und irreversible Zunahme der Exsudationsrate exakt bei der Imbibition von Kotyledonen solcher Samen auftritt, welche zuvor eine Stunde lang auf die kritische Temperatur

von  $10 - 12^{\circ}\text{C}$  gekühlt worden waren; das bedeutet, es liegt eine ausgezeichnete Übereinstimmung dieser Exsudationssteigerung mit dem Zeitpunkt des Keimfähigkeitsverlustes im kritischen Temperaturbereich vor.

Ganz im Gegensatz zu den Kotyledonen zeigen die Keimachsen gekühlter Kakaosamen keine gesteigerte Exsudationsrate (Abb. 7). Nahezu alle Kurven laufen parallel, eine leicht erhöhte Exsudationsrate weisen nur die unbehandelte Kontrolle sowie die höchste applizierte Temperatur ( $1$  Stunde  $18^{\circ}\text{C}$ ) auf.

Dieser Befund unterstreicht sehr deutlich die Vermutung, daß der Ort der Kälteempfindlichkeit im Kakaosamen tatsächlich die Keimblätter sind, während die Keimachse durch Kälte offensichtlich erst sekundär als Folge der Schädigung der Kotyledonen in Mitleidenschaft gezogen wird.

Betrachtet man zum Schluß die Situation für ganze gekühlte Samen, so findet man zunächst die Temperaturgrenzverhältnisse der Kotyledonen bestätigt (Abb. 8). Das heißt, eine deutliche Zunahme der Exsudationsrate tritt bei Temperaturen unterhalb von  $13^{\circ}\text{C}$  auf, erstmalig bei  $11^{\circ}\text{C}$ .

Ungewöhnlich ist jedoch der Kurvenverlauf der Exsudation infolge Kühlung geschädigter Kakaosamen, da die Exsudationsrate untypischerweise mit fortschreitender Einquellzeit ansteigt. Eine Erklärungsmöglichkeit dafür ist, daß das die Kakaosamen umgebende Silberhäutchen anfangs die Exsudate

Abbildung 6: Exsudation gekühlter Kakaokotyledonen

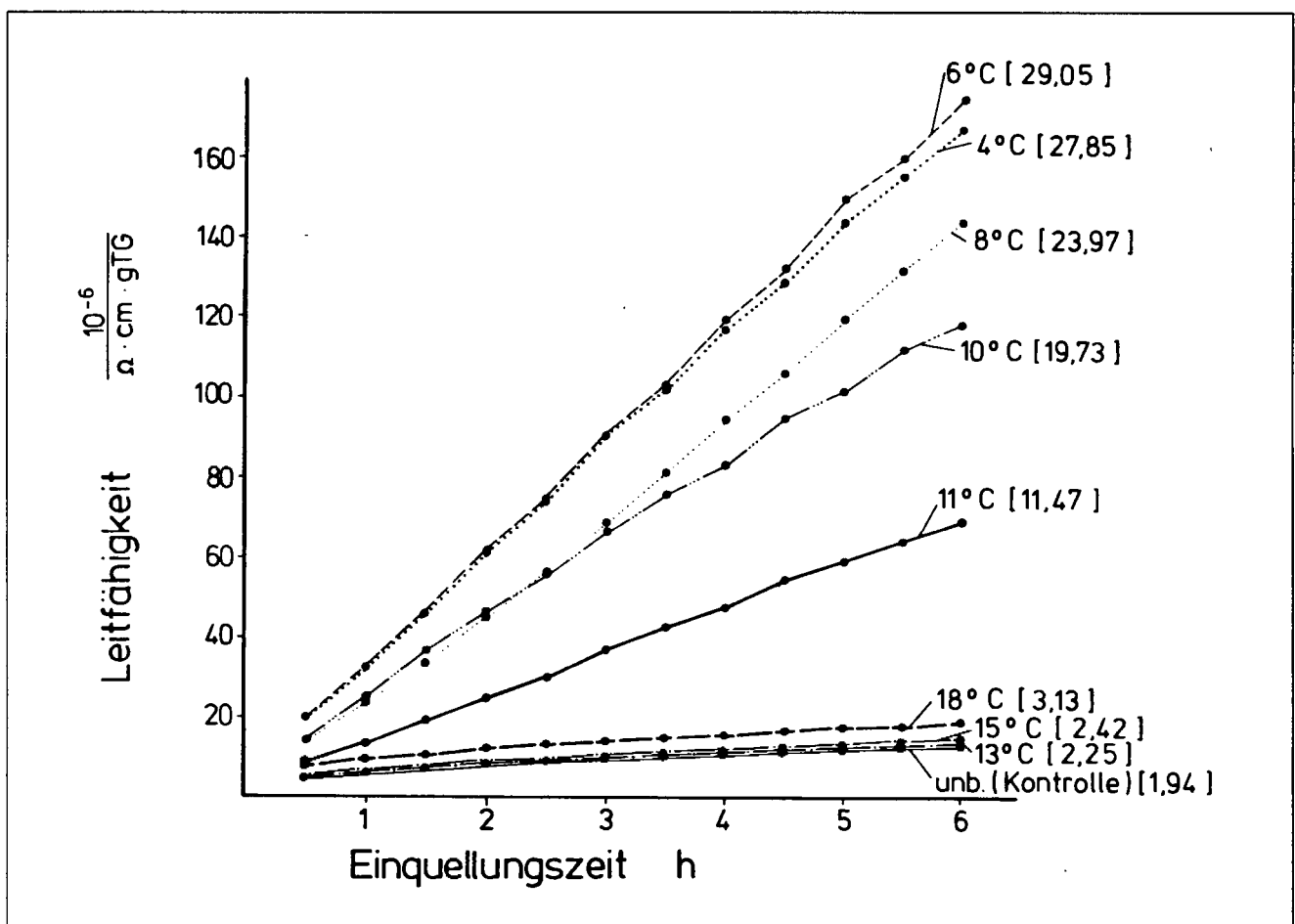


Abbildung 7: Exsudation gekühlter Kakaoradikulae

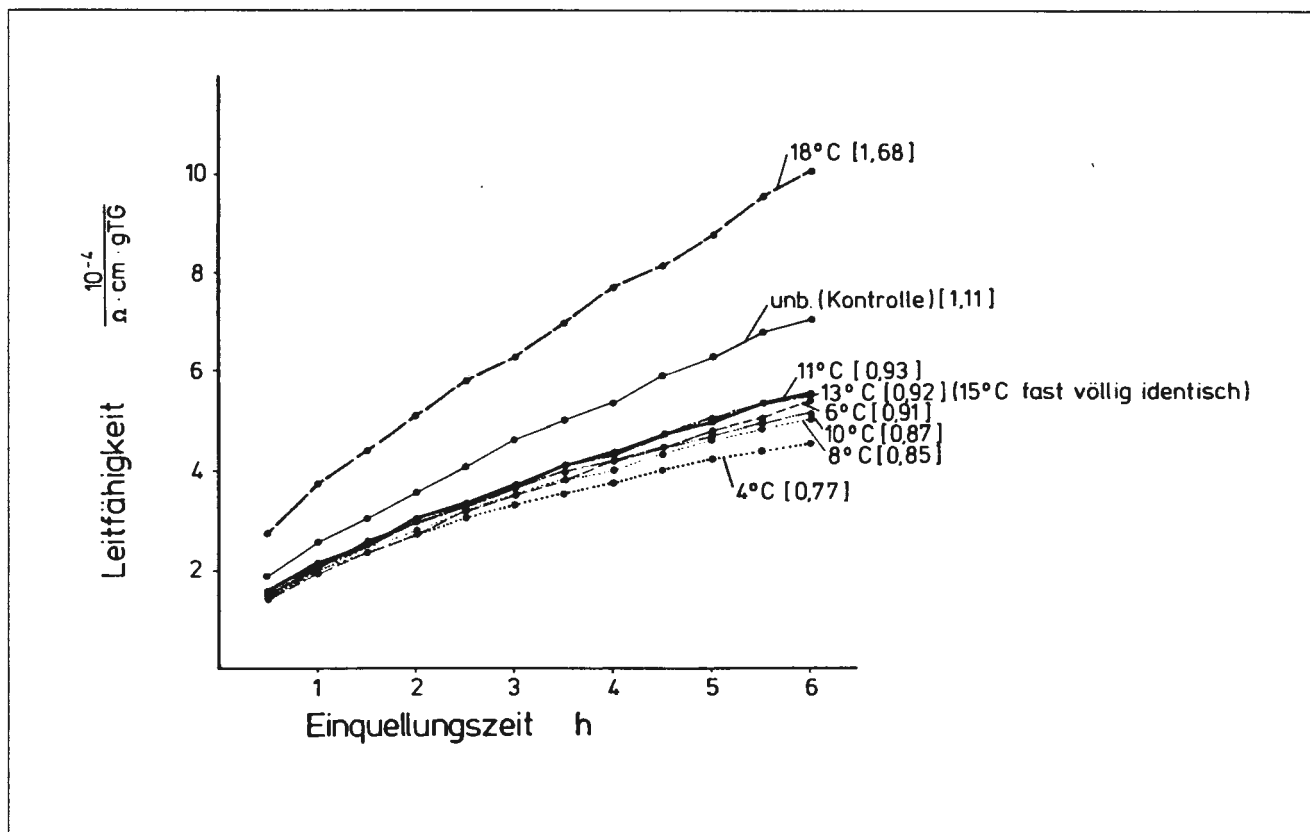
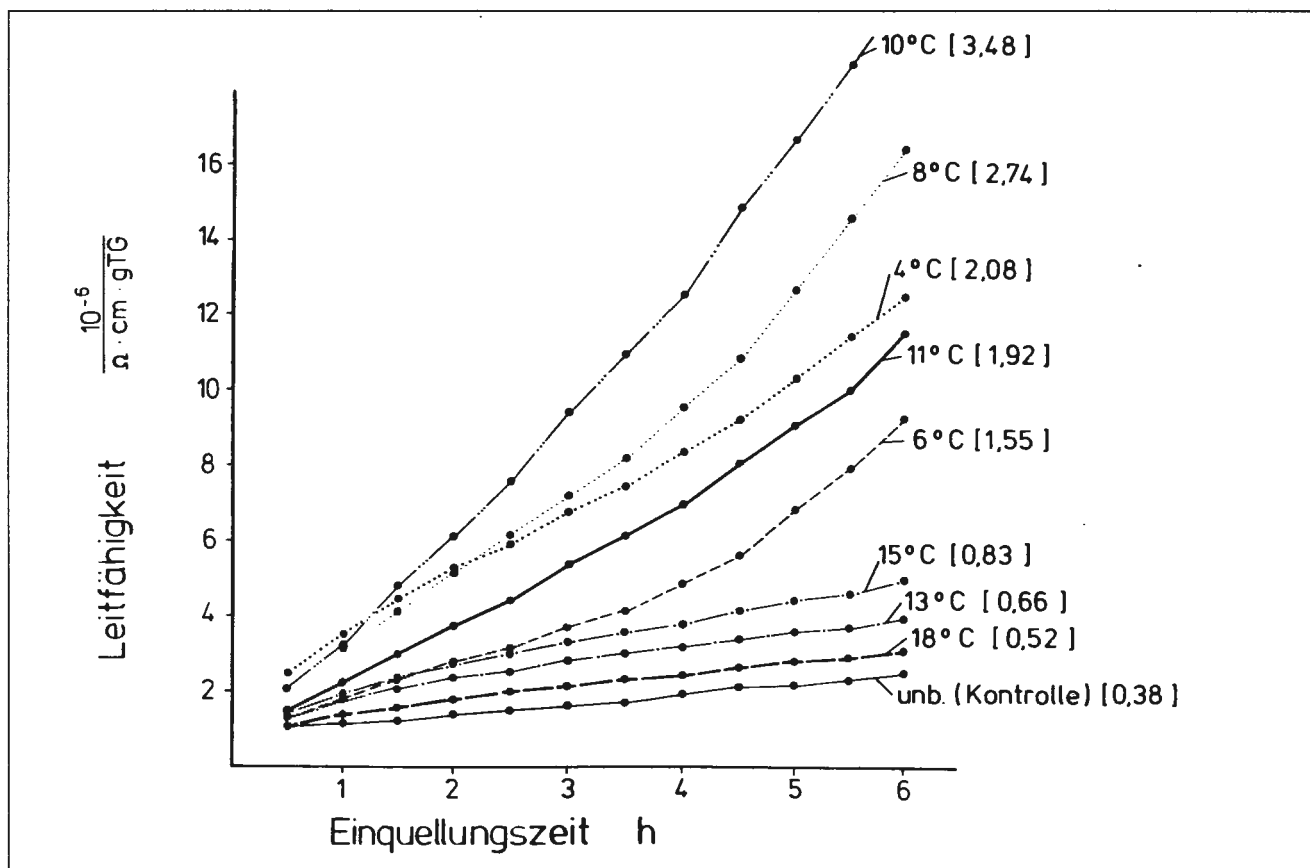


Abbildung 8: Exsudation gekühlter Kakaosamen





**Legende zu den Abbildungen 9 - 11:**

Verwendet wurden reife Kakaosamen einer Hydratation von  $33,9 \pm 1,9$  %, einer Keimfähigkeit von 100 % sowie eines mittleren Frischgewichtes von  $1,8 \pm 0,2$  g/Same.

Die Lagerung fand in wässrigen Lösungen von PEG 4000 (32 bzw. 40 %) bei einer Temperatur von 2 bzw. 8° C statt. Die Einhaltung der Temperatur gewährleistete ein Kühlraum bzw. ein Kältebad.

Die Keimachsen wurden entweder vor Versuchsbeginn aus den Samen isoliert oder es wurde eine Kühlung ganzer Samen vorgenommen und die Keimachse erst direkt vor Beginn der Exsudationsmessung entnommen.

Die Leitfähigkeit des Einquellwassers wurde im Versuch mit einem Meßgerät der Fa. Philips (Mod. PW 9501) ermittelt.

Während der gesamten Messung wurde eine Temperatur von 30° C aufrechterhalten.

Angegeben sind die Mittelwerte aus 4 Wiederholungen. Hinter der Bezeichnung der Kurven sind die gemittelten Exsudationsraten in eckigen Klammern vermerkt.

zurückhält. Bei Erreichen einer bestimmten Exsudatkonzentration unterhalb des Silberhäutchens bzw. nach Aufquellen und teilweisem Ablösen dieser Zellschicht tritt erst eine verstärkte Exsudation ein. Dabei könnten die gefalteten Kotyledoneninnenflächen zugänglich werden und sich ebenfalls an der Elektrolytfreisetzung beteiligen.

Für die weitere Versuchsanstellung muß deshalb zusätzlich zur Betrachtung der Speicherparenchymzellen der Keimblätter eine ultrastrukturelle Untersuchung der Epidermis sowie subepidermaler Zellschichten mit einbezogen werden.

Um ein weiteres Indiz dafür zu erhalten, daß die Radikula tatsächlich erst bei anschließender Einquellung sekundär über die Kotyledonen geschädigt wird, wurden Kakaosamen über eine ausgedehntere Zeitspanne in 32 bzw. 40 %iger wässriger Lösung von PEG 4000 kühl gelagert, bevor sie für die Experimente zur Ermittlung der Exsudationsrate eingesetzt wurden. Betrachtet man daher zunächst nur die Radikula, so erkennt man auch nach 20stündiger Kühlung der Samen in 32 %iger PEG- Lösung auf Temperaturen von 2 bzw. 8° C keine Steigerung der Exsudationsrate ( Abb. 9 ). Beläßt man die Samen 280 Stunden lang unter diesen Bedingungen, so steigt die Exsudationsrate zwar relativ um 125 - 350 %, doch ist dieser Wert verglichen mit der prozentualen Zunahme von 1350 - 1400 % für Keimblätter noch gering.

Lagert man die Kakaosamen in 40 %iger PEG- Lösung, so steigt erwartungsgemäß auch die Exsudationsrate der Keimachsen bei anschließender Imbibition ( Abb. 9 ).

Als Nachweis dafür, daß die geringe Exsudationsrate nach derartig langer Lagerung nicht die Folge einer vollständigen Abgabe aller Elektrolyte während dieser Zeitspanne ist, mögen die Exsudationsverläufe solcher Keimachsen dienen, die bereits zu Lagerungsbeginn aus den Kakaosamen herauspräpariert wurden ( Abb. 9 ). Sie zeigen, daß durchaus nach derartig langer Zeit höhere Exsudationsraten auftreten können.

Die parallel durchgeführten Beobachtungen der Exsudation der ganzen Samen und der Keimblätter zeigen wie erwartet eine stark erhöhte Abgabe von Elektrolyten nach allen diesen Kühlungslagerungsvarianten ( Abb. 10 und 11 ).

**Abbildung 9: Exsudation bei 2 bzw. 8° C gelagerter Kakaoradikulae**

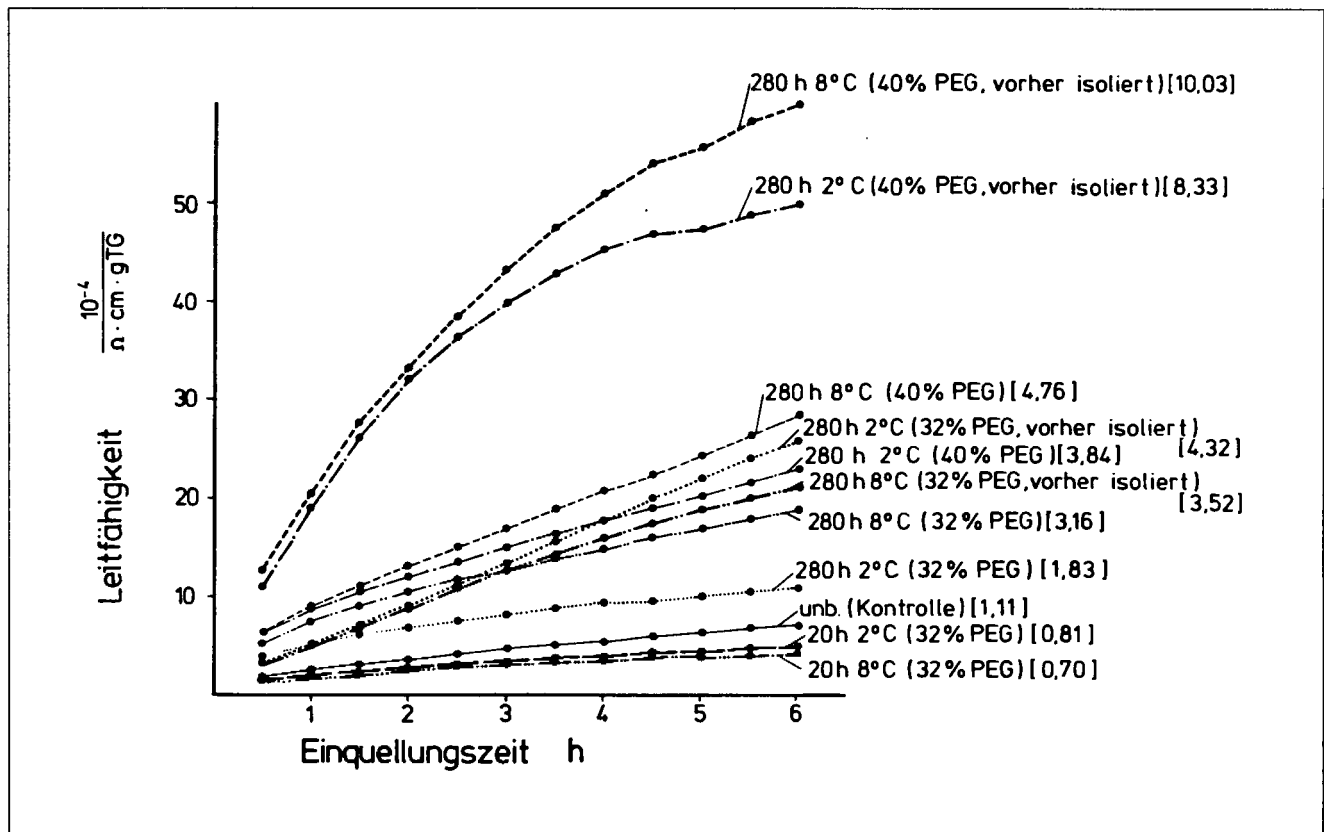


Abbildung 10: Exsudation bei 2 bzw. 8° C gelagerter Kakaosamen

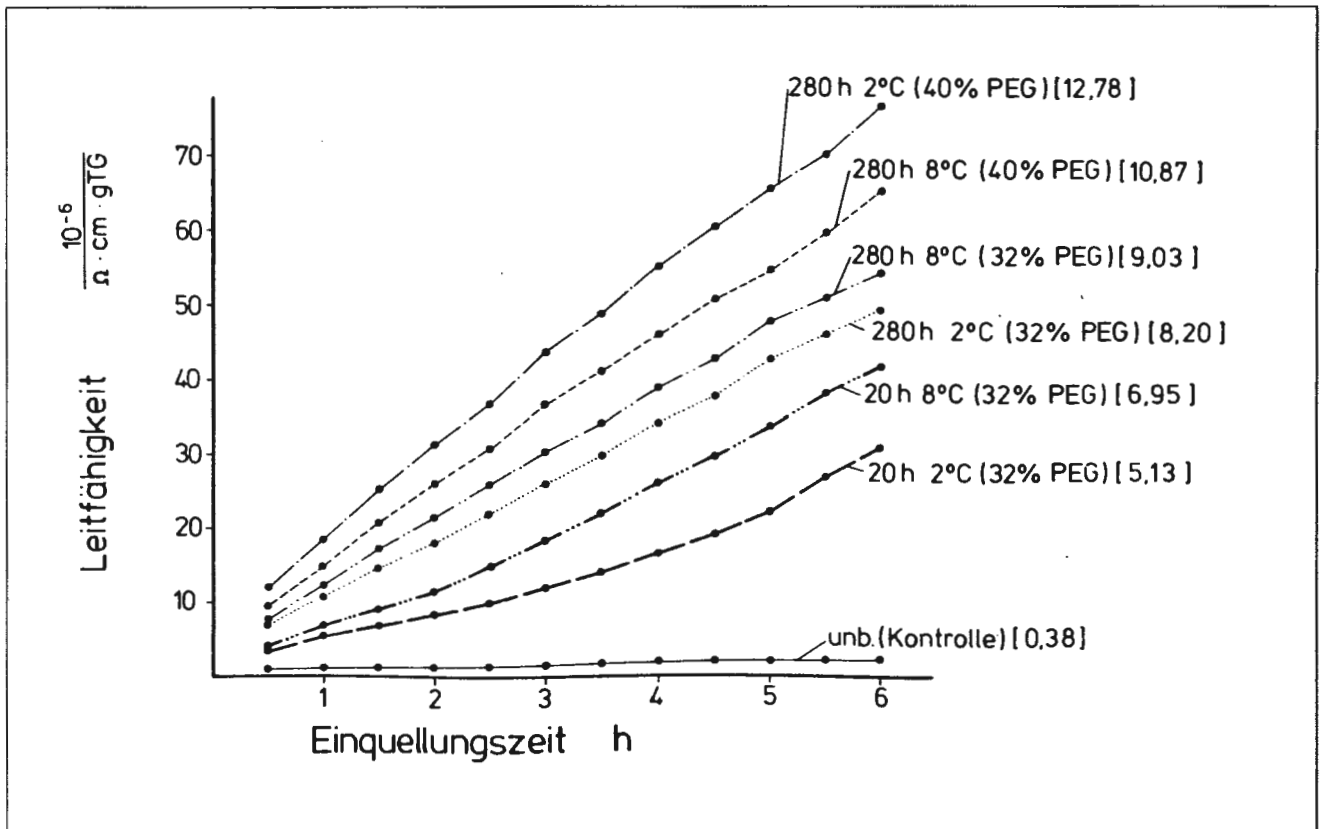
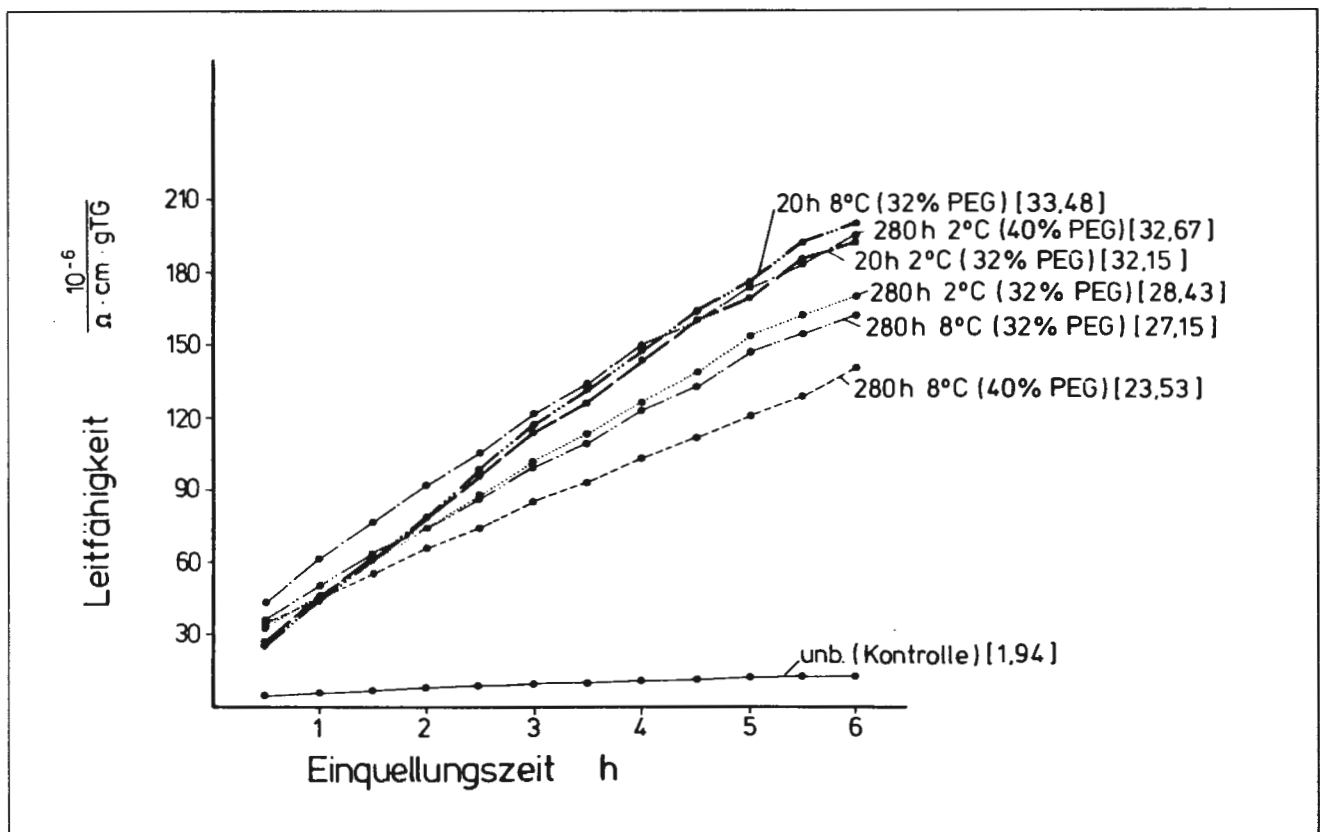


Abbildung 11: Exsudation bei 2 bzw. 8° C gelagerter Kakaokotyledonen



Vergleicht man die Ergebnisse der Untersuchungen von Erdnüssen mit denen von Kakaosamen, so stellt die infolge Kühlung selektiv nur im Kotyledonargewebe von Kakaosamen auftretende starke und irreversible Steigerung der zeitlichen Elektrolytabgabe während der anschließenden Einquellung neben der gleichzeitigen guten Reproduktion des kritischen Temperaturbereiches von 10 - 12° C ein entscheidendes Resultat dar.

## Diskussion

Zunächst einmal war interessant festzustellen, ob eine kritische Temperaturgrenze für Kakaosamen existiert und welchen Temperaturbereich sie umfaßt. Wolfe (1978) stellt die Existenz jeglicher kritischer Temperatur in Frage, da nach seiner Auffassung Veränderungen der Enzymaktivität und der Membranpermeabilität kontinuierlich über einen weiten Temperaturbereich erfolgen. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, daß wenigstens für Kakaosamen eine kritische Temperaturgrenze besteht, die maximal eine Spanne von 2° C einschließt. Dieses unterstreicht die sehr gute Übereinstimmung des Keimfähigkeitsverlustes der Kakaosamen mit der sprunghaften Exsudationsratensteigerung der Keimblätter bei Imbibition im Temperaturbereich von 10 - 12° C.

Sucht man ähnliche Befunde für weitere kühlungssensitive unorthodoxe Samenarten, so findet man stets nur - aus Lagerungsexperimenten abgeleitete - Angaben über schädigende Temperaturen, seltener genauere Daten zu kritischen Temperaturen (s. tabellarische Aufstellung in Rühl 1986), und überhaupt keine Arbeiten, die versuchen, die Ursachen einer Kühlungsempfindlichkeit zu ergründen. Es existieren jedoch eine ganze Reihe orthodoxer Samen- sowie Pflanzenarten und vegetative Pflanzenteile, die infolge Kühlung eine Schädigung aufweisen, und an denen bereits eine Vielzahl interessanter Erkenntnisse über mögliche Ursachen einer mangelnden Kältetoleranz gewonnen werden konnten.

Kälteempfindliche orthodoxe Samenarten sind z.B. Sojabohnen-, Limabohnen-, Baumwoll-, Tomaten- und Gurkensamen. Kälteempfindliche Pflanzenarten umfassen *Lycoris radiata*, *Ipomoea batata*, *Cucurbita moschata*, *Spinacia oleracea*, *Lactuca sativa*, *Zea mays* sowie *Passiflora*-, *Sorghum*- und *Capsicum*-arten. Von besonderem Wert sollten dabei Studien zur Kälteakklimatisierung sein, die Veränderungen in pflanzlichem Gewebe als Antwort auf eine Senkung der Wachstumstemperatur dokumentieren. Derartige Arbeiten sind z.B. an Maulbeerbaumzweigen, Baumwollpflanzen, Wintergetreide, Winterraps, Erbsen, Tomatenblättern sowie an Kohl und Äpfeln angefertigt worden.

Die Möglichkeit der Kälteakklimatisierung von Samen wird in der Literatur nicht erwähnt. In der vorliegenden Untersuchung konnte der Lebensfähigkeitsverlust von Kakaosamen auch nicht durch Reduktion der Kühlrate auf Werte zwischen 0,04 und 0,5° C pro Minute verhindert werden. Die Wahl einer noch geringeren Kühlrate gestaltet sich aufgrund des Fehlens eines Ruhestadiums sowie der offensichtlichen Unterschiede des physiologischen Zustandes verschiedener Gewebebereiche in reifen Kakaosamen ebenfalls problematisch (Jänicke 1973). D. h., die möglicherweise für eine erfolgreiche Kälteakklimatisierung von Kakaosamen erforderliche Zeitspanne könnte so lang sein, daß sie bereits das Eintreten von Keimungsvorgängen gestattet.

Die vielfach zu beobachtende außerordentlich rasche Reaktion biologischen Materials auf Temperaturabsenkung führte zur Konzentrierung der Ursachenforschung auf Membranveränderungen. Zu dieser Thematik ist eine Fülle von Studien angefertigt worden (ausführliche Diskussion s. Rühl 1986).

Membranveränderungen, ohne diese näher zu spezifizieren, halten Chin und Roberts (1980) und Casas et al. (1965) speziell bei Kakaosamen für eine mögliche Schädigungsursache. Willing und Leopold (1983) interpretieren ihre an gekühlten Keimblattscheiben aus Gurkensamen beobachtete Exsudationsratensteigerung als ein Indiz für die Störung der Membranverhältnisse. Sie stellen die Vermutung an, niedrige Temperatur könne die Membranausdehnung stören, z.B. durch die Herabsetzung der Elastizität und die Verhinderung oder Einschränkung des Einbaus von Lipidmaterial in die sich ausdehnende Membran.

Paul (1981) untersuchte die Exsudation der Blattzellen von hinsichtlich der Kältesensitivität differierenden Tomatenarten als Funktion der Temperatur und befand, die Ergebnisse seien konform mit der Ansicht, Kühlenschädigung verursache Membranveränderungen und die Exsudation sei ein frühes Symptom dieser Veränderungen. Blattzellen von *Lycopersicon hirsutum* exsudierten markiertes Leucin unterhalb von 5° C etwas, Rubidium unterhalb von 10° C erheblich stärker. *Lycopersicon esculentum*-Blattzellen geben [<sup>3</sup>H]-Leucin unterhalb von 5° C stark, Rubidium aber unterhalb von 10° C nur in geringem Umfang ab.

Auch Bramlage et al. (1978) werten ein verändertes Exsudationsverhalten als Indiz einer Membranveränderung. Sie bemerkten, daß der Eintritt einer Schädigung von Sojabohnensamen infolge Kühlung stets annähernd in dem Temperaturbereich liege, in dem eine Diskontinuität hinsichtlich der Exsudation auftritt. Auch für Gurkenblätter wird eine sprunghaft erhöhte Elektrolytfreisetzung bei Unterschreitung einer Temperatur von 8° C berichtet (Simon 1974).

Als Exsudate wurden im Falle von Wurzelscheiben aus Süßkartoffelpflanzen K<sup>+</sup> (Lieberman et al. 1958) und für Wurzeln aus Baumwollkeimlingen Glucose, Fructose, Saccharose und Aminosäuren (Christiansen et al. 1970) festgestellt.

Bekannt ist außerdem, daß die Einquellung trockener Samen in kaltem Wasser eine gesteigerte Exsudation und geringere Lebensfähigkeit bedingt (Christiansen 1963, Pollock 1969, Obendorf und Hobbs 1970, Simon 1974, Parrish und Leopold 1977, Leopold 1980, Chabot und Leopold 1982). Seien die Samen einmal hydratisiert, so seien sie erheblich weniger empfindlich. Diese Beobachtung ermutigte Simon (1974), seine bereits für den Mechanismus der Trocknungsschädigung aufgestellte Hypothese für die Abläufe infolge Kühlung zu modifizieren. Er vermutet, die Phospholipide der Membranen seien bei niedrigen Temperaturen nicht in der Lage, schnell von der hexagonalen in die lamellare Architektur zu wechseln, da sie im Gelzustand eine starre molekulare Gestalt innehätten. Chabot und Leopold (1982) erwägen neben einer derartigen Verhinderung der Membranreorganisation eine mögliche Behinderung der erforderlichen Inkorporation neuer Lipide in Membranen während ihres Größenwachstums.

Allen diesen Experimenten der Ermittlung der Rate einer Substanzfreisetzung pflanzlichen Gewebes ist gemeinsam, daß der Exsudationsverlauf während der Kühlung auf die jeweilige verminderte Temperatur verfolgt wurde. Von diesem

Schema mußte in dieser Studie deshalb abgewichen werden, da eine derartige Versuchsanstellung nicht notwendigerweise eine dauerhafte Schädigung ableiten läßt. Einquellung in A. bidest. einer Temperatur von 20 - 30° C könnte nämlich ein völlig normales Exsudationsverhalten dokumentieren. Aus diesem Grunde wurden Kakaosamen eine Stunde in einer auf die gewünschte Temperatur gekühlten 32 %igen Lösung von PEG 4000 belassen, die Durchführung der Messung der Elektrolytfreisetzung hingegen stets bei 30° C vorgenommen.

Als Resultat ist eine sprunghafte irreversible Steigerung der Exsudationsrate selektiv in den Keimblättern von Kakaosamen zu verzeichnen, die exakt mit dem Temperaturbereich von 10 - 12° C übereinstimmt, in dem Kakaosamen - ebenso abrupt - ihre Lebensfähigkeit verlieren. Die Keimachse zeigt selbst nach zwanzigstündiger Kühlung der Samen kein von der Kontrolle abweichendes Reaktionsmuster; eine Kühlung der Samen über einen Zeitraum von 280 Stunden hinweg läßt die Exsudationsrate von Kakaosamenachsen lediglich auf das Doppelte (+2° C) bzw. 3 - 4fache (+8° C) ansteigen.

Erdnußsamen offenbaren hingegen das erwartete, für orthodoxe Samenarten typische Exsudationsverhalten; die Anwendung keiner Temperatur im Bereich von -20° C bis +20° C konnte die Elektrolytabgabe der Achsen oder Keimblätter steigern.

Das bedeutet, einstündiges Kühlen auf Temperaturen unterhalb des kritischen Temperaturbereiches resultiert offensichtlich in irreversiblen Membranschädigungen im Kotyledonargewebe von Kakaosamen. Der erst nach relativ langer Applikationszeit erkennbare Anstieg der Exsudationsrate der Achsen muß als starkes Indiz für eine sekundäre Schädigung dieses Gewebes gewertet werden. Diesen Tatbestand unterstreicht auch die höhere Rate der Elektrolytfreisetzung, welche Keimachsen aus 280 Stunden bei 8° C gelagerten Kakaosamen gegenüber denen aus solchen Samen, die bei 2° C über den gleichen Zeitraum hinweg gelagert wurden, aufweisen. Denn bei einer Temperatur von 8° C sollten postmortale Prozesse sowie Transport- bzw. Diffusionsvorgänge schneller ablaufen als bei 2° C, so daß sich eine Schädigung bei der höheren gewählten Temperatur in den Keimachsen früher manifestieren sollte.

Die ungewöhnliche Zunahme der Exsudationsrate mit fortschreitender Einquellzeit, die im Gegensatz zu isolierten Samenorganen bei der Imbibition ganzer Samen auftritt, ist ein Indiz dafür, daß auch innerhalb der Keimblätter von Kakaosamen nicht alle Zellen gleichermaßen geschädigt werden. Diesen Sachverhalt soll die Betrachtung der Ultrastruktur gekühlter Kakaosamengewebe aufzeigen (Rühl et al. 1989, in press).

### Zusammenfassung

Die primäre Ursache der Trocknungs- und Kühlungssensitivität unorthodoxer Samenarten ist bisher ungeklärt. Nachdem frühere Publikationen dieser Versuchsreihe den Ort der Schädigung unorthodoxer Kakaosamen infolge Entwässerung eingrenzen, befaßt sich der vorliegende Artikel mit Aspekten der Kühlungssensitivität dieser Samen.

Es konnte gezeigt werden, daß Kakaosamen sprunghaft bei Unterschreiten einer kritischen Temperatur von 10 - 12° C ihre Lebensfähigkeit verlieren. Dieser Lebensfähigkeitsverlust trat dabei unabhängig von der untersuchten Kühlgeschwindigkeit und der Samenhydratation ein. Mit Hilfe von Exsudationsexperimenten konnte deutlich aufgezeigt werden, daß die Kotyledonen der Ort der primären Schädigung von Kakaosamen

infolge Applikation niedriger Temperaturen sind. Dabei ergaben sich klare Hinweise auf eine selektive Schädigung einzelner Gewebe in den Keimblättern.

Diese Gewebe und die darin ablaufenden Prozesse soll eine Untersuchung der Ultrastruktur verschiedenartiger Kotyledonargewebe auf unterschiedliche Temperaturen gekühlter Kakaosamen aufdecken.

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

#### V. Critical temperature and leakage of cooled cacao seeds and cacao seed organs

The primary causes of sensitivity to cold and water stress shown by recalcitrant seeds are still not known. After detecting the primary site of damage in recalcitrant cacao seeds due to desiccation presented in recent publications, this paper deals with aspects of the sensitivity to cold shown by cacao seeds.

It could be demonstrated, that cacao seeds loose their viability abruptly during lowering the temperature beneath 10 - 12° C. This viability loss was independent from cooling rate and hydration level of the seeds. Leakage experiments could clearly point out, that cacao seed cotyledons are the site of primary damage due to application of reduced temperatures. Indications point to a selective damage of specific cotyledonary tissues.

These tissues as well as the involved processes shall be discovered by an investigation of the ultrastructure of several cotyledonary tissues of cacao seeds cooled to different temperatures.

### Literatur

Barton, L.V.: Viability of seeds of *Theobroma cacao* L. - Contrib. Boyce Thompson Institute 23, (1965), S. 109-122.

Boroughs, H. und Hunter, J.R.: The effect of temperature on the germination of cacao seeds. - Amer. Soc. Hort. Sci. 82, (1963), S. 222-224.

Bramlage, W.J., Leopold, A.C., Parrish, D.J.: Chilling stress to soybeans during imbibition. - Plant Physiol. 61, (1978), S. 525 - 529.

Casas, J.A.; Redshaw, E.S.; Ibanez, M.L.: Respiratory changes in the cacao seed cotyledon coincident with seed death. - Nature 208, (1965), S. 1348 - 1350.

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

Chin, H.F. und Roberts, E.H.: Recalcitrant crop seeds. Tropical Press, Kuala Lumpur, Malaysia, (1980).

Christiansen, M.N.: Influence of chilling upon seedling development of cotton. - Plant. Physiol. 38, (1963), S. 522 - 530.

- Christiansen, M.N., Carns, H.R. und Slyter, D.J.: Stimulation of solute loss from radicles of *Gossypium hirsutum* L. by chilling, anaerobiosis, and low pH. - *Plant Physiol.* 46, (1970), S. 53 - 56.
- Hunter, J.R.: La germinacion de *Theobroma cacao*. - *Turrialba* 4, (1959), S. 1-9.
- Ibanez, M.L.: Role of the cotyledon in sensitivity to cold of cacao seed. - *Nature* 201, (1964), S. 414 - 415
- Ibanez, M.L., Casas, I.A. und Redshaw, E.S.: Cytological changes in cacao seed cotyledon caused by cold treatment. - *Turrialba* 15, (1965), S. 354-355.
- Jänicke, J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Embryonen von *Theobroma cacao* L. (Kakao) während der Embryogenese und der Samenkeimung. - Dissertation, Tierärztl. Hochsch. Hannover, (1973).
- Leopold, A.C.: Temperature effects on soybean imbibition and leakage. - *Plant Physiol.* 65, (1980), S. 1096 - 1098.
- Lieberman, M., Craft, C.C., Audia, W.V., Wilcox, M.S.: Biochemical studies of chilling injury in sweet potatoes. - *Plant Physiol.* 33, (1958), S. 307 - 311.
- Obendorf, R.L. und Hobbs, P.R.: Effect of seed moisture on temperature sensitivity during imbibition of soybean. - *Crop Sci.* 10, (1970), S. 563 - 566.
- Parrish, D.J. und Leopold, A.C.: Transient changes during soybean imbibition. - *Plant Physiol.* 59, (1977), S. 1111 - 1115.
- Pauli, R.E.: Temperature-induced leakage from chilling-sensitive and chilling-resistant plants. - *Plant Physiol.* 68, (1981), S. 149 - 153.
- Pollock, B.M.: Imbibition temperature sensitivity of lima bean seeds controlled by initial seed moisture. - *Plant Physiol.* 44, (1969), S. 907 - 911.
- Pyke, E.E.: On the germination of cacao beans with special reference to storage and transport problems. - 4. Ann. Rep. Cacao Res. 1934, I.C.T.A., Trinidad, (1935), S. 34-40.
- Pyke, E.E., Leonard, E.R. und Wardlaw, C.W.: On the viability of cacao seeds after storage. - *Trop. Agric. (Trinidad)* 11, (1934), S. 303-307.
- Redshaw, E.S., Casas, I.A., Ibanez, M.L.: Evidence of mitosis in cotyledon-free sterile cultures of cacao seed radicle tissue. - *Fitotecnia Latinoamericana* 3, (1966), S. 33 - 37.
- Rees, A.R.: A large-scale test of storage methods for oil-palm seed. - *J. West African Inst. Oil-Palm Res.* 4, (1963), S. 46 - 51.
- Roberts, E.H.: Predicting the storage life of seeds. - *Seed Sci. Technol.* 1, (1973), S. 499-514.
- Rühl, G.F.: Untersuchungen zu den Ursachen der Kühlungs- und Trocknungsempfindlichkeit von Kakaosamen. - Dissertation, Techn. Universität Braunschweig, (1986).
- Rühl, G.F., Dambroth, M., Biehl, B.: Untersuchungen zu den Ursachen der Kühlungs- und Trocknungsempfindlichkeit tropischer Samen am Beispiel des Kakao. I. Einfluß des Samenentwicklungszustandes. - *Landbauforschung Völkenrode* 38, (1988a), S. 220 - 234.
- Rühl, G.F., Dambroth, M., Biehl, B.: 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, (1988b), S. 235 - 251.
- Rühl, G.F. und Dambroth, M.: Untersuchungen zu den Ursachen der Kühlungs- und Trocknungsempfindlichkeit tropischer Samen am Beispiel des Kakao. III. Ultrastruktur des Rindenparenchyms der Radikula trocknender Kakaosamen. - *Landbauforschung Völkenrode* 39, (1989), S. 1 - 14.
- Rühl, G.F. und Biehl, B.: 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, (1989), S. 15 - 27.
- Rühl, G.F., Biehl, B., Dambroth, M.: Untersuchungen zu den Ursachen der Kühlungs- und Trocknungsempfindlichkeit tropischer Samen am Beispiel des Kakao. IV. Ultrastruktur auf unterschiedliche Temperaturen gekühlter Kakaosamen. - *Landbauforschung Völkenrode* 39, (1989), in press.
- Simon, E.W.: Phospholipids and plant membrane permeability. - *New Phytol.* 73, (1974), S. 377 - 420.
- Swarbrick, J.F.: Storage of cocoa seeds. - *Exp. Agric.* 1, (1965), S. 201-207.
- Willing, R.P. und Leopold, A.C.: Cellular expansion at low temperature as a cause of membrane lesions. - *Plant Physiol.* 71, (1983), S. 118 - 121.
- Wolfe, J.: Chilling injury in plants - the role of the membrane lipid fluidity. - *Plant, Cell Environment* 1, (1978), S. 241 - 247.
- Zinc, E. und Rochelle, L.A.: The influence of humidity and temperature on viability of cacao seed in storage. - *Bragantia* 23, (1964), S. 111-116.

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

Biehl, Böle, Prof. Dr. rer. nat., Botanisches Institut der Technischen Universität Braunschweig.