

Untersuchungen zu den Ursachen der Kühlungs- und Trocknungsempfindlichkeit tropischen Saatgutes am Beispiel des Kakao

I. Einfluß des Samenentwicklungszustandes

GERHARD RÜHL, MANFRED DAMBROTH und BÖLE BIEHL

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung

Einleitung

Kühlung und Trocknung sind Grundlage der Langzeitkonservierung jeglichen Saatgutes.

Eine Lagerung von Samen ist aus Gründen der Sicherung der genetischen Ressourcen von Pflanzen sowie als Grundlage von Züchtungsprogrammen wünschenswert. Ein weiterer Aspekt ist die Ermöglichung des Saatguttransportes sowie die kurzzeitige Aufbewahrung bis zum gewünschten Aussaattermin. Eine derartige auf wenige Wochen bis Monate limitierte Aufrechterhaltung der Lebensfähigkeit ist für nahezu alle Samenarten gegeben, eine Ausnahme stellen lediglich z.B. die Samen des Salbaumes (*Shorea robusta*) dar, welche in wenigen Tagen ihre Keimfähigkeit verlieren (Nautiyal und Purohit , 1985 a - c ; Nautiyal et al., 1985).

Gerade die Samen tropischer Pflanzenarten erweisen sich hinsichtlich einer konventionellen Trockenkaltlagerung (mit einer Samenfeuchte von 5 - 7 % bei einer Temperatur von -10 bis -20° C) als problematisch.

Der Kakaosame wurde als Vertreter derartiger unorthodoxer Samenarten ausgewählt, da er z.B. als Rohstoff zur Schokoladenfertigung erhebliche wirtschaftliche Bedeutung besitzt.

Kakaosamen stellen darüber hinaus einen extremen Vertreter unorthodoxer Samenarten dar, da sie unter Erhalt der Keimfähigkeit weder auf Wassergehalte von 19 % (Barton, 1965) bis 37 % (King, unveröffentlicht 1979) getrocknet, noch auf Temperaturen unterhalb von 5° C (Zinc und Rochelle, 1964) bis 15,50 C (Pyke et al., 1934) gekühlt werden können.

Tabelle 1: Natürliche Keimungsinhibitoren unorthodoxer Samenarten

Objekt	Natur des vermuteten Inhibitors	Lokalisation	Autoren
Citrus ssp.	wasserlöslich	im Samen	Elze (1949)
Coffea ssp.	-	Endocarp	Gopal und Ramaiah (1972)
	hormonell	Endocarp und Fruchtpulpa	Velasco und Gutierrez (1974)
Gareinia mangostana	-	in der Frucht	Winters und Rodriguez-Colon (1953)
Nephelium lappaceum	-	Arillussaft	Chin (1975)
Theobroma cacao L.	nicht enzymatisch, evtl. osmotisch aktiv	Pulpa	Holden (1958) Ibanez und Casas (1965) Saenz (1963)

Tabelle 2: Lagerungsmethoden von Kakaosamen und -früchten

Autor/Jahr	Lagerungsbedingungen	Lagerungsdauer und letztendl. Lebensfähigkeit
Pyke et al. (1934)	in Früchten, mit HgCl ₂ oberflächensterilisiert u. vaselinebeschichtet (15 - 21 °C, feucht)	50 Tage
Pyke (1935)	in Früchten + Fungizid (feucht, 21 - 27 °C)	8 - 10 Wochen
Evans (1953)	feuchte Holzkohle in perforierter Kiste (feucht)	max. 13 Wochen
de Alvim (1958)	Polyäthylenbeutel, geschälte Samen + Fungizid (2 Stunden schattentrocknet)	3 Monate, 100 %
Hunter (1958)	Polyäthylenbeutel, Fungizid (100 % rel. Luftfeuchtigkeit, 18 - 30 °C)	max. 8 Wochen
Villa (1962)	geschlossene Behälter, CO ₂ -Atmosphäre, entfernte Testa (ein paar Stunden luftgetrocknet, Umgebungstemperatur)	45 Tage, 75 %
Are (1964)	Testa entfernt, in Holzkohle + Fungizid ein paar Stunden luftgetrocknet, ca. 21 °C)	8 Wochen, 14 %
Friend (1964)	in Früchten, teilweise wachsbeschichtet (feucht, Umgebungstemperatur)	4 Wochen
Swarbrick (1964)	geschlossene Polyäthylenbeutel + Fungizid (27 % Feuchtigkeitsgehalt, 22 °C)	6 Wochen
Zinc und Rochelle (1964)	halbgeschlossene Glasbehälter (hohe rel. Luftfeuchtigkeit, Umgebungstemperatur)	90 Tage, 72 %
Barton (1965)	wie Zinc und Rochelle, jedoch + Fungizid (31 - 33 % Feuchtigkeitsgehalt, 25 - 30 °C)	4 Monate, 52 %
Mossu (1974)	in Frucht, Talg + Benlat (= syst. Fungizid), beschichtet	6 Wochen, 95 %
King (1979)	belüftet, 98 % rel. Luftfeuchtigkeit + Fungizid (41 % Feuchtigkeitsgehalt, 20 °C)	8 Monate, 24 %
Goldbach (1980 b)	in Polyäthylenglykol 6000-Lösung	3 Monate, 85 %

In der vorliegenden Arbeit wird die Problematik der Langzeitkonservierung unorthodoxer Samenarten vorgestellt. Die Entwicklung von Kakaosamen und Ergebnisse zur Trocknungssensitivität von Kakaosamen unterschiedlicher Entwicklungsstadien werden präsentiert.

1 Problemstellung

Aufgrund der praktischen Bedeutung von Kakaosamen im Lebensmittelbereich ist ein weites Spektrum biochemischer und physiologischer Untersuchungen angestellt worden. Die bisherigen biochemischen Arbeiten betrafen dabei vornehmlich die Fermentation und den unfermentierten Samen als Ausgangspunkt für die Fermentation, weniger die Biologie bzw. die Biochemie der lebenden Samen.

Eine Langzeitlagerungsmethode für Kakaosamen existiert bisher nicht, obwohl beginnend mit P y k e (1934) intensiv, aber erfolglos, an der Entwicklung einer solchen gearbeitet wird. Die derzeitige maximale Lagerdauer von Kakaosamen beträgt 8 Monate unter Erhalt einer indiskutablen Keimfähigkeit von nur 24 % (K i n g , 1979).

Die Vorbedingung für einen Erfolg stellt eine bessere grundlegende Kenntnis der Biologie und Biochemie der Samenruhe, Reifung und Keimung sowie der Kühlungs- und Trocknungssensitivität dar.

Kakaosamen weisen nun gegenüber anderen Samen eine Reihe von Besonderheiten auf, auf die im folgenden näher eingegangen werden soll. Von Bedeutung ist zunächst einmal das Vorliegen eines hohen Wassergehaltes von 32 - 45 % (Frischgewichtsbasis) bei Erntereife (J ä n i c k e , 1973; Ch i n et al., 1983). Die eigentliche Besonderheit der hohen Hydratation bei Frucht reife besteht darin, daß Kakaosamen außerdem durchschnittlich 45 - 56 % Fett (Frischgewichtsbasis) enthalten (V a u g h a n , 1970).

Hinsichtlich der vorzeitigen Keimbereitschaft von Kakaosamen weichen die Angaben bezüglich des exakten Zeitpunktes während der Embryogenese, an dem die Samen keimfähig werden, erheblich voneinander ab. So ist eine 100 %ige Keimung nach A d e n i k i n j u (1972) erst 140 Tage nach Bestäubung zu erwarten, während 15 Wochen alte Kakaoembryonen eine 50 %ige Keimung zeigen. P a s s e r n (1979) fand hingegen, daß bereits 100 Tage alte Kakaosamen keimfähig waren. Eigene Untersuchungen (s. Kap. 2.1) konnten erst 125 Tage nach Handbestäubung eine Keimbereitschaft von Kakaosamen nachweisen.

Kakaoembryonen keimen jedoch nur dann, wenn man sie vorher von der Pulpa und Samenschale befreit. H o l d e n (1959) konnte in der Pulpa einen Keimungsinhibitor nachweisen, der nach Untersuchungen von I b a n e z und C a s a s (1965) hitzestabil und pH-unabhängig ist. Das bedeutet, daß der Kakaosame selbst keine Keimruhephase durchläuft. Die Umstellung von Reifung auf Keimung erfolgt bei diesen Samen offensichtlich ohne Stoffwechselaktivierung und ist daher keimungsphysiologisch besonders interessant.

Das Auftreten eines Keimungsinhibitors in der Frucht stellt dabei keinen Einzelfall für tropisches Saatgut dar. Die Keimbereitschaft vor Beendigung der Embryogenese scheint dabei entweder durch eine fleischige oder saftige Pulpa (Citrus, Kakao, Mango, Mangostan), durch Fruchtsäfte (z.B. *Nephelium lappaceum*), durch ein anhaftendes Periantseg-

ment (*Artocarpus heterophyllus*) oder eine mechanische Barriere, wie die Pergamenthülle von Kaffeesamen, verhindert oder verzögert zu werden (E l z e , 1949; S o n w a l k a r , 1951; C h i n , 1975; C h i n und R o b e r t s , 1980).

B a r t o n und S o l t (1948) vermuteten als Hemmechanismus der Substanzen aus Fruchtsäften einen pH- Effekt, osmotischen Druck oder eine Enzymaktivität. Außerdem lassen eine ganze Reihe von Untersuchungen das Auftreten natürlicher Keimungsinhibitoren innerhalb einiger unorthodoxer Samen und Früchte vermuten (s. Tabelle 1).

Bemerkenswert ist auch, daß bei der Kakaosamenreifung ein synchroner Anstieg der Proteaseaktivität mit der Reservestoffakkumulation stattfindet. Maximale Proteaseaktivität und maximaler Proteingehalt wurden 20 Tage vor der Frucht reife gefunden und die Abnahme des Proteingehaltes verlief wiederum synchron zur Proteaseaktivitätsabnahme erst 14 Tage nach Keimungsbeginn (P a s s e r n , 1979; B i e h l e t al., 1982c).

Kakaosamen können außerdem nicht unter Erhaltung ihrer Lebensfähigkeit getrocknet werden (E v a n s , 1953; Hunter, 1959; A r e , 1964; B a r t o n , 1985; S w a r b r i c k , 1965) und werden durch Temperaturen von 10 - 15° C getötet (P y k e et al., 1934; P y k e , 1935; H u n t e r , 1959; B o r o u g h s und H u n t e r , 1961, 1963; I b a n e z , 1963; A r e , 1964; S w a r b r i c k , 1965; Z i n c und R o c h e l l e , 1964; B a r t o n , 1965).

Diese Trocknungs- und Kühlungsempfindlichkeit von Kakaosamen zusammen mit dem Fehlen einer Keimruhephase machen die Lagerung von Kakaosamen zu einem großen Problem und haben eine Vielzahl von Wissenschaftlern dazu veranlaßt, sich mit dieser Thematik auseinanderzusetzen.

Der Wunsch nach verlängertem Leben von Kakaosamen entstand erst 1934 (P y k e et al.). Vorher behalf man sich entweder mit dem Transport von Früchten unter großen Verlusten oder bediente sich vermutlich des Transportes von Kakaokeimlingen. Da sich die konventionelle Methode der Lagerung trockener Samen bei niedriger Temperatur für Kakaosamen als ungeeignet erwies, beinhalten die bisher erfolgreichsten Lagerungsverfahren die Konservierung in einer relativ warmen, feuchthaltenden Umgebung (s. Tab. 2).

Die Lebensfähigkeit kann jedoch stets nur maximal für ein paar Monate aufrechterhalten werden, und eine angemessene Sauerstoffversorgung scheint für das Überleben der Samen essentiell zu sein (E v a n s , 1953; N w a c h u k u , 1961; F r i e n d , 1964; S w a r b r i c k , 1965). Auch die Anwendung eines Fungizides verbessert die Erhaltung der Keimfähigkeit wesentlich (P y k e et al., 1934; P y k e , 1935; A l v i m , 1958; H u n t e r , 1959; H a n s e n und H u n t e r , 1960; B a r t o n , 1965; S w a r b r i c k , 1965; M o s s u , 1975). Neben dem Auftreten von Pilzinfektionen bei der Konservierung feuchter Samen stellt die Keimung während der Lagerung das Hauptproblem dar (C h i n und R o b e r t s , 1980; K i n g und R o b e r t s , 1982). Da sich Kakaosamen als relativ tolerant gegenüber geringer schonender Trocknung erwiesen, versuchte man dieses Problem durch kurzzeitige Vortrocknung der Samen vor der eigentlichen Lagerung zu lösen (A l v i m , 1958; N w a c h u k u , 1961; V i l l a , 1962; A r e , 1964), aber eine Ausdehnung der Lagerfähigkeitsdauer konnte nicht erreicht werden; Untersuchungen von K i n g und R o b e r t s (1982) sowie L u a n et al. (1984) lassen sogar eine Einbuße der Lebensfähigkeitsspanne durch Vortrocknung vermuten.

Die Angaben in der Literatur zur Trocknungs- und Kühlungstoleranz von Kakaosamen sind recht widersprüchlich. Der für den Erhalt der Lebensfähigkeit gerade noch notwendige Wassergehalt (Frischgewichtsbasis) wird mit 19 % (Barton, 1965), 23 % (Hunter, 1958) und 37 % (King, unveröffentlicht 1979) beziffert. Die Temperatur, unterhalb derer eine Schädigung von Kakaosamen eintritt, soll 5°C (Zinc und Rochelle, 1964), 8°C (Hunter, 1958), 9,5°C (Swarbrick, 1964), 10°C (Barton, 1965), 12°C (Boroughs und Hunter, 1961), 13°C (Pyke, 1935), und 15,5°C (Pyke et al., 1934) betragen.

Da alle Versuche scheiterten, Kakaosamen durch eine konventionelle Trockenkaltlagerung zu konservieren und eine Feuchtlagerung stets nur für kurze Zeit anwendbar war, applizierte man eine ganze Reihe von Chemikalien und Inhibitoren in der Hoffnung, entweder eine Kälteschädigung aufheben oder eine Keimruhephase induzieren zu können. So

konnte eine Reihe von Nucleosid-, Nucleotid- und Vitaminlösungen den Kältetod von Kakaosamen nicht aufheben (Boroughs und Labarca, 1962). Verbindungen wie Isopropylphenylcarbamate, Cumarin und Citronensäure (Friend, 1964) sowie eine Reihe nicht näher spezifizierter natürlicher und künstlicher Keimhemmstoffe inklusive Abscisinsäure und Naphthylelessigsäure (Goldbach, 1980a) erwiesen sich als unwirksam oder - wie z.B. im Falle der Naphthylelessigsäure - sogar als schädlich.

Am erfolgreichsten zeigte sich noch die Lagerung von Kakaosamen in hochkonzentrierten Lösungen wie Zuckerlösungen (Saeenz, 1963) oder Polyethylenglykollösung (Goldbach 1980b), die auf osmotischem Wege die Kakaosamenkeimung verhinderten. Hier traten jedoch die bereits genannten Probleme der Pilzinfektionen und einer adäquaten Sauerstoffversorgung auf.

Tabelle 3: Auswahl unorthodoxer Samenarten

Samenart:	Schädigung bei:	max. Lagerfähigkeitsdauer und letztliche Keimfähigkeit:
Mango (<i>Mangifera indica</i>)	5-8 °C, Trocknung	13 Wochen 80%
Zibetbaum (<i>Durio zibethinus</i>)	21% WG	32 Tage 90%
Borneo Kampher	5 °C, 35% WG	20 Tage 30%
Hevea brasiliensis	15-20% WG	3,5 Monate 100%
Castanea spp.		3 Wochen bis 3,5 Jahre
Quercus spp.	-3 °C, 25% WG	2 Monate 44% bis 1 Jahr
Gem. Roßkastanie	Trocknung	15 Monate 25%
Walnuß (<i>Juglans</i> spp.)	Trocknung	6 Monate 18-92%
Jackfrucht	Trocknung	1 Monat 80%
Kokosnuß	Trocknung	16 Monate
Ölpalme	5 °C, 12,5% WG	15 Monate 90%
Kaffee	-10 °C, 8-35% WG	4 Jahre 95%
Citrus spp.	-6 °C, 5-40% WG	4 Monate 27%-3 Jahre 90%
Kakao	11 °C, 18% WG	8 Monate 24%
Tee	28% WG	10 Monate 50%

(Auszug aus: Chin und Roberts 1980)

Über die Natur des Trocknungs- und Kälteschadens von Kakaosamen existieren nur wenige Arbeiten. Bereits P y k e et al. (1934) berichteten, daß die Lagerung von Früchten bei 7 - 10° C über einen Zeitraum von 10 Tagen hinweg eine deutlich sichtbare Braunfärbung der Kotyledonen bis ins Zentrum des Samens bewirkte, während die Radikula ungeschädigt zu sein scheine. Dieser Befund wurde von Ibanez et al. (1965) spezifiziert. Er stellte ein Auslaufen der Polyphenolzellen der Keimblätter von Kakaosamen infolge eines zwanzigminütigen Eintauchens der Samen in 4° C kaltes Wasser fest.

Trocknung führt nach C a s a s und I b a n e z (1964) zu einer kontinuierlichen Abnahme der Atmungsrate mit dem Wassergehalt und läßt sich bei einem Wassergehalt von 14 % (Frischgewichtsbasis) nicht mehr nachweisen. Für Fermentation und Trocknung beschreibt B i e h l außerdem eine Fusion der Lipidkörper in den Speicherparenchymzellen der Kotyledonen (B i e h l, 1972, 1973; B i e h l et al. 1982a, 1982b).

Kakaosamen stellen hinsichtlich ihres Trocknungs- und Kühlungsverhaltens keinen Einzelfall dar. R o b e r t s (1973) prägte daher den Begriff der "recalcitrant seeds" und definierte sie als Samen, die nicht wie die gegen sie abgegrenzten "orthodox seeds" ohne Verlust der Keimfähigkeit auf Wassergehalte von 5 bis 10 % getrocknet werden können. Chin (1978) und G o l d b a c h (1980a) bezeichnen mit diesem Begriff hingegen eine Gruppe extrem kurzlebiger Samenarten, bei denen die normalerweise übliche Trocknung

Wassergehalt der frischen Samen (% H ₂ O/FG)	kritischer Wassergehalt (% H ₂ O/FG)
77 %	≈ 40 %
45 %	20 - 23 %
35 %	17 - 19 %

Kriterium für den Entwicklungszustand der Samen stellt die Ausgangshydratation dar. Die eingesetzten Samen wurden Früchten eines Alters von 120 - 160 Tagen nach Handbestäubung entnommen.

Tabelle 4: Lage der kritischen Hydratation von Kakaosamen unterschiedlichen Entwicklungsalters

und Kühlung einen raschen Verlust der Keimfähigkeit nach sich zieht.

Neuerdings scheint man sich darauf geeinigt zu haben, daß es mehrere Typen recalcitranter Samen gebe, solche, die gegenüber Trocknung und Kühlung empfindlich sind, andere, die nur trockenungssensitiv sind, sowie auch relativ trockenstolerante Samenarten, die durch Kühlung auf manchmal sogar oberhalb des Nullpunktes gelegene Temperaturen geschädigt werden (C h i n et al., 1984). In dieser Arbeit werden diejenigen Samenarten, die hinsichtlich ihres Trocknungs- und eventuell auch ihres Kühlverhaltens von dem der orthodoxen Samen abweichen, als "unorthodox" bezeichnet.

Unorthodoxe Samenarten sind im allgemeinen in solchen Gebieten beheimatet, die keine jahreszeitlich bedingten Trockenperioden aufweisen. So sind Bäume des tropischen

Regenwaldes und Pflanzen, die gewöhnlich in Feuchtgebieten oder in wässrigem Milieu wachsen, häufig durch die Produktion unorthodoxer Fortpflanzungseinheiten charakterisiert. Diese werden entweder in eine relativ feuchte Umgebung oder in Wasser verbreitet; meist sind diejenigen unorthodoxen Samenarten mit der kürzesten Lebensspanne in den feuchten Tropen beheimatet, in denen die Umweltbedingungen die Keimlingsentwicklung das ganze Jahr über gleichermaßen begünstigen (C h i n und R o b e r t s, 1980).

Die meisten unorthodoxen tropischen Samenarten keimen leicht ohne Verzögerung, lediglich die Monokotyledonen wie Ölpalme und Kokosnuß zeigen nach der Ernte ein Ruhestadium von ca. 6 Wochen. Auch einige unorthodoxe Dikotyledonen der gemäßigten Klimazonen (z.B. Haselnuß oder japanische Edelkastanie) benötigen ein paar Monate bei niedriger Temperatur (1 - 5° C) zum Brechen der Keimruhe.

Viele Samen unorthodoxer Arten sind groß. Da sie aufgrund dieser Größe ein kleineres Verhältnis von Oberfläche zu Volumen besitzen und ihre Samenschalen oftmals relativ durchlässig sind, widerstehen unorthodoxe Samenarten kleineren Feuchtigkeitsschwankungen der Umgebung. K i n g und R o b e r t s (1979) sowie C h i n und R o b e r t s (1980) vermuten, daß eventuell die Samengröße zum unorthodoxen Verhalten beitrage, z.B. durch größere innere Transportprobleme. Aber Vicia faba- oder Arachis hypogaea- Samen verbinden sehr wohl Großsamigkeit und orthodoxes Samenverhalten.

Die Einstufung als unorthodox bzw. "recalcitrant" ist nicht einfach, da über viele Arten nur unvollständige Informationen vorliegen und auch manche orthodoxe Samenart aufgrund einer fehlerhaften Trocknungsmethode als unorthodox eingestuft wurde. C h i n et al. (1984) geben aus diesem Grunde ein Verfahren an, mit dessen Hilfe unorthodoxe Samenarten erkannt werden können. Zu diesem Zwecke werden Samen bei 20° C und 30° C auf einen Wassergehalt von 15 % (Frischgewichtsbasis) getrocknet, sowie zwei weitere Samenmengen auf +5° C bzw. -5° C gekühlt, und anschließend die Keimfähigkeit der Samen bestimmt. Nur diejenigen Samenarten, die alle Behandlungen überlebten, wurden als orthodox eingestuft.

Eine Auswahl unorthodoxer Samenarten ist in Tabelle 3 zusammengestellt. Die Tabelle zeigt, daß das Auftreten unorthodoxer Samenarten nicht auf einige wenige Pflanzenordnungen beschränkt ist.

C h i n et al. (1984) verglichen den Wassergehalt reifer unorthodoxer Samen mit demjenigen orthodoxer Samenarten bei Reife und fanden, daß zu diesem Zeitpunkt der übliche Hydratationsbereich unorthodoxer Samen mit 40 - 60 % deutlich höher ist als der Wassergehalt orthodoxer Samen mit 15 - 30 % (Frischgewichtsbasis).

Zur Klärung des Fragenkomplexes der Trocknungs- und Kühlungssensitivität von tropischem Saatgut konnten Alterungs- oder Lagerungsexperimente bisher keinen Beitrag leisten. Generell muß man die Frage stellen, ob derartige Lagerungsuntersuchungen zur Hinterfragung einer Kühlungs- und Trocknungsempfindlichkeit geeignet sein können. Besonders bei nicht ruhenden Samen, also der Mehrzahl der unorthodoxen Samenarten, tritt zu den beiden Faktoren Temperatur und Feuchtegehalt stets das mögliche Einsetzen von Keimungsvorgängen hinzu. Die oft außerordentlich lange Zeitspanne von mehreren Wochen bzw. Monaten läßt auch weitere metabolische Prozesse zu, so daß letztendlich eine

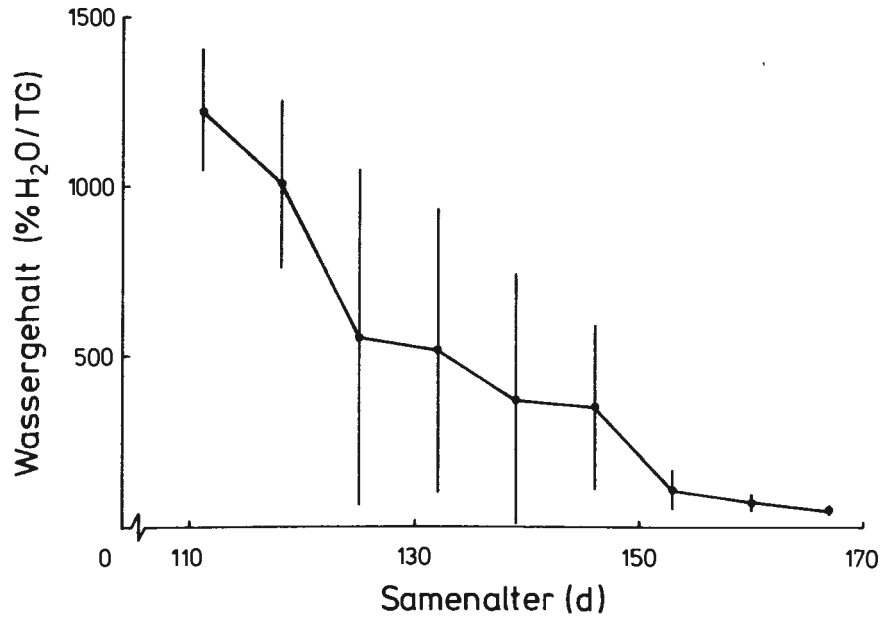


Abbildung 1: **Wassergehaltsabnahme von Kakaosamen bei Samenreifung**

Verwendet wurden Samen aus Früchten, deren Alter infolge Handbestäubung exakt bekannt war. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert aus 10 Früchten bei Bestimmung des Wassergehaltes von stets 10 Samen pro Frucht. Die vertikalen Linien geben die Standardabweichung an.

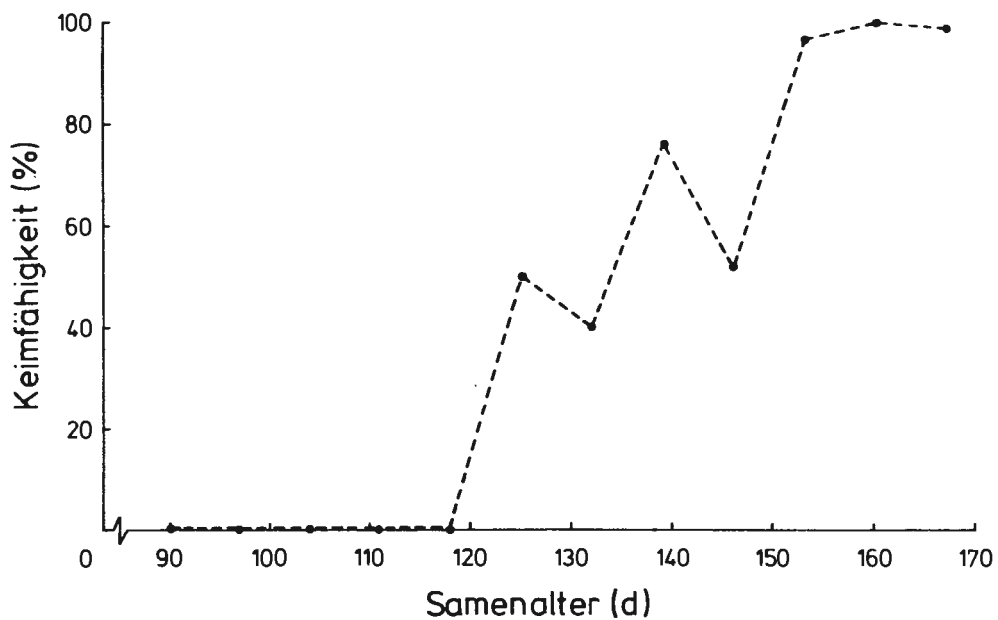


Abbildung 2: **Keimfähigkeit von Kakaoembryonen in Abhängigkeit vom Samenalter**

Verwendet wurden Samen aus Früchten, deren Alter infolge Handbestäubung exakt bekannt war. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert aus 10 Früchten.

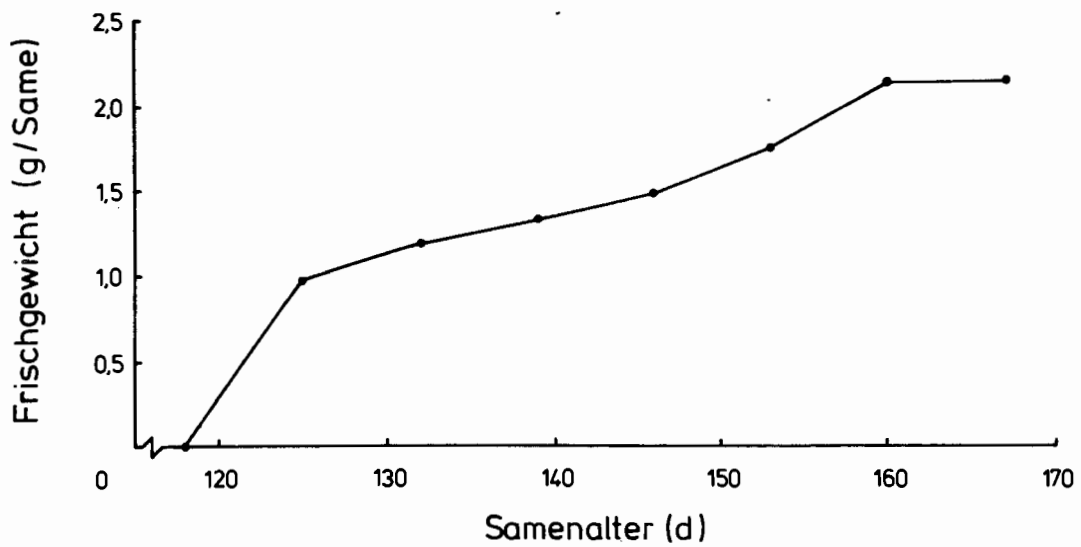


Abbildung 3: Frischgewichtszunahme von Kakaosamen bei der Samenreifung

Verwendet wurden Samen aus Früchten, deren Alter infolge Handbestäubung exakt bekannt war. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert aus 10 Früchten bei Bestimmung des mittleren Frischgewichts unter Verwendung aller Samen pro Frucht.

Zuordnung von Ursachen und Folgeeffekten weiter erschwert wird.

Trocknungs- und Kühlschädigung auf molekularer Ebene derzeitig generell nur hypothetischer Natur sind, konnte die Fragestellung nur heißen, das entscheidende Kompartiment bzw. die entscheidenden Kompartimente in den einzelnen

Da die Erklärungsweisen der Primärursachen einer

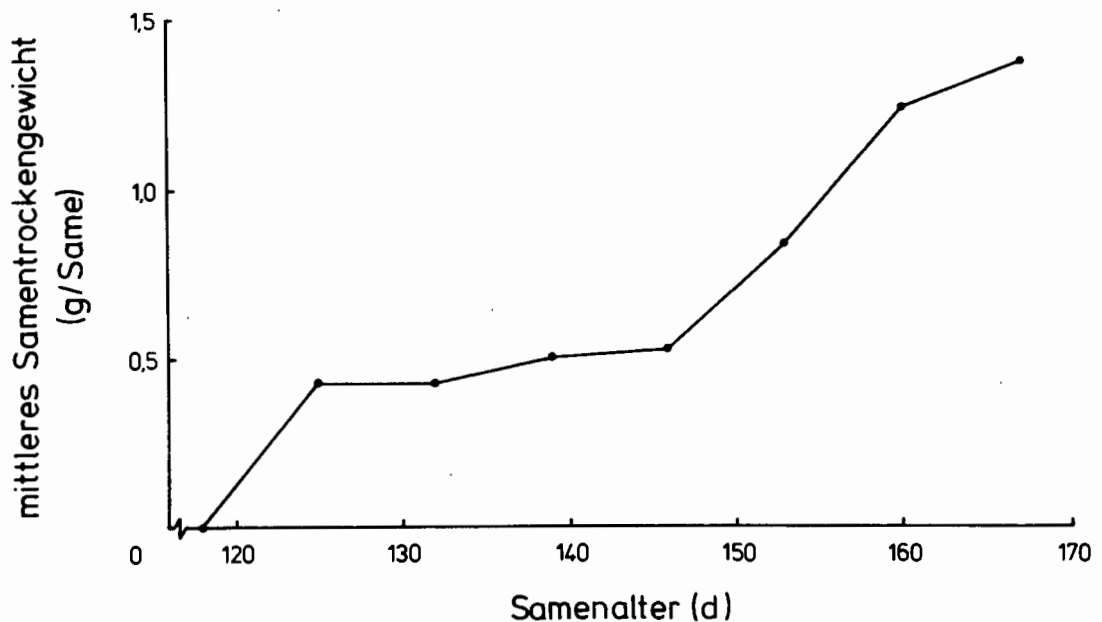


Abbildung 4: Trockengewichtszunahme von Kakaosamen bei der Samenreifung

Verwendet wurden Samen aus Früchten, deren Alter infolge Handbestäubung exakt bekannt war. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert aus 10 Früchten bei Bestimmung des Trockengewichts von 10 Samen pro Frucht.

Samenorganen aufzuspüren, dessen bzw. deren Veränderungen letztlich den Keimfähigkeitsverlust von Kakaosamen bedingen.

Im einzelnen wurden Antworten auf folgende Fragen gesucht::

-Handelt es sich im Falle von Kakaosamen infolge Trocknung und Kühlung um einen fortschreitenden Schädigungsprozeß oder existiert ein definierter kritischer Wassergehalt sowie eine kritische Temperatur und - wenn ja - welche exakten Werte nehmen diese ein?

- Ist ein Kakaosamen in einem früheren Entwicklungsstadium weniger trockenungsempfindlich als im Reifezustand?

- Welchem Entwicklungsstadium orthodoxer Samenarten entsprechen reife Kakaosamen?

- Treten in unorthodoxen Samenarten infolge Trocknung und Kühlung ultrastrukturelle Veränderungen auf, die mit dem Verlust der Keimfähigkeit korreliert sind und in orthodoxen Samenarten nicht erscheinen?

- Welches Samenorgan ist für das unorthodoxe Samenverhalten verantwortlich und liegt diesem unorthodoxen Verhalten überhaupt ein allgemeingültiges Prinzip zugrunde?

Die bisher gewonnenen Erkenntnisse werden in einer Artikelreihe beginnend mit dieser Arbeit vorgestellt.

2 Material und Methoden

2.1 Samenmaterial

Reife sowie vorreife Kakaofrüchte wurden vom Centro Agronomico Tropical de Investigation y Ensenanza (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 Polyethylenglycollösungen (PEG 4000) bestimmter Konzentration auf eine gewünschte Hydratation entwässert.

2.4 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.

2.5 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 (%H₂O/Frischgewicht) angegeben.

2.6 Ermittlung des Fettgehaltes

Das Material wurde nach Trocknung mittels eines NMR-Spektrometers (Newport Analyzer MK III) auf seinen Fettgehalt hin untersucht.

3 Ergebnisse

Bestimmt wurde die Entwicklung des Trocken- und Frischgewichtes, des Wassergehaltes sowie der Keimfähigkeit von Kakaosamen während der Samenreife. Desweiteren beschäftigt sich diese Studie mit der Frage, ob die Lage eines kritischen Wassergehaltes - sofern ein solcher existiert - von einer Vorbehandlung bzw. vom Entwicklungszustand der Samen abhängig ist.

Die im ersten Abschnitt dieser Publikationsreihe präsentierten Experimente sollten der Klärung der Frage dienen, ob es beim Kakaosamen - in Ansätzen ähnlich wie bei trockenen ruhenden Samen - bis zur Reife einen Zeitraum gibt, in dem die Hydratation sinkt. Wäre dies der Fall, so könnte ein Same, der bei Fruchtreife bereits wieder eine Zunahme des Wassergehaltes erfahren hat, in höhere Keimbereitschaft versetzt worden sein als er sie im Zeitraum verminderten Wassergehaltes innehatte.

3.1 Frischgewicht, Trockengewicht, Wassergehalt und Keimfähigkeit von Kakaosamen während der Samenreife

Die für diese Untersuchung herangezogenen Kakaosamen entstammten Früchten, die - ausgehend vom Termin der Handbestäubung - ein Alter von 90 - 167 Tagen aufwiesen. Die Wassergehaltsentwicklung während der Samenreife zeigt Abb. 1. Betrachtet man die eingetragenen Mittelwerte, so erfolgt eine kontinuierliche Dehydratation der Samen bis zum Zeitpunkt der Reife. Die durch die vertikalen Linien angedeutete Standardabweichung ist besonders im interessanten mittleren Kurvenverlauf sehr hoch. Diese Abweichungen

lassen sich sicherlich durch die unterschiedlichen Wachstumsbedingungen der Früchte (Stellung am Baum, Beschattungsmaß, Temperatur, etc.) erklären. Einen Hinweis auf eine vor der Fruchtreife einsetzende Einquellung der Samen gibt dieses Experiment nicht.

Betrachtet man die Keimfähigkeit von Kakaosamen in Abhängigkeit vom Samenalter (Abb. 2), so zeigt sich, daß erstmals 125 Tage alte Kakaosamen keimfähig sind und eine nahezu 100 %ige Keimfähigkeit von 153 Tage alten Samen erwartet werden kann.

Auf die Angabe der Standardabweichung wurde verzichtet, da im Bereich vom 125. bis zum 167. Tag nach Handbestäubung nur 10 % aller untersuchten Früchte Samenmengen enthielten, die eine von 0 % bzw. 100 % abweichende Keimfähigkeit aufwiesen.

Während das Frischgewicht im Verlaufe der Embryogenese nach einer anfänglichen starken Zunahme vom 118. bis zum 125. Tag der Entwicklung einen relativ konstanten Anstieg bis zur Samenreife zeigt (Abb. 3), kann man im Falle der Trockengewichtszunahme drei Phasen unterscheiden (Abb. 4). Zunächst tritt ein starker Zuwachs ebenfalls zwischen dem 118. und 125. Tag nach Handbestäubung ein; daran schließt sich eine bis zum 146. Tag anhaltende nahezu konstante Anstiegsphase an, welcher dann bis zur Reife eine Periode starker Trockengewichtszunahme folgt.

Interessant ist auch die Abhängigkeit der Keimfähigkeit von Kakaosamen von ihrem Trockengewicht (Abb. 5) sowie ihrem Wassergehalt (Abb. 6). Für diese Untersuchung wurden ebenfalls Samen aus Früchten verwendet, deren Alter - ausgehend vom Termin der Handbestäubung - 111 bis 167

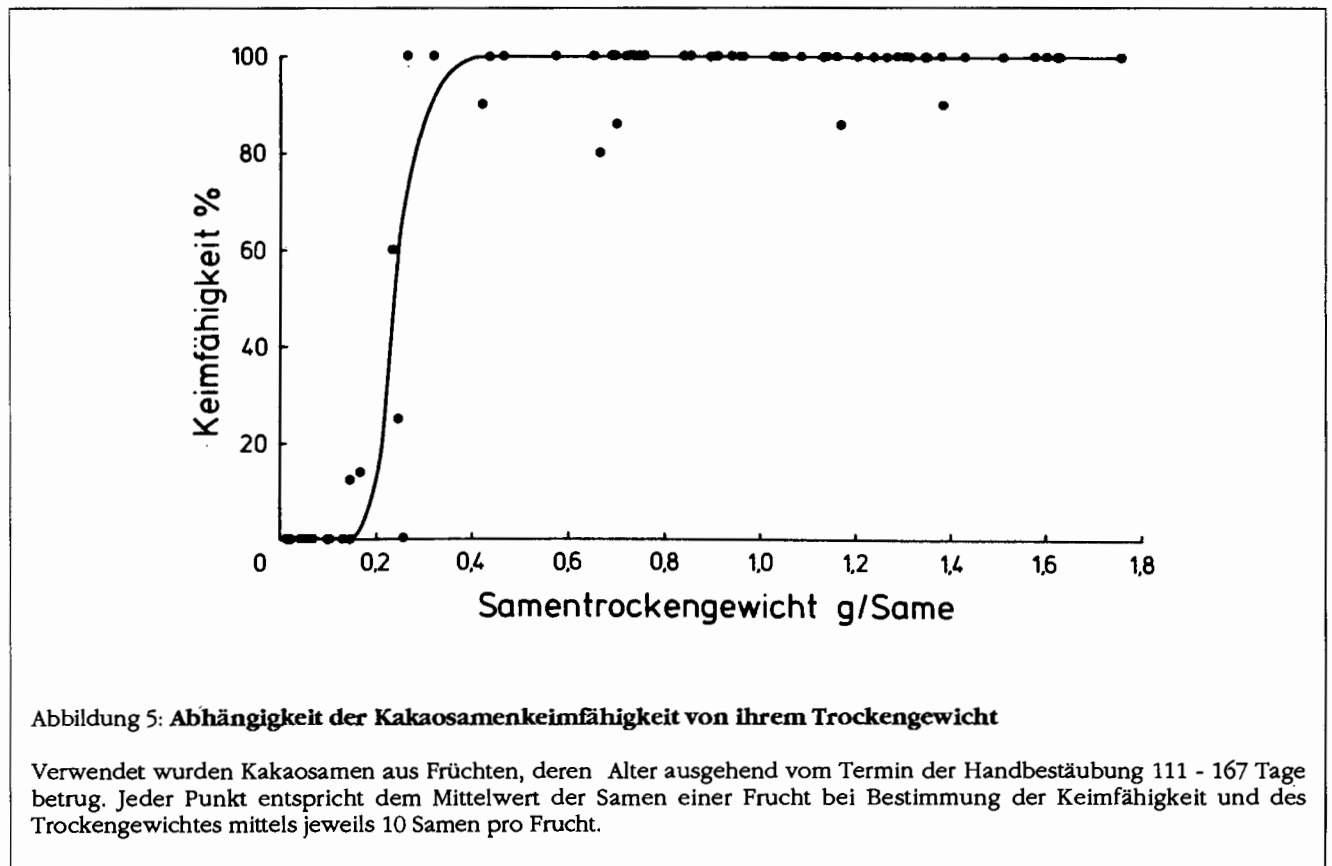
Tage betrug. Es zeigte sich, daß die Keimfähigkeit von Kakaosamen sprunghaft von 0 % auf 100 % ansteigt, sobald der Wassergehalt unter 75 - 85 % sinkt bzw. das Trockengewicht einen Wert von 0,2 bis 0,3 g übersteigt. Das bedeutet auch, daß die Samenhydratation bzw. das Trockengewicht von Kakaosamen offensichtlich einen wesentlich besseren Anhaltspunkt für den tatsächlichen Entwicklungszustand der Samen abgibt als die Zeitspanne von der Handbestäubung bis zur Ernte. Aus diesem Grund wird bei den folgenden Experimenten, in denen vorreife Kakaosamen eingesetzt wurden, die Charakterisierung des Entwicklungszustandes vorwiegend mit Hilfe der Samenfeuchte vorgenommen.

Der Terminus "reif" steht dabei für die Entwicklungsstufe, bei welcher der Wassergehalt unter 40 % abgesunken ist. In der Regel besaßen diese als reif deklarierten Kakaosamen Hydratationen zwischen 32 und 37 %.

3.2 Abhängigkeit der Lage des kritischen Wassergehaltes vom Entwicklungszustand der Kakaosamen

Gäbe es im Verlauf der Embryogenese von Kakaosamen einen Zeitraum verminderter Trocknungsempfindlichkeit oder gar eine Ruhephase, so müßte man erwarten, daß der Keimfähigkeitsverlust der Samen dieses Entwicklungsstadiums erst bei geringerer Hydratation eintritt.

Eine diesbezügliche Studie wurde mit Samen einer mittleren Hydratation von 77 %, 45 % bzw. 35 % durchgeführt (Tab. 4). Es zeigte sich, daß Kakaosamen jeweils in dem angegebenen recht eng begrenzten Feuchteintervall sprunghaft ihre Lebensfähigkeit verlieren. Weiterhin ist zunächst auffällig, daß dabei stets etwa der Faktor 2 auftritt, Kakaosamen also



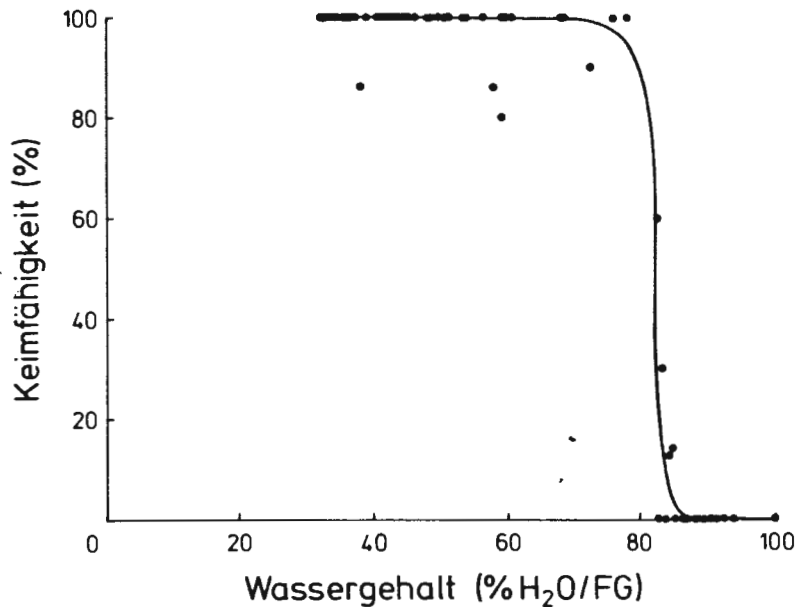


Abbildung 6: Abhängigkeit der Kakaosamenkeimfähigkeit von ihrem Wassergehalt

Verwendet wurden Kakaosamen aus Früchten, deren Alter ausgehend vom Termin der Handbestäubung 111 - 167 Tage betrug. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert der Samen einer Frucht bei Bestimmung der Keimfähigkeit und des Wassergehaltes mittels jeweils 10 Samen pro Frucht.

maximal nur auf die Hälfte ihrer Ausgangsfeuchte entwässert werden können. Berücksichtigt man jedoch die Lipidakkumulation während der Entwicklung, könnten sich - bezogen auf die fettfreie Trockenmasse durchaus ähnliche kritische Hydratationen ergeben.

Festzuhalten bleibt, daß vorreife Kakaosamen einen höheren kritischen Wassergehalt aufweisen als reife Kakaosamen.

Vergleicht man die Trocknung 153, 160 bzw. 167 Tage alter Kakaosamen (handbestäubtes Material) nach 25,5 Stunden Einquellung bei 22° C (Abb. 7), so zeigt sich erneut eine viel stärkere Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit vorreifer Kakaosamen. Während nämlich 153 sowie 160 Tage alte Samen eine starke Verminderung der anfänglich nahezu 100 %igen Keimfähigkeit infolge dieser Behandlung erleiden, zeigen reife Kakaosamen nur eine geringfügige Beeinträchtigung ihrer Lebensfähigkeit.

Läßt man reife Kakaosamen noch mehr Wasser aufnehmen, sodaß etwa die Hälfte der Samen bereits eine sichtbare Keimung in Form eines Vorschubens der Radikula um bis zu 4 mm zeigt, so nimmt zwar einerseits die Keimfähigkeit so behandelter Samen bereits bei höheren Wassergehalten ab, andererseits bleibt jedoch der kritische Wassergehalt im Bereich von 17 - 19 % erhalten (Abb. 8). Da bekannt ist, daß nur bei einem Teil der Samen eine sichtbare Keimung vorlag, wurden sehr wahrscheinlich nur diejenigen Samen durch Trocknung auf Wassergehalte deutlich oberhalb der kritischen Hydratation geschädigt, die bereits erkennbar mit der Keimung begonnen hatten, sich also schon im Zellstreckungs- oder eventuell Zellteilungsstadium befanden. Dies führte zu der Depression der Lebensfähigkeit auf ca. 50 % bei Samenfeuchten von 27,5 bis 18 %. Der unveränderte kritische

Wassergehalt spiegelt hingegen das Verhalten derjenigen Samen wider, die während der Imbibition nicht über eine Wasseraufnahme hinaus kamen.

Abb. 8 läßt sich weiter entnehmen, daß der Bereich der kritischen Hydratation durch die während der Trocknung herrschende Temperatur nicht beeinflusst wird. Das Ergebnis der Entwässerung vorgequollener vorreifer Samen einer Hydratation von ca. 68 % entspricht sehr gut den anhand von Abb. 7 vorgestellten Befunden.

4 Diskussion

Eine der Schlüsselfragen im Zusammenhang mit dem unorthodoxen Samenverhalten ist, ob man den Zustand des reifen unorthodoxen Samens mit einem Entwicklungsstadium orthodoxer Samen gleichsetzen kann, und wenn ja, mit welchem. Der erhöhte Wassergehalt reifer unorthodoxer Samen im Vergleich zu reifen orthodoxen Samenarten engt die in Frage kommenden Stadien ein auf den Zeitraum vor dem Eintritt in die Reifetrocknungsphase sowie denjenigen nach eingetretener Keimung, zu dem die Samen bereits wieder soviel Wasser aufgenommen haben, daß sie trockenungsempfindlich wurden. Dieser Zeitpunkt des Verlustes der Trocknungsresistenz ist in der Literatur für viele Pflanzenarten beschrieben worden, u. a. für Hafer und *Lotus corniculatus* (McKersie und Tomes, 1980), Moose (Bewley, 1979), Roggen (Sen und Osborne, 1974; Sargent et al. 1981), Sojabohnen (Senarathna und McKersie, 1983a,b) und Weizen (Marinos und Fife, 1972).

Bezogen auf das Problem der Trocknungssensitivität von Kakaosamen erschien es denkbar, daß Kakaosamen während

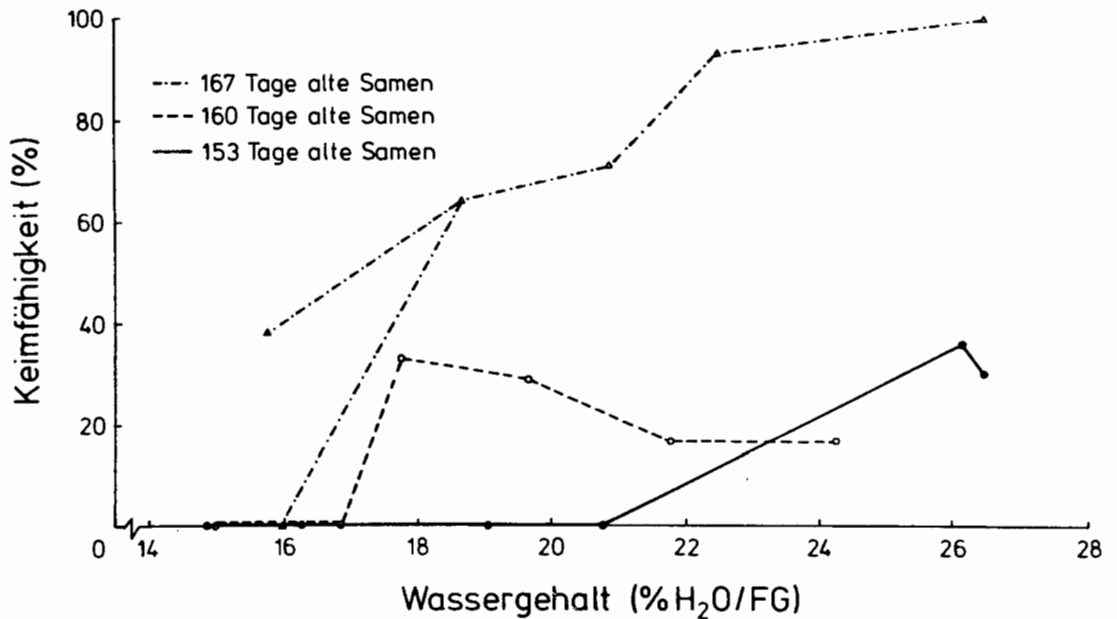


Abbildung 7: Trocknung vorgequollener Kakaosamen unterschiedlichen Reifegrades

Die eingesetzten Samen entstammten Früchten, die - ausgehend vom Termin der Handbestäubung - ein Alter von 153, 160 und 167 Tagen erreicht hatten. Der Wassergehalt der Samen betrug $49,9 \pm 11,4\%$, $42,4 \pm 6,9\%$ bzw. $34,6 \pm 1,9\%$; die Keimfähigkeit lag bei 97, 100 bzw. 99%, das mittlere Frischgewicht bei $2,0 \pm 0,2$, $2,3 \pm 0,3$ bzw. $2,1 \pm 0,3$ g/Same.

Die infolge 25,5-stündiger Einquellung aufgenommene Wassermenge betrug $23,8 \pm 10,6$, $14,9 \pm 4,2$ bzw. $17,9 \pm 4,8\%$ H₂O/TG. Die Entwässerung der Samen erfolgte durch Einbringen der Samen in wässrige Lösungen von Polyethylenglycol (PEG 4000) unterschiedlicher Konzentration (40-62%). Die Trocknung erstreckte sich über einen Zeitraum von 72 Stunden. Die Temperatur während der Einquellung betrug 22° C.

ihrer Entwicklung bereits eine Phase geringerer Hydratation durchlaufen haben, bevor sie nach erneuter Wasseraufnahme zum Zeitpunkt der Fruchtreife ihre Trocknungsempfindlichkeit erlangten. Besonders die vorzeitige Keimbereitschaft von Kakaosamen (A den i k i n j u, 1972; P a s s e r n, 1979) und das Fehlen einer Keimruhe (H o l d e n, 1959) ließen diese Möglichkeit in Betracht kommen.

Die Interpretation der Abhängigkeit des Feuchtegehaltes von Kakaosamen von ihrem Entwicklungsalter (Abb. 1) gestaltet sich in diesem Zusammenhang äußerst schwierig. Gerade im interessanten Zeitraum der Embryogenese (120. bis 150. Tag nach Handbestäubung), in dem eine Entwässerung der Samen erwartet werden könnte, ist die Schwankungsbreite der Werte so hoch, daß eine Auswertung für diese Zwecke unmöglich ist. Betrachtet man nur die Mittelwerte, so scheint eine kontinuierliche Dehydratation der Samen vorzuliegen. Da auf eine Analyse des Fettgehaltes verzichtet werden mußte, war die Unterscheidung zwischen Wasserabnahme und Massenzunahme im Entwicklungsverlauf nicht möglich. Ein entscheidender Anhaltspunkt läßt sich dieser Untersuchung jedoch entnehmen. Die enge Konzentration der Wassergehalte reifer Samen (153 - 167 Tage nach Handbestäubung) auf ein für die Kakaosamenentwicklung geringes Hydratationsniveau zeigt, daß mit großer Wahrscheinlichkeit zum Ende der Entwicklung von Kakaosamen kein erneuter Anstieg der Samenfeuchte auftritt; eine Tatsache, welche die Hypothese des Durchlaufens einer - wenn auch nur geringen - Trocknungsphase vor der Reife nicht unterstützt.

Als ein weiteres Indiz gegen das Vorliegen eines Zeitraumes verminderter Hydratation während der Kakaosamenreifung kann in Antwort auf die erste eingangs gestellte Frage festgehalten werden, daß vorreife Kakaosamen auch einen angehobenen kritischen Feuchtegehalt besitzen. Eine Zeitspanne geringerer Hydratation würde aber den entgegengesetzten Effekt, also eine verringerte Trocknungssensitivität, erwarten lassen.

Der Hypothese wird außerdem durch die Tatsache widersprochen, daß reife Kakaosamen nach einer gewissen Einquellzeit eine erhöhte Dehydratationssensitivität bei gleicher Lage des kritischen Wassergehaltsbereiches demonstrieren. Diese Einquellung vor der Trocknung wirkt sich außerdem auf die Keimfähigkeit vorreifer Samen fataler aus als auf diejenige reifer Samen.

Zusammengenommen schließen die genannten Befunde die Möglichkeit aus, daß Kakaosamen während der Reifung eine Phase verminderter Hydratation durchlaufen.

Versucht man mittels der gewonnenen Anhaltspunkte einen Vergleich des Zustandes reifer Kakaosamen mit einer Entwicklungsphase orthodoxer Samenarten, so läßt sich auch die dritte der eingangs gestellten Fragen dahingehend beantworten, daß besonders die erhöhte Trocknungsempfindlichkeit eingequollener Kakaosamen auf ein Stadium vor dem Eintritt in die Reifetrocknungsphase hindeutet und nicht auf einen Zeitpunkt während der frühen Keimung.

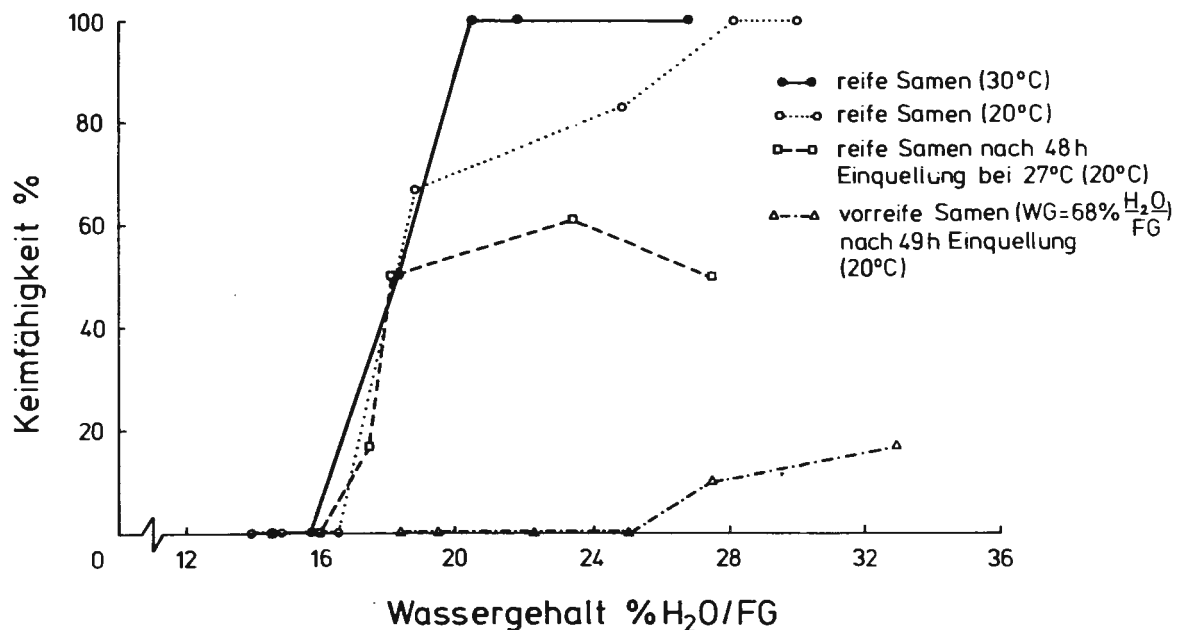


Abbildung 8: Trocknung 48 Stunden vorgequellener Kakaosamen

Die verwendeten reifen Samen besaßen zu Versuchsbeginn einen Wassergehalt von $35,1 \pm 2,9\%$, eine Keimfähigkeit von 100 % sowie ein Frischgewicht von $2,3 \pm 0,3$ g/Same, die vorreifen Samen - 146 Tage nach Handbestäubung geerntet - eine Hydratation von $68,0 \pm 20\%$, eine Keimfähigkeit von 52 % sowie ein Frischgewicht von $1,5 \pm 0,5$ g/Same.

Die Trocknung erfolgte durch Einbringen der Samen in wäßrige Lösungen von PEG 4000 unterschiedlicher Konzentration (45-70 %). Die Trocknungsdauer betrug 72 Stunden. Die Temperaturangaben in Klammern beziehen sich nur auf den Zeitraum der Trocknung. Die aufgenommene Wassermenge nach 48 stündiger Einquellung bei 27° C betrug bei reifen Samen $28,0 \pm 4,2\%$ H₂O/TG, bei 146 Tage alten Samen nach 49 Stunden bei 22° C $72,5 \pm 18,3\%$ H₂O/TG.

Gegen diese Hypothese spricht allenfalls die Tatsache, daß orthodoxe Samenarten vor dem Erreichen des Zustandes der Reifetrockeneit üblicherweise eine äußerst geringe Keimfähigkeit besitzen. Bei *Phaseolus lunatus* konnte jedoch festgestellt werden, daß deren Samen vor der Entwicklung einer Trocknungstoleranz bereits in der Lage waren zu wachsen (Klein und Pollock, 1968). Bekannt ist außerdem die enorme Wasseraufnahmefähigkeit von Kakaosamen zu Keimungsbeginn (Rosch et al., 1961). Eine derartige Wasseraufnahme aufgrund des negativen Matrixpotentials von Proteinvakuolen ist von der Keimung trockener orthodoxer Samenarten bekannt (Bewley und Black, 1978). Diese Aspekte machen eine zum Zeitpunkt der Reife möglicherweise bereits eingesetzte Keimung weiterhin nicht wahrscheinlich.

In den weiteren Beiträgen zu dieser Publikationsreihe lag aufgrund der hier diskutierten Befunde der Schwerpunkt der Arbeiten auf der näheren Eingrenzung der primären Ursachen der Trocknungs- und Kühlungsempfindlichkeit von Kakaosamen.

Zusammenfassung

Die aus Gründen der Erhaltung der genetischen Ressourcen des Kakao (*Theobroma cacao* L.) wünschenswerte Lagerung von Kakaosamen ist auf wenige Monate limitiert. Die für eine längerfristige Aufbewahrung von Kakaosamen erforderliche Trocknung und Kühlung auf die für die Lagerung von Samen üblichen Werte führen stets zum Verlust der Lebensfähigkeit

der Kakaosamen. Die primären Ursachen dieses Lebensfähigkeitsverlustes sind bisher nicht bekannt. Zweck dieser Studie war es, Anhaltspunkte für die Natur dieser Ursachen zu finden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß für reife Kakaosamen ein kritischer Grenzwert der Hydratation im Feuchtebereich von 17-19 % besteht. Vorreife Kakaosamen erwiesen sich als trockenungsempfindlicher als reife Kakaosamen. Dies zeigte sich in einem höheren kritischen Wassergehalt dieser Samen sowie einer deutlich gesteigerten Trocknungsempfindlichkeit bei Rücktrocknung vorgequellener vorreifer Kakaosamen.

Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß ein Zeitraum verminderter Hydratation während der Kakaosamenentwicklung, gefolgt von einem Anstieg des Wassergehaltes bis zum Zeitpunkt der Fruchtreife, nicht existiert. Reife Kakaosamen entsprechen somit hinsichtlich ihres Entwicklungszustandes orthodoxen Samenarten vor dem Eintritt in die Reifetrocknungsphase.

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

I. Influence of developmental stage

The storage of cacao (*Theobroma cacao* L.) seeds, which is desirable in respect to the preservation of genetic resources of cacao, is limited to a few month. The required dehydration and cooling to values usually applied to the long-term

conservation of seeds always leads to viability loss of cacao seeds. The primary causes of this loss of viability are at time unknown. The purpose of this study was to find indications for the nature of these causes.

In this essay it could be shown, that a critical limiting value of seed hydration exists in the range of 17 - 19 % . Premature cacao seeds proved to be more sensitive to desiccation than mature seeds. This is supported by a higher critical water content of these seeds as well as a significantly increased sensitivity to water stress of premature cacao seeds due to dehydration after a preimbibition period.

Furthermore it is demonstrated, that an interval of reduced seed hydration in cacao seed development, followed by an increase in water content up to the date of fruit ripeness does not exist. In respect to their developmental stage, mature cacao seeds correspond to orthodox seed species prior to entering the maturation drying period.

Literatur

- Adenikinju, S.A.: Effects of pod maturity on bean development, viability, mucilage content and seedling vigour in cacao. - Expl. Agric. 10(1972), S. 123-129.
- Alvim, P. de T.: Un procedimiento simple para conservar el poder germinativo de los semillas de cacao. - Septima Conferencia Interamericana de Cacao, Palmira, Colombia, (1958), S. 277-282.
- Are, L.A.: Cacao seed storage. - Ann. Rep. West African Cacao Research Institute 1963/64, (1964).
- Barton, L.V.: Viability of seeds of *Theobroma cacao* L. - Contrib. Boyce Thompson Institute 23, (1965), S. 109-122.
- Barton, L.V. und Solt, M.L.: Growth inhibitors in seeds. - Contrib. Boyce Thompson Institute 15, (1948), S. 259-278.
- Bewley, J.D.: Physiological aspects of desiccation tolerance. - Ann. Rev. Plant Physiol. 30, (1979), S. 195-238.
- Bewley, J.D. und Black, M.: Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. Vol. 1: Development, germination and growth. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, (1978).
- Biehl, B.: Enzymologische und cytologische Probleme der Kakaoaufbereitung. - Ann. Technol. Agric. 21, (1972), S. 435-455.
- Biehl, B.: Veränderungen der subzellulären Struktur in Keimblättern von Kakaosamen während der Fermentation und Trocknung. - Z. Lebensm.-Unters.-Forsch. 153, (1973), S. 137-150.
- Biehl, B., Passern, D. und Sagemann, W.: Effect of acetic acid on subcellular structure of cocoa bean cotyledons. - J. Sci. Food Agric. 33, (1982a), S. 1101-1109.
- Biehl, B. und Passern, D.: Proteolysis during fermentation-like incubation of cocoa seeds. - J. Sci. Food Agric. 33, (1982b), S. 1280-1290.
- Biehl, B., Wewetzer, C., Passern, D.: Vacuolar (Storage) proteins of cocoa seeds and their degradation during germination and fermentation. - J. Sci. Food Agric. 33, (1982c), S. 1291-1304.
- Boroughs, H. und Hunter, J.R.: Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de semillas de cacao. - Turrialba 11, (1961), S. 160.
- Boroughs, H. und Labarca, C.: Factors affecting cacao germination. - Turrialba 12, (1962), S. 210-212.
- Boroughs, H. und Hunter, J.R.: The effect of temperature on the germination of cacao seeds. - Amer. Soc. Hortic. Sci. 82, (1963), S. 222-224.
- Casas, J.A. und Ibanez, M.L.: The relationship between respiration and germination with the moisture content in cacao seeds. - Turrialba 14, (1964), S. 155-156.
- Chin, H.F.: Germination and storage of rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) seeds. - Malaysian Agric. 4, (1975), S. 173-180.
- Chin H.F.: Production and storage of recalcitrant seeds in the tropics: seed problems. - Acta Hort. 83, (1978), S. 17-21.
- Chin, H.F. und Roberts, E.H.: Recalcitrant crop seeds. Tropical Press, Kuala Lumpur, Malaysia, (1980).
- Chin, H.F., Hor, Y.L. und Lassim, M.B.: Identification of recalcitrant seeds. - Seed Sci. Technol. 12, (1984), S. 429-436.
- Elze, D.C.: Germination of Citrus seeds in relation to certain nursery practices. - Palestine J. Bot. 7, (1949), S. 69-80.
- Evans, H.: The preservation of cacao seed for transport purposes. - Rep. Cacao Research 1945-1951, I.C.T.A., Trinidad, (1953), S. 79.
- Friend, R.J.: Some experiments on the storage of cacao seed in a viable condition. - Papua and New Guinea Agric. 17, (1964), S. 12-18.
- Goldbach, H.: Versuche zur Verlängerung der Lebensfähigkeit von extrem kurzlebigen Saatgut ("recalcitrant seed"). - Landwirtsch. Forsch., Sonderh. 37, Kongreßband Braunschweig, (1980a), S. 342-345.
- Goldbach, H.: Imbibed storage of cacao seeds in osmotic solutions. - Plant Genetic Resources Newsletters 43, (1980b), S. 16.
- Gopal, N.H. und Ramaiah, P.K.: Studies on the physiology of germination of coffee seed. I. Observations on sprouting. - J. Coffee Res. 2, (1972), S. 14-19.
- Hansen, A.J. und Hunter, J.R.: A preliminary experiment on the protection of cacao seeds. - Proc. 8. Inter-Amer. Cacao Conf. Trinidad, Government Press, (1960), S. 121-125.
- Holden, M.: Processing of raw cacao. III. Enzymic aspects of cacao fermentation. - J. Sci. Food Agric. 12, (1959), S. 691-700.
- Holden, E.M.: - Ann. Rep. of the West African Research Institute, Ghana, (1958), S. 66.

- Hunter, J.R.: La germinacion de Theobroma cacao. - Turrialba 4, (1959), S. 1-9.
- Ibanez, M.L.: The point of irreversibility in cacao seed sensitivity to cold. - Turrialba 13, (1963), S. 127-128.
- Ibanez, M.L. und Casas, I.A.: The effect of pH on cacao seed germination inhibition by mucilage of the cacao pod. - Turrialba 15, (1965), S. 353-354.
- 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).
- King, M.W.: zit. in Chin und Roberts (1980) als unveröffentlicht.
- King, M.W. und Roberts, E.H.: The storage of recalcitrant seeds. Achievement and possible approaches. - Rep. on a literature review carried out for the IBPGR, Rome, (1979).
- King, M.W. und Roberts, E.H.: The imbibed storage of cocoa (Theobroma cacao) seeds. - Seed Sci. Technol. 10, (1982), S. 535-540.
- 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.
- Luan, H.Y.; Chin, H.F. und Mohd. Zain Karim: The effect of seed moisture and storage temperature on the storability of cocoa (Theobroma cacao L.) seeds. - Seed Sci. Technol. 12, (1984), S. 415 - 420.
- Marinos, N.G. und Fife, D.N.: Ultrastructural changes in wheat embryos during a "presowing drought hardening" treatment. - Protoplasma 74, (1972), S. 381-396.
- Mc Kersie, B.D. und Tomes, D.T.: Effects of dehydration treatments on germination, seedling vigour, and cytoplasmic leakage in wild oats and birdsfoot trefoil. - Canad. J. Bot. 58, (1980), S. 471-476.
- Mossu, G.: The conservation of the germinative power of cacao seeds. - Cafe, Cacao, The (Paris) 18, (1974), S. 179-186.
- 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.
- Nautiyal, A.R., Thapliyal, A.P. und Purohit, A.N.: Seed viability in sal. IV. Protein changes accompanying loss of viability in Shorea robusta. - Seed Sci. Technol. 13, (1985d), S. 83-86.
- Nwachuku, N.I.C.: Storage conditions of viability of cocoa seeds. - West African Cocoa Research Institute Memorandum, (1961).
- Passern, D.: Zur Aktivität und zellulären Kontrolle saurer Proteasen während Samenentwicklung, Keimung und Fermentation von Kakaosamen (Theobroma cacao L.). - Dissertation, Techn. Universität Braunschweig, (1979).
- 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.
- Roberts, E.H.: Predicting the storage life of seeds. - Seed Sci. Technol. 1, (1973), S. 499-514.
- Roesch, E., Schubiger, G.F. und Egli, R.H.: Biochemical changes in cocoa beans during germination and growth. - The Chemistry of Cocoa, BFMIRA Sci. and Techn. Survey 1961 No. 38, (1961), S. 3-12.
- Saenz, E.J.: Retardamiento de la germinacion de semillas de cacao por medio de azucares. - Turrialba 13, (1963), S. 231-233.
- Sargent, J.A., Mandi, S.S. und Osborne, D.J.: The loss of desiccation tolerance during germination: An ultrastructural and biochemical approach. - Protoplasma 105, (1981), S. 225-239.
- Sen, S. und Osborne, D.J.: Germination of rye embryos following hydration-dehydration treatments: enhancement of protein and RNA synthesis and earlier induction of DNA replication. - J. Exp. Bot. 25, (1974), S. 1010-1019.
- Senaratna, T. und Mc Kersie, B.D.: Dehydration injury in germinating soybean (Glycine max L. Merr.) seeds. - Plant Physiol. 72, (1983a), S. 620-624.
- Senaratna, T. und Mc Kersie, B.D.: Characterization of solute efflux from dehydration injured soybean (Glycine max L. Merr.) seeds. - Plant Physiol. 72, (1983b), S. 911-914.
- Sonwalkar, M.S.: A study of jackfruit seeds. - Indian J. of Horticulture 8, (1951), S. 27-30.
- Swarbrick, J.F.: Storage of cocoa seeds. - Exp. Agric. 1, (1965), S. 201-207.
- Vaughan, J.G.: Sterculiaceae - cacao. - In: Structure and utilization of oil seeds. Chapman and Hall Ltd., London, (1970), S. 241-244.
- Velasco, J.R. und Gutierrez, J.: Germination and its inhibition in coffee. - Philippine J. of Sci. 103, (1974), S. 1-11.
- Villa, C.L.: Pruebas par ampliar el periodo de viabilidad cacao. - Agricultura Tecnica en Mexico 2, (1962), S. 133-136.
- Winters, H.F. und Rodriguez-Colon, F.: Storage of mangosteen seeds. - Proc. Amer. Soc. Hortic. Sci. 61, (1953), S. 304-306.
- 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.

Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), Leiter: Prof. Dr. agr. Manfred Dambroth.

Verfasser: Rühl, Gerhard, Dr. rer. nat., Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Bundesforschungsanstalt für

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