

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

### II. Trocknungsparameter und Exsudation trocknender Kakaosamen und Kakaosamenorgane

GERHARD RÜHL, MANFRED DAMBROTH und BÖLE BIEHL

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung

#### Einleitung

Die maximal mögliche Lagerungsperiode der Samen vieler tropischer Pflanzenarten ist auf wenige Monate bis Jahre limitiert (Chin und Roberts 1980). Da die Grundlage einer Langzeiterhaltung der genetischen Ressourcen von Pflanzen eine Trocknung und Kühlung der Samen beinhaltet, soll am Beispiel von Kakaosamen die Sensitivität tropischer Samen gegenüber diesen Parametern hinterfragt werden.

Im ersten Beitrag zu dieser Reihe konnte gezeigt werden, daß für reife Kakaosamen ein kritischer Grenzwert der Hydratation im Feuchtebereich von 17-19% besteht. Vorreife Kakaosamen erwiesen sich als trocknungsempfindlicher als reife Kakaosamen (Rühl, Dambroth, Biehl 1988).

Es konnte darüber hinaus verdeutlicht 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.

Die wenigen systematischen Beiträge zur Erforschung des raschen Lebensfähigkeitsverlustes recalcitranter Samenarten nach der Ernte lassen immer wieder eine Mitwirkung von Membranstrukturen vermuten (Chin et al. 1981; Nautiyal und Purohit 1985 a-c)

In der vorliegenden Arbeit werden bestimmte Aspekte der Entwässerung von Kakaosamen (Trocknungsmethode, Trocknungsrate, Wassergehalt der Samenorgane im Verlaufe der Trocknung) untersucht und die Exsudationsrate von Kakaosamen und -samenorganen unterschiedlicher Hydratation ermittelt. Die Exsudation von Kakaosamen in Abhängigkeit von ihrem Wassergehalt kann ohne großen Aufwand Hinweise auf die Beteiligung von Membranstrukturen am Lebensfähigkeitsverlust tropischer Samen infolge Wasserentzuges liefern (Simon und Raja Harun 1972; Simon 1974; Hendricks und Taylorson 1976; Hegarty 1978; Mc Kersie und Stinson 1980; Mc Kersie und Tomes 1980; Chabot und Leopold 1982).

#### 1 Material und Methoden

##### 1.1 Samenmaterial

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

Fast alle Experimente mit Kakaosamen wurden an Früchten des Klons UF 613 durchgeführt. Für einige Untersuchungen wurden Früchte 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 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.

##### 1.5 Ermittlung des Fettgehaltes

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

##### 1.6 Messung der Exsudationsrate einquellender Samen

Von der Testa befreite frische sowie vorgetrocknete reife Sa-

men 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 Kakao- 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.

## 2 Problemstellung und Literaturüberblick

Untersuchungen, die sich mit möglichen Ursachen der Trocknungsempfindlichkeit unorthodoxer Samenarten befassen, sind bisher äußerst spärlich. Derartige Beobachtungen beschränken sich auf die Samen von *Theobroma cacao* (Casas und Ibanez 1964), *Shorea robusta* (Nautiyal und Purohit 1985 a-c; Nautiyal et al. 1985), *Hevea brasiliensis* (Chin et al. 1981), *Citrus aurantium* (Edwards und Mumford 1985), sowie die Vermehrungskörper von *Avicennia marina* (Berjak et al. 1984).

Casas und Ibanez (1964) stellten bei Kakaosamen eine kontinuierliche Abnahme der Atmungsrate mit dem Feuchtegehalt fest, die bei einer Hydratation von 14 % auf 0 sank.

Der Trocknungsbeginn von Salbaumsamen sei von einer Abnahme des Gehaltes an löslichen Kohlenhydraten begleitet (Nautiyal und Purohit 1985 a). Die Autoren vermuten, die frühzeitige und rasche Trocknung der sehr porösen Samenschale sei einer der wesentlichen Faktoren, der für die geringe Überlebensrate dieser Samenart verantwortlich sei. Außerdem könne der hohe Gerbstoffgehalt des Embryos zur Proteindenaturierung führen, die wiederum eine Unfähigkeit zu Reparaturprozessen sowie eine Störung oder Verhinderung von Stoffumsatzsystemen nach sich ziehen könne.

Chin et al. (1981) untersuchten ultrastrukturelle Veränderungen in den Zellen der Keimwurzelspitze von Heveasamen und stellten zerrissene Zellwände, eine Fragmentierung des cytoplasmatischen Inhaltes, unregelmäßige Zellkerne mit stark kontrastierten Chromatinbereichen, deren Begrenzungsmembran manchmal nicht gut erkennbar war und einen Nucleolus vermissen ließen, sowie eine Ausflockung der Gummipartikelchen fest. Da die Samen jedoch ausschließlich auf einen letalen Feuchtegehalt entwässert wurden, konnte nicht zwischen Ursachen und Folgen unterschieden werden.

Edwards und Mumford (1985) zeigten, daß bei der Trocknung von *Citrus aurantium*-Samen offensichtlich einem Gleichgewicht zwischen den Faktoren Feuchteverlust, Trocknungsgeschwindigkeit und Vorhandensein der Samenschale besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden müsse. Darü-

ber hinaus induziere Sauerstoff Keimungsprozesse, während Kohlendioxid zum Lebensfähigkeitsverlust der Samen führe. Habe man diese Samen einmal erfolgreich getrocknet, so sei ihr Verhalten gegenüber Kälte und niedrigem Sauerstoffpartialdruck identisch mit demjenigen der meisten orthodoxen Samenarten (King et al. 1981; Mumford und Panggabean 1982). Das hieße, die kritische Phase sei die Stoffwechselreduktion ohne Beeinträchtigung der Organellen, Gewebe oder Enzyme, die für den Ablauf der Keimung bei Rehydratation benötigt werden. Ein solches Gleichgewicht zwischen Trocknung und Stoffwechseleinschränkung sowie Hydratation und Keimung sei manchmal sogar unter natürlichen Bedingungen nicht gegeben und führe demzufolge zum Beginn der Keimung auf der Mutterpflanze.

Zu einer ähnlichen Interpretationsweise gelangen auch Berjak et al. (1984) anhand der ultrastrukturellen Betrachtung der Wurzelspitzenprimordien von *Avicennia marina* bei gradueller Entwässerung. Sie kommen zu dem Schluß, daß die ersten Trocknungsstadien nicht denen trocknender orthodoxer Samen entsprächen, sondern eher für die frühe Keimung orthodoxer Samen charakteristisch seien. Allerdings erforderte die Entwässerung des Untersuchungsmaterials eine außerordentlich lange Zeitspanne, da der Zeitpunkt des abrupten Lebensfähigkeitsverlustes frühestens nach 10 - 15 Tagen erreicht werden konnte.

Die Autoren vermuten, der Wasserentzug führe direkt zu einer Stoffwechseldesorganisation mit schädigender Wirkung. Außerdem erfordere die höhere Stoffwechselaktivität unorthodoxer Samen eine größere Menge Vicinalwasser, so daß derartig fest gebundene Wassermoleküle während der Dehydratation bereits bei höheren Feuchtegehalten entfernt würden als in orthodoxen Samenarten. Das hieße, es liefen zunächst Keimungsvorgänge ab, die bei Entwässerung in desorganisierter Weise unterbrochen würden, zu einer Unordnung im Cytoplasma führen und dadurch den Verlust der Stabilität subzellulärer Strukturen nach sich ziehen.

Neben diesen spärlichen Erkenntnissen zur Schadensursache unorthodoxer Samenarten infolge Dehydratation existiert jedoch eine Vielzahl von Anhaltspunkten zur möglichen Natur eines Trocknungsschadens anhand von Untersuchungen orthodoxer Samenarten, die nach Einquellung trockenungssensitiv wurden, anhand der frostassoziierten Dehydratation sowie der Trocknung während Samenreife, oder sie wurden an trockenungsempfindlichen Pflanzenteilen oder Moosen gewonnen.

Wenn auch der physiologische Zustand dieser Gewebe nicht mit dem reifer unorthodoxer Samenarten übereinstimmen mag, sind doch die durch Entwässerung pflanzlicher Gewebe hervorgerufenen Phänomene oft ähnlich, so daß eine Betrachtung der in diesen Fällen erwogenen Ursachen durchaus von Nutzen sein sollte.

Wohl die einfachste Erklärung wäre, daß der Wasserentzug selbst den entscheidenden Faktor einer Trocknungssensitivität darstellt. Wasser in direkter Nachbarschaft zu Makromolekülen befindet sich nach Verzar (1968) vermutlich in einem semikristallinen Zustand. Wird das Gewebe lufttrocken, werde das verbleibende Wasser fest an die Zellkolloide gebunden und viele Enzymkontrollierten Reaktionen, besonders solche, die große Struktureinheiten einschließen, träten unter diesen Bedingungen nicht mehr auf (Askenov et al. 1969, 1977). Harrington (1972) postulierte drei Zustände des Wassers in der Zelle: eine Einzelschicht um Makromoleküle, in welcher das Wasser an ionische Gruppen gebunden vorlie-

ge, mehrere Schichten über Wasserstoffbrücken fixiertes Wasser oberhalb dieser Einzelschicht, sowie freies, ungebundenes, durch Kapillarkräfte gehaltenes Wasser.

Als kritische Grenze wird ein Feuchtegehalt von 20 % erwogen (Simon 1974; Berjak et al. 1984). Dabei wird sogar vermutet, daß geordnete Wasserstrukturen um Makromoleküle, subzelluläre Oberflächen und Multienzymsysteme vorhanden seien (Drost-Hansen 1971; Drost-Hansen und Clegg 1979; Porter und Tucker 1981) und für den Ablauf von Stoffwechselfvorgängen sowie die Stabilität von Makromolekülen und subzellulären Oberflächen wichtig zu sein scheinen; weiterhin wird angenommen, daß ein Wassergehalt von 20 % für den Erhalt der Lipoproteinassoziation erforderlich sei.

Harrington (1972) erwägt bei Wasserentzug unter eine nicht näher spezifizierte kritische Hydratation, daß ein Teil der monomolekularen Wasserschicht von den Makromolekülen entfernt werde und damit diese ihren Schutz gegen oxidative Prozesse verlieren. Einer der wohl folgenreichsten Oxidationsprozesse ist die Lipidautoxidation.

Hier schließt sich aber sofort die Frage an, warum der Feuchtegehalt orthodoxer Samenarten während deren Reifetrocknungsphase auf Werte von 10 - 15 % absinken kann und diese sogar darüber hinaus Wassergehalte von 5 % und oft weniger während Lagerung tolerieren. Warum trocknen orthodoxe Samen, unorthodoxe hingegen nur geringfügig?

Rogerson und Matthews (1977) zeigten, daß in reifen Erbsensamen eine Abnahme der Atmungsaktivität der Trocknung vorangehe und diese Abnahme der Aktivität von einem Sinken des Gehaltes an ethanollöslichen Zuckern abhängt. D. h., obwohl die Natur des Signals, welches den Eintritt in die Reifetrocknungsphase der Samenentwicklung auslöst, unbekannt ist, sei es denkbar, daß eine allgemeine Reduktion der Stoffwechselaktivität ein Teil des Auslösers sei, und daß die Initiation dieser Verringerung dem Einsetzen der Trocknung vorangehe (Klein und Pollock 1968; Berjak et al. 1984). Klein und Pollock (1968) konnten in diesem Zusammenhang außerdem zeigen, daß die Achsen von *Phaseolus lunatus*-Embryonen während der Reifung erst die Fähigkeit entwickelten zu wachsen, bevor sie einer Trocknung zu widerstehen vermochten.

Das hieße, unorthodoxen Samen könnte eine solche Reduktion der generellen Stoffwechselaktivität fehlen, die zu einer Verringerung der Anzahl an Makromolekülen, subzellulären Oberflächen etc. führen könnte und dieser Faktor bewirkte, daß der kritische Wassergehalt erheblich in Richtung auf höhere Werte hin verschoben ist.

Bekannt ist auch, daß Getreidesamen während der Embryogenese erst bei Trocknungsbeginn keimfähig werden, wohl aber eine Keimung in früheren Stadien durch eine erzwungene Entwässerung hervorgerufen werden kann (Bewley und Black 1982). Das bedeutet, daß bei Getreidesamen offensichtlich ohne Stoffwechseleinschränkung bereits eine Dehydratationstoleranz zu bestehen scheint.

Sehr interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Betrachtung des Feuchtegehaltes der einzelnen Samenorgane bei Reifetrocknung bzw. Entwässerung. In *Phaseolus lunatus*-Samen sei die Hydratation der Achsen und Keimblätter bei Reifetrocknung einander sehr ähnlich, die Reifung sei in den Achsen lediglich leicht verzögert (Klein und Pollock 1968). Eine häufig für das Frieren biologischen Materials erwogene direkte Folge des Wasserentzuges ist die Konzentrierung der

Zellinhaltsstoffe; dabei ist diejenige der Elektrolyte von besonderem Interesse (Gorke 1906; Harvey 1918; Lovelock 1953a,b; Tappell 1966; Mazur 1970, 1972, 1984; Mazur 1976; Bewley 1979; Steponkus 1984). Tappell (1966) diskutiert die mögliche Auswirkung der Salzkonzentrierung auf Enzyme. Bestimmte Ionen seien für die Aktivität einiger Enzyme unbedingt erforderlich, während die Aktivität anderer durch eine Vielzahl Kationen und Anionen beeinflusst werden könne. Unspezifische Salzeffekte könnten in Abhängigkeit vom Enzym, der Natur und Konzentration des Salzes sowie zusätzlicher Faktoren wie pH, Temperatur und Vorhandensein anderer Substanzen von Aktivierung über Stabilisierung bis hin zu Inhibierung variieren. So sei die  $\alpha$ -Amylaseaktivität der Quadratwurzel der Ionenstärke direkt proportional. Die Alkoholdehydrogenase werde durch geringe Konzentrationen an Natrium-, Kalium- oder Lithiumchlorid aktiviert, aber als lineare Funktion der Quadratwurzel der Ionenstärke durch hohe Konzentrationen gehemmt.

Palta et al. (1978) vermuten, die durch Trocknung hervorgerufene Konzentrierung der Ionen innerhalb der Zellen könne direkt Membranen schädigen, indem z. B.  $K^+$  das  $Ca^{2+}$  aus den Membranen ersetzen und damit deren Struktur schwächen könne.

Es gibt nur wenig Information über die Wirkung der frostinduzierten Elektrolytkonzentrierung auf die Stabilität des Plasmalemmas, aber zahlreiche Befunde zu Chloroplastenthylakoiden (Review s. Steponkus 1984). Garber und Steponkus (1976) zeigten, daß die Schädigung das Ergebnis der Freisetzung bestimmter Enzyme, des Kopplungsfaktors 1 und Plastocyanins aus den Thylakoidmembranen sei. Volger et al. (1978) konnten darüber hinaus die Freigabe der Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Reduktase demonstrieren. Sie vermuten, daß die Proteinfreisetzung die Folge einer unspezifischen Unterdrückung intramembranöser Ionenwechselwirkungen durch hohe Ionenkonzentrationen sei, die durch frostinduzierte Entwässerung hervorgerufen werde.

Eine steigende Anzahl von Anhaltspunkten deutet auf Proteinkonformationsänderungen als Ursache einer Membranstabilisierung in hypertonischen Lösungen hin (Nunes 1981; Mollenhauer et al. 1983). Heber et al. (1981) diskutieren, daß bei Dehydratation von Anionen deren Hydratationsradius abnehme und die von den Ionen ausgeübte Feldstärke ansteige. Eine Abnahme der Wasserstruktur durch chaotrope Substanzen würde die Wechselwirkung partiell polarer Membranbestandteile mit der wäßrigen Phase erhöhen und die Dissoziation des Doppelblättchens erleichtern. Weiterhin könne die Dissoziation von Proteinen, die Träger überschüssiger negativer Ladungen auf der äußeren Oberfläche darstellen, zu einer veränderten Ladungsverteilung auf den Membranen führen, welche dann zur Öffnung hydrophiler Kanäle und somit zum Membranzusammenbruch führe (Jensen et al. 1981).

Diese immer stärkere Konzentrierung auf Phänomene, die sich auf Membranebene abspielen könnten, ist nicht verwunderlich, wenn man sich vor Augen hält, daß Membranen u. a. immer wieder als mögliche Kontrollmechanismen der Keimung angesehen werden. So deuten viele experimentelle Befunde auf eine Wechselwirkung von Phytochrom mit Membranen hin (Quail 1976; Marme 1977; Brownlee et al. 1979). Man vermutet, das aktive Phytochrom gehe eine Art Assoziation mit einer oder mehreren Zellmembranen ein, die erleichtert sei, wenn die Membran eine temperaturinduzierte Umwandlung erlitten habe. Es resultierten Permeabilitätsänderungen, Veränderungen der Aktivität membrangebundener Enzyme und eine geänderte molekulare Umgebung der Zell-

organellen. Alles modifiziere den metabolischen Zustand der Samen beträchtlich und beende eventuell die Keimruhe (Hendricks und Taylorson 1978, 1979; van der Woude und Toole 1980). Die Membranpermeabilitätskontrolle von Phytochrom 730 führe zu mannigfaltigen Stoffwechselveränderungen im Entwicklungsablauf zahlreicher Pflanzengewebe.

Anhaltspunkte für die Einwirkung von Gibberellinsäure auf die Membranverhältnisse entstehen aus Beobachtungen, daß GA<sub>3</sub> die Permeabilität von Liposomen gegenüber Ionen und Glucose steigere (Wood und Paleg 1974) und auch die Temperatur, bei der eine Zustandsänderung der Liposomen eintritt, als Funktion ihrer Konzentration beeinflusse (Wood und Paleg 1972). Dabei sprächen Indizien, die mittels NMR-Techniken gewonnen wurden, für eine Wechselwirkung von GA<sub>3</sub> mit Phosphatidylcholin (Wood et al. 1974).

Nun sind jedoch Membranen außerordentlich komplex, und wir wissen nur wenig über die Natur und die Zusammensetzung dieser Strukturen. Außerdem ist die Membranzusammensetzung aus Elementen wie Phospholipiden, Proteinen, Sterinen, Glykoproteinen etc. nahezu unendlich variabel, und man muß annehmen, daß alle diese Bestandteile auch einen Einfluß auf die Membranfluidität ausüben (Steward und Bewley 1981). Darüber hinaus zeigte eine Reihe von Untersuchungen, daß Lipidzustandsänderungen und damit Fluidität und Diffusion durch Wechselwirkungen der Lipide mit Metallionen, Polypeptiden und Proteinen beeinflusst werden können (Chapman et al. 1974). So erhöhen Wechselwirkungen von bivalenten Kationen mit den polaren Gruppen der Lipide ebenso wie die elektrostatische Bindung von Proteinen und basischen Polypeptiden diese Umwandlungstemperatur.

Chapman und Wallach (1968) konnten auch zeigen, daß Membranen, deren Lipidkomponenten einen hohen Anteil ungesättigter Fettsäuren beinhalten, besonders fluide sind. Kompliziert wird die Situation durch die Tatsache, daß Membranen offensichtlich keine einheitliche Zusammensetzung aufweisen. So wird das Konzept, daß viele Membranen fluide Lipidregionen enthalten, jetzt akzeptiert. Manche Zellmembranen können sowohl Bereiche mit fluiden als auch solche mit starren Ketten enthalten (Oldfield und Chapman 1972). Membranlipide in der Nähe eines Proteins könnten eine vom verbleibenden Lipid abweichende Fluidität besitzen (Stier und Sackmann 1973). In einigen Zellmembranen könnten die Lipide und Proteine nicht besonders fluide oder mobil und somit sehr gut organisiert sein (Blaurock und Stöckenius 1971; Singer 1974). Man konnte auch zeigen, daß Proteine entlang des Membransystems diffundieren können (Frye und Edidin 1970).

Weiterhin wurden an roten Blutzellen zwingende Anhaltspunkte dafür gewonnen, daß biologische Membranen gerichtete Strukturen sind, d. h. ihre Bestandteile asymmetrisch zwischen beiden Oberflächen verteilt sind (Singer 1974; Rotman und Lenard 1977). U. a. Mitochondrien, ER und Bakterienmembranen zeigen eine völlige Asymmetrie bezüglich der Orientierung der Proteine in den Membranen (Review s. Rothman und Lenard 1977).

Trotz dieser Komplexität von Membranen gibt es ein relativ leicht zu bestimmendes Indiz für die Funktionstüchtigkeit und Intaktheit von Membranen. Es wird nämlich generell akzeptiert, daß eine gesteigerte Exsudation einquellender Samen Veränderungen cytoplasmatischer Membranen, besonders des Plasmalemmas und Tonoplasten anzeige (Simon und Raja Harun 1972; Simon 1974; Hendricks und Taylorson

1976; Hegarty 1978; Mc Kersie und Stinson 1980; Mc Kersie und Tomes 1980; Chabot und Leopold 1982), wenn man sich auch über deren Ursache nicht ganz einig ist. Einige Autoren vermuten, es handle sich bei der verstärkten Exsudation einquellender lufttrockener Samen um einen rein passiven Vorgang, der schnell vorübergehe, da die Integrität des Plasmalemmas und des Tonoplasten bei Imbibition schnell wiederhergestellt werde (Simon und Raja Harun 1972; Simon 1974; Bramlage et al. 1978). Indizien für diese Annahme seien der von Simon und Raja Harun (1972) sowie Gupta (1976) gefundene simultane Austritt verschiedenartiger Exsudate und der geringe Temperaturkoeffizient der Exsudation (Kraft und Erwin 1967; Perry und Harrison 1970). Simon (1974) führte verschiedene mögliche Ursachen einer gesteigerten passiven Substanzfreisetzung an:

1. eine Zustandsänderung der Phospholipide in eine hexagonale Konfiguration
2. einen Verlust von Phospholipiden, so daß keine Permeabilitätsbarriere um die gesamte Zelle aufrechterhalten werden könne
3. eine Modifikation der Kohlenwasserstoffketten der Phospholipide, woraus eine Verringerung der Stärke der hydrophoben Bindung resultiere.

Derselbe Autor vermutet auch, daß die mit zunehmender Versuchsdauer sinkende Exsudation in Wasser eingebrachter Samen oder Embryonen mit der langen Diffusionsstrecke von den inneren Zellen zur Samenoberfläche in Beziehung stehen könne. Exsudate der oberflächlich gelegenen Zellen diffundierten sofort in ein relativ großes Wasservolumen und würden deshalb schnell verdünnt, wohingegen Bestandteile aus den Zellen des Sameninneren einen längeren Konzentrationsgradienten entlang diffundieren müßten. Selbst wenn eine innen angesiedelte Zelle bei Einquellung zeitweilig durchlässig werde, mag die Konzentration gelöster Stoffe um die Zelle herum so hoch sein, daß sie einen nennenswerten Substanzverlust verhindere.

Chabot und Leopold (1982) konnten in trockenen Sojabohnensamen eine große Menge Lipid und Membranvesikel in direkter Nachbarschaft des Plasmalemmas und der Proteinvakueln darstellen und deuteten diese als Quelle zusätzlicher Membrankomponenten. Sie vermuteten, eine mögliche Erklärung der anfänglichen Durchlässigkeit einquellender Samen könne sein, daß die fortschreitende Expansion der Zellen den Einbau großer Mengen zusätzlicher Membranlipide erfordere, und dieser Inkorporationsprozeß mit einer ausgiebigen Exsudation verbunden sei. Einbuchtungen des Plasmalemmas sind für trockene Samen vieler Pflanzenarten (Swift und Buttrose 1972; Webster und Leopold 1977; Baird et al. 1979; Thomson 1979; Öpik 1980) sowie für trockene Zellen niederer Pflanzen (Hawker und Madelin 1976; Biryuzowa und Rapaport 1978; Peveling und Robenek 1980) berichtet worden. Diese Einbuchtungen könnten dazu dienen, die Notwendigkeit des Einbaus neuen Membranmaterials während des imbibitionellen Schwellens zu verringern.

Paul (1981) hält auch eine Veränderung membrangebundener Proteine für denkbar, welche die Ionenpermeabilität kontrollieren. Auslöser könne eine eingeschränkte Beweglichkeit des Lipidanteils der Membranen sein. Beobachtungen von Lees und Thompson (1979) an Mais sowie Dizengemel und Kader (1980) an Kartoffeln erbringen Indizien für eine Denaturierung der Proteinkomponente von Zellmembra-

nen bei Gewebeerterung, die ihrer Meinung nach für die erhöhte Permeabilität verantwortlich sei.

Es existieren jedoch auch Anhaltspunkte dafür, daß möglicherweise aktive Transportprozesse an der Exsudation beteiligt sind. So zeigten Mc Kersie und Stinson (1980) an rückgetrockneten *Lotus corniculatus* - Samen, die sich nach Einquellung bereits im trocknungssensitiven Zustand befanden, daß der Ausstrom von Protein, Zucker, Phosphat, Aminosäuren und Kaliumionen nicht einheitlich erhöht ist. Auch Abdul Baki und Anderson (1970) beschreiben, daß zwei Jahre alte Gerstesamen während der ersten vier Stunden der Imbibition Glukose freisetzen, diese jedoch in den folgenden acht Stunden wieder resorbieren. Acht Jahre alte Gerstesamen, die ihre Lebensfähigkeit verloren hatten, setzten Glukose hingegen mit konstanter Rate über die gesamte Zeitspanne von zwölf Stunden frei.

Den Nachweis, daß es sich im Falle der Exsudate um Substanzen intrazellulären Ursprungs handelt, erbrachten Simon und Raja Harun (1972) durch mehrmaliges Einquellen und Rücktrocknen von Erbsensamen. Sie konnten zeigen, daß die Exsudation dieser Embryonen schneller erfolgte als diejenige ununterbrochen einquellender Embryonen.

Offensichtlich sind zwei Prozesse für die Exsudation einer spezifischen gelösten Substanz verantwortlich. Die Anfangsexsudation während der ersten Minuten der Einquellung könne die Freigabe von Oberflächenablagerungen oder Substanzen widerspiegeln, die nicht durch eine semipermeable Membran hindurchtreten. Die folgende konstante Exsudationsrate zeige vermutlich die Freisetzung gelöster Stoffe cytoplasmatischer Herkunft an, die das Plasmalemma passieren müssen, bevor sie in die externe Flüssigkeit gelangen (Mc Kersie und Stinson 1980).

Eine Analyse der Exsudate offenbarte bisher 22 Aminosäuren, Glukose, Fruktose, Saccharose, Maltose, organische Säuren, Gibberellinsäure, Phenole, Phosphate, anorganische Ionen und fluoreszierendes Material (Simon 1974, 1978; Gupta 1976). Für Erbsen konnte gezeigt werden, daß der zeitliche Verlauf der Freisetzung von Kaliumionen, Zuckern und Protein in der Gesamtheit jeweils große Ähnlichkeit mit dem Anstieg der Leitfähigkeit besaß (Simon und Raja Harun 1972). Einquellen von Erdnußsamen brachte 17 Aminosäuren, zwei Zucker und vier organische Säuren zutage. Dabei träten im Verlaufe der Exsudationsmessung zu keiner Zeit qualitative Unterschiede auf (Subrahmanyam et al. 1983).

Ungekeimte *Lotus corniculatus*- Samen exsudierten bei Imbibition mehr als 13 % des Kaliums, nahezu 9 % des gesamten löslichen Proteins, 3,6 % Zucker, 3,1 % des Phosphats und 1,4% der Aminosäuren. Vierundzwanzig Stunden angekeimte, trocknungsempfindliche Samen, die auf ihr ursprüngliches Gewicht zurückgetrocknet wurden, setzten mehr als 32 % des Kaliums, bis zu 18 % des Phosphats sowie des Aminosäureanteils, 14 % des löslichen Proteins und 8 % des enthaltenen Zuckers frei (Mc Kersie und Stinson 1980).

Entsprechend der Zielsetzung dieser Experimente (Rühl 1988) erschien es äußerst interessant zu klären, ob irreversible Membranveränderungen am Lebensfähigkeitsverlust von Kakaosamen infolge Dehydratation beteiligt sind. Hierzu könnte die relativ einfach durchführbare Exsudationsmessung auf unterschiedliche Hydratationen getrockneter Kakaosamen erste Indizien erbringen.

Da bekannt ist, daß die Achsen reifer Kakaosamen einen

etwa doppelt so hohen Wassergehalt innehaben wie die Keimblätter, ist für die Klärung der Frage, welches Samenorgan das unorthodoxe Samenverhalten bedingt, auch von Interesse, ob die Hydratation der Samenorgane im kritischen Feuchtebereich von 17 - 19 % ebenso stark differieren, oder hingegen ähnliche Werte einnehmen.

Eine schonende Trocknungsmethode wird vorgestellt und der Einfluß der Entwässerungsrate auf die Trocknungssensitivität von Kakaosamen überprüft.

### 3 Ergebnisse

Da die Trocknungssensitivität von Kakaosamen das größte Problem hinsichtlich einer Langzeitkonservierung darstellt, lag das Hauptgewicht der dieser Artikelreihe zugrundeliegenden Arbeiten auf Untersuchungen zu diesem Aspekt.

Die Versuche wurden stets im Vergleich zu einer orthodoxen Samenart, der Erdnuß (*Arachis hypogaea*) ausgeführt, um eine Interpretation als "vom orthodoxen Samenverhalten abweichend" zu ermöglichen. Die Erdnuß wurde aufgrund ihrer relativen Großsamigkeit, ihres hohen Fetgehaltes von ca. 50 % (Frischmassebasis) sowie ihres dem Kakaosamen ähnelnden Samenaufbaus ausgewählt.

#### 3.1 Trocknungsmethoden

Kakao- und Erdnußsamen wurden vornehmlich mittels wäßriger Lösungen von Polyethylenglykol (PEG 4000) getrocknet. Das Molekulargewicht von ca. 4000 Dalton stellte einerseits sicher, daß keine Permeation des Osmotikums in die Zellen stattfindet, andererseits war es noch niedrig genug gewählt, um einen zur Dehydratation ausreichenden osmotischen Druck erzeugen zu können.

Diese Art der Trocknung wurde angewandt, um eine Kühlwirkung, die beim Prozess der Wasserverdunstung infolge herkömmlicher Trocknung an der Luft (diese Methode wurde in einigen Fällen zu Vergleichszwecken gewählt) auftritt, auszuschließen, da ansonsten die Differenzierung zwischen Trocknungs- und Kühschädigung Probleme aufwerfen könnte.

Vergleicht man die beiden Trocknungsmethoden hinsichtlich der Trocknungsgeschwindigkeit von Kakaosamen, so treten bis herab zu Samenhydratationen von 14 % - also Wassergehalten deutlich unterhalb des kritischen Grenzwertes - keine nennenswerten Unterschiede auf, wählt man die PEG-Konzentration hoch genug.

In der vorliegenden Arbeit wird auf die Angabe der Osmolarität der verwendeten PEG-Lösungen verzichtet, da PEG ein für osmotisch aktive Substanzen unübliches Verhalten zeigt. Zunächst einmal liegt keine lineare Abhängigkeit der Viskosität von der Konzentration vor, andererseits ist der osmotische Druck der Lösungen deutlich temperaturabhängig (Michel und Kaufmann 1973). Aus diesem Grunde werden die PEG-Lösungen stets mittels ihrer Konzentration und der ausgewählten Temperatur charakterisiert.

#### 3.2 Lebensfähigkeit getrockneter Kakaosamen in Abhängigkeit von der Trocknungsgeschwindigkeit

Um eine möglichst schonende Trocknung der Samen zu erreichen, wurde eine isotonische Lösung von PEG 4000 vorgelegt und deren Konzentration kontinuierlich mittels einer kon-

| Trocknungs-<br>dauer<br>(h) | proz. Konzentrationserhöhung der PEG-Lösung (%/Tag) | Wassergehalt nach Trocknung (% H <sub>2</sub> O/FG) | proz. Wasserverlust (errechnet) (% des Anfangs-WG/Tag) | Keimfähigkeit nach Trocknung (%) |
|-----------------------------|---|---|--|----------------------------------|
| A)                          |   |   |  |                                  |
| 110                         | 10,3  | 23,5  | 16,5   | 0                                |
| 180                         | 5,1   | 25,9  | 9,0  | 0                                |
| 420                         | 2,1   | 28,2  | 3,7  | 0                                |
| B)                          |   |   |  |                                  |
| 90                          | 10,5  | 14,7  | 16,0   | 0                                |
| 160                         | 5,5   | 14,2  | 9,5  | 0                                |
| 320                         | 2,8   | 16,2  | 5,0  | 0                                |

Tabelle 1: **Keimfähigkeit mit unterschiedlicher Trocknungsrate entwässerter Kakaosamen**

Verglichen wurden drei Trocknungsgeschwindigkeiten. Die Steigerung der PEG- Konzentration erfolgte kontinuierlich mittels einer Schlauchpumpe.

A) Vorreife Samen (Wassergehalt:  $79,6 \pm 14,2\%$ ; Keimfähigkeit: 55%; Frischgewicht:  $0,53 \pm 0,26$  g/Same)

B) Reife Samen (Wassergehalt:  $39,0 \pm 2,3\%$ ; Keimfähigkeit: 100%; Frischgewicht:  $2,0 \pm 0,3$  g/Same)

zentrierten PEG- Lösung ( ca. 70 %) unter Verwendung einer Schlauchpumpe gesteigert. Die Konstanz der Versuchstemperatur von 22° C gewährleistete ein Schüttelwasserbad.

Verglichen wurden drei Zulaufgeschwindigkeiten sowie zwei Altersstadien. Pro Behandlung wurden 20 Samen eingesetzt und davon jeweils 10 Samen für die Wassergehaltsbestimmung bzw. den Keimtest nach beendeter Trocknung verwendet.

Da kein ausreichendes Material für eine parallele Bestimmung des Wassergehaltes sowie der Keimfähigkeit vorlag, wurde in diesen Experimenten die Trocknungsrate als prozentuale Konzentrationserhöhung der vorgelegten PEG 4000-Lösung pro Tag angegeben.

Als Kontrollen dienten zwei Samenmengen, die während des gesamten Versuchsverlaufes unter sonst gleichen Bedingungen in 32 %iger bzw. 40 %iger PEG- Lösung verweilten.

Das Ergebnis ist in Tabelle 1 dargestellt. Unabhängig von der Trocknungsgeschwindigkeit führte die Entwässerung der Samen auf Werte unterhalb der kritischen Hydratation sowohl bei reifen als auch bei vorreifen Kakaosamen einer Samenfeuchte von etwa 80 % zum Verlust der Keimfähigkeit. Während die reifen Kontrollsamens nach 340 Stunden in den jeweiligen PEG- Lösungen noch ihre Anfangskeimfähigkeit von 100 % aufwiesen, hatten die vorreifen Kakaosamen in den Kon-

trollösungen zu Versuchsende ihre Keimfähigkeit vollends eingebüßt.

Als Ergebnis bleibt festzuhalten, daß Kakaosamen der untersuchten Reifezustände unabhängig von der Trocknungsgeschwindigkeit offensichtlich bei Unterschreitung ihres kritischen Wassergehaltes die Lebensfähigkeit verlieren.

### 3.3 Hydratation der Samenorgane trocknender Kakao- und Erdnußsamen

Da sich die bisherigen Untersuchungen zur Ermittlung der Lage des kritischen Wassergehaltes von Kakaosamen stets auf die Betrachtung ganzer Samen beschränkten, erschien es nicht zuletzt unter dem Aspekt der Eingrenzung der primären Ursache des Keimfähigkeitsverlustes auf ein Samenorgan interessant, das Trocknungsverhalten der Keimachse demjenigen der Keimblätter gegenüberzustellen.

Dieses gilt in besonderem Maße für die Trocknung mittels osmotischer Lösungen ( s. Kap. 3.1 ), da die Samenorgane unterschiedliche osmotische Werte besitzen können. Außerdem ist bekannt, daß der Wassergehalt der Keimachse nahezu doppelt so hoch ist wie derjenige der Keimblätter ( Jänicke 1973 ).

Die Betrachtung war ausschließlich auf reife Samen gerichtet. Beide Trocknungsmethoden wurden verglichen.

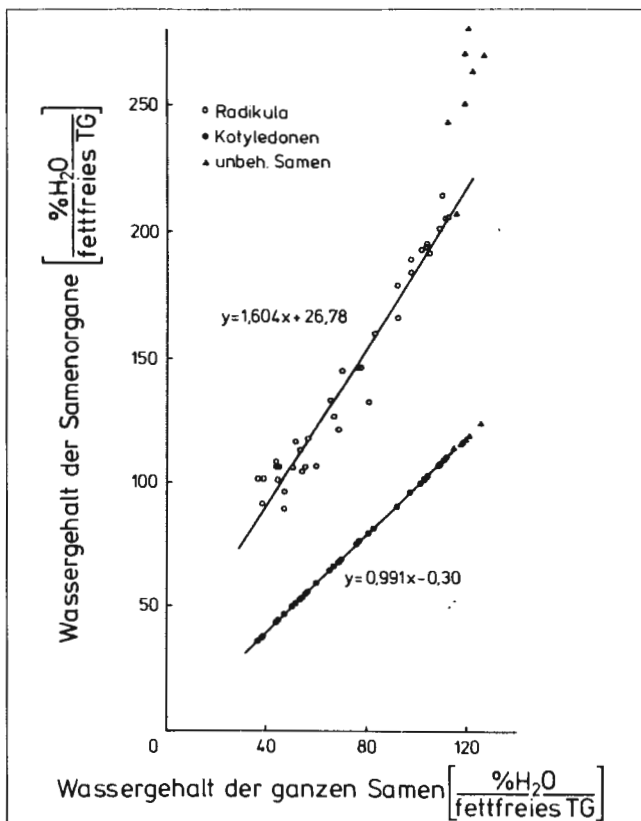


Abbildung 1: **Hydratation der Organe reifer Kakaosamen im Verlaufe der Trocknung mittels wässriger Lösungen von PEG 4000, bezogen auf den Wassergehalt der ganzen Samen**

Eingesetzt wurden reife Kakaosamen eines Wassergehaltes von  $32,2 \pm 1,2$  %, einer Keimfähigkeit von 100 % sowie eines mittleren Frischgewichtes von  $2,3 \pm 0,3$  g/Same. Die Trocknung wurde bei  $22^\circ$  C mittels wässriger Lösungen von PEG 4000 (32 - 70 %) über einen Zeitraum von 72 Stunden vollzogen. Jeder Punkt entspricht stets dem Mittelwert aus 5 Keimachsen bzw. Keimblattpaaren.

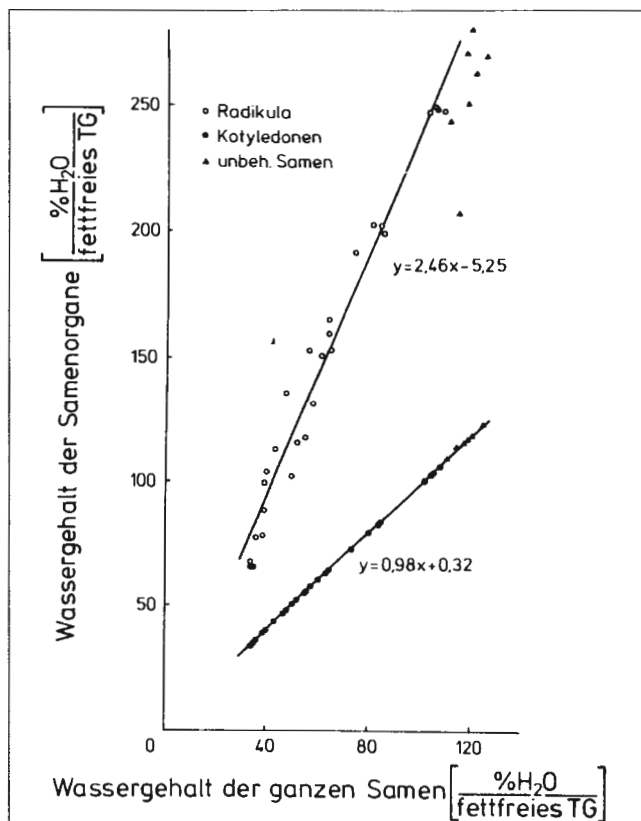


Abbildung 2: **Hydratation der Organe reifer Kakaosamen im Verlaufe der Lufttrocknung, bezogen auf den Wassergehalt der ganzen Samen**

Eingesetzt wurden reife Kakaosamen eines Wassergehaltes von  $32,2 \pm 1,2$  %, einer Keimfähigkeit von 100 % sowie eines mittleren Frischgewichtes von  $2,3 \pm 0,3$  g/Same. Die Trocknung wurde durch Auslegen der Samen im Trockenschrank bei  $22^\circ$  C erzielt. Jeder Punkt entspricht stets dem Mittelwert aus 5 Keimachsen bzw. Keimblattpaaren.

Der Wassergehalt von Erdnußsamen wurde vor Versuchsbeginn durch 20stündiges Einquellen in A. dest auf etwa 48 % angehoben; im weiteren Versuchsverlauf wurden die Samen den gleichen Bedingungen unterworfen wie die Kakaosamen.

Bezugsgröße bildete stets der Wassergehalt der ganzen Samen. Die Werte in den Abbildungen 1 - 4 sind auf der Basis des fettfreien Trockengewichtes angegeben. Dies ist für einen Vergleich der Samenorgane von Kakaosamen von besonderer Wichtigkeit, um den hohen nicht quellbaren Reservestoffanteil der Kotyledonen zu kompensieren.

Zunächst einmal wird sehr deutlich, daß unabhängig von der Trocknungsmethode die Keimachse von Kakaosamen ein von Erdnußkeimachsen stark abweichendes Verhalten zeigt (s. Abb. 1 - 4). Während die Organe von Erdnußsamen bereits nach relativ geringfügiger Entwässerung sehr ähnliche Hydratationen erreichen, wird zwischen den Organen von Kakaosamen im gesamten vergleichbaren Feuchtebereich ein bedeutender Unterschied der Wassergehalte aufrechterhalten.

Quantifiziert man diese Differenz der Hydratationen von Kakaosamenorganen, so bleibt der Wassergehalt der Radikula im kritischen Feuchtebereich im Falle der Lufttrocknung 2,4mal so hoch wie die Hydratation der Kotyledonen, im Falle der Trocknung mittels wässriger Lösungen von PEG 4000 immer noch 2,1mal so hoch.

Führt man dieselbe Berechnung für die Organe von Erdnußsamen durch, so ergeben sich im gleichen Wassergehaltsbereich Faktoren von 1,3 für Lufttrocknung bzw. 1,2 im Falle der Trocknung mittels wässriger Lösungen von PEG 4000.

Diese Untersuchungen spielen ganz besonders für die Interpretation ultrastruktureller Veränderungen der einzelnen Kakaosamengewebe infolge Trocknung eine große Rolle (Rühl und Dambroth 1988, in press).

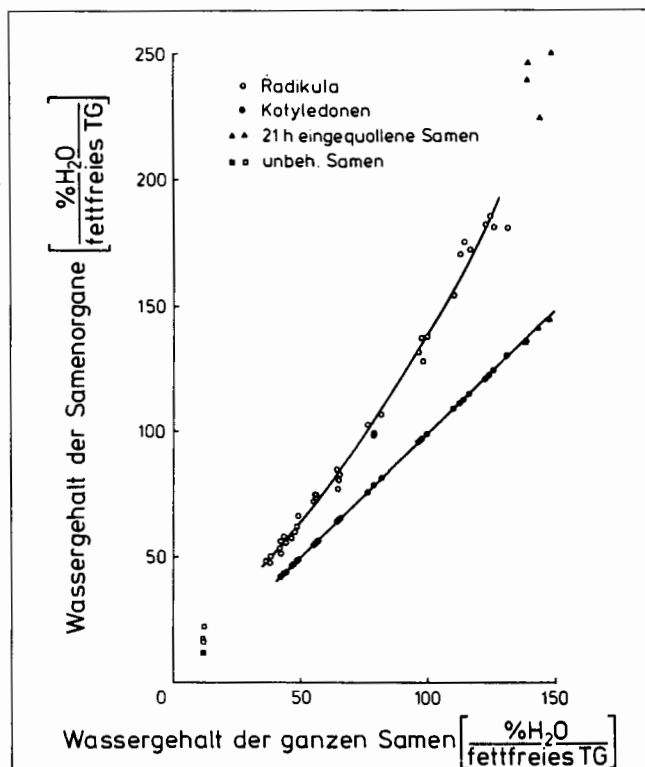


Abbildung 3: Hydratation der Organe reifer Erdnußsamen im Verlaufe der Trocknung mittels wäßriger Lösungen von PEG 4000, bezogen auf den Wassergehalt der ganzen Samen

Eingesetzt wurden reife Erdnußsamen, deren Hydratation nach Lagerung mit einer Feuchte von 5 - 6 % vor Versuchsbeginn durch 21-stündige Einquellung auf  $47,8 \pm 2,7$  % angehoben wurde. Die Keimfähigkeit der Samen betrug 90 %, das mittlere Frischgewicht vor Einquellung  $0,35 \pm 0,05$  g/Same. Die Trocknung wurde bei  $22^\circ\text{C}$  mittels wäßriger Lösungen von PEG 4000 (32 - 70 %) über einen Zeitraum von 72 Stunden vollzogen. Jeder Punkt entspricht stets dem Mittelwert aus 5 Keimachsen bzw. Keimblattpaaren.

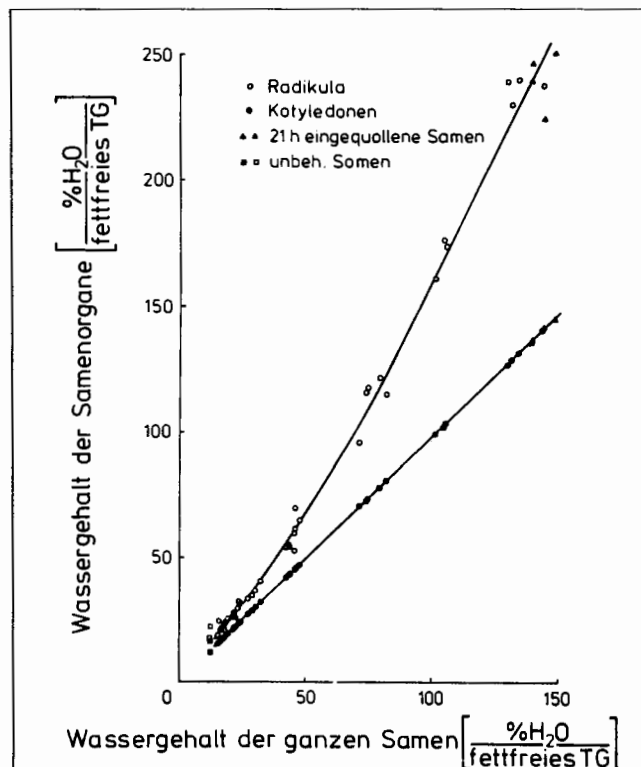


Abbildung 4: Hydratation der Organe reifer Erdnußsamen im Verlaufe der Lufttrocknung, bezogen auf den Wassergehalt der ganzen Samen

Eingesetzt wurden reife Erdnußsamen, deren Hydratation nach Lagerung mit einer Feuchte von 5 - 6 % vor Versuchsbeginn durch 21-stündige Einquellung auf  $47,8 \pm 2,7$  % angehoben wurde. Die Keimfähigkeit der Samen betrug 90 %, das mittlere Frischgewicht vor Einquellung  $0,35 \pm 0,05$  g/Same. Die Trocknung wurde durch Auslegen der Samen im Trockenschrank bei  $22^\circ\text{C}$  erzielt. Jeder Punkt entspricht stets dem Mittelwert aus 5 Keimachsen bzw. Keimblattpaaren.

### 3.4 Exsudation von Kakao- und Erdnußsamen in Abhängigkeit von ihrem Wassergehalt

Es ist allgemein anerkannt, daß eine erhöhte Exsudation einquellender Samen Veränderungen cytoplasmatischer Membranen, besonders des Plasmalemmas, anzeigt (Simon 1974; Hendricks und Taylorson 1976; Hegarty 1978; McKersie und Stinson 1980; Chabot und Leopold 1982).

Weiterhin ist aus diesen Arbeiten bekannt, daß trockene orthodoxe Samen zu Beginn der Imbibition eine erhöhte Anfangsexsudation zeigen, welche offensichtlich eine im trockenen Zustand veränderte, aber reversible, Situation des Plasmalemmas widerspiegelt.

Somit bot es sich an zu untersuchen, ob getrocknete Kakao- und Erdnußsamen im Gegensatz zu Erdnußsamen bei Einquellung eine gesteigerte Exsudationsrate aufweisen, die nicht nach einem Zeitraum von maximal einer Stunde - wie im Falle entwässerter orthodoxer Samen - abklingt, sondern über den Beobachtungszeitraum von 7 Stunden unverändert erhöht bleibt.

Von besonderem Interesse war dabei, ob sich die Exsudation sprunghaft beim Unterschreiten des kritischen Wassergehaltes ändert, da nur in diesem Fall ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Verlust der Keimfähigkeit infolge Wasserentzugs einerseits und einer irreversiblen Schädigung des Plasmalemmas andererseits abgeleitet werden kann.

Die Experimente beschränken sich auf die Ermittlung der Gesamtexsudation, die sich sehr leicht über die Zunahme der Leitfähigkeit des Einquellwassers bestimmen läßt. Eine Analyse der Exsudate erschien nicht notwendig, da bereits Simon und Raja Harun (1972) zeigen konnten, daß zumindest innerhalb der ersten 24 Stunden der Einquellung von Erbsenembryonen ein nahezu identischer Verlauf der Einzelexsudate ( $\text{K}^+$ , Zucker und Protein) mit der Gesamtexsudation vorlag.

Parallel dazu wurde immer die Wasseraufnahme der Samen und Samenteile unter gleichartigen Versuchsbedingungen durch Differenzwägung bestimmt. Während der Exsudationsversuche wurde generell unter Verwendung eines Schüttelwasserbades eine Temperatur von  $30^\circ\text{C}$  aufrechterhalten.



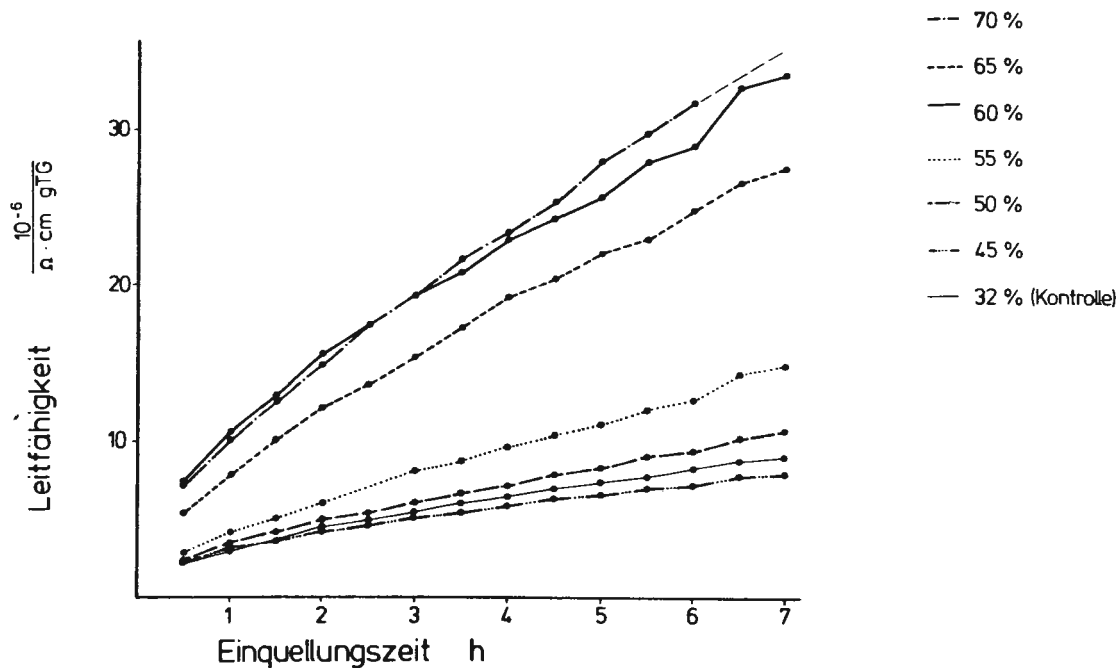


Abbildung 5: Exsudation mittels wässriger Lösungen von PEG 4000 getrockneter Kakaosamen

Eingesetzt wurden reife Kakaosamen eines Wassergehaltes von 32,5 + 1,9 %, einer Keimfähigkeit von 100 % sowie eines mittleren Frischgewichtes von 1,9 + 0,2 g/Same. Die Trocknung wurde mittels wässriger Lösungen von PEG 4000 (32 - 70 %) über einen Zeitraum von 72 Stunden vollzogen. Während der gesamten Versuchsdauer wurde eine Temperatur von 30° C aufrechterhalten.

Angegeben sind die Mittelwerte aus vier Wiederholungen. Die prozentualen Angaben zur Kurvenbezeichnung geben die zur Entwässerung eingesetzten PEG- Konzentrationen wieder. In den folgenden runden Klammern ist die Hydratation der Samen bzw. Samenorgane nach Trocknung vermerkt. Der Wert in eckigen Klammern ist die rechnerisch ermittelte Exsudationsrate ( über den gesamten Versuchszeitraum gemittelt ).

Die Beobachtung konzentrierte sich nicht nur auf ganze Samen, sondern bezog ebenfalls eine Betrachtung der einzelnen Samenorgane mit ein. Dies geschah aus zweierlei Gründen. Erstens bestand die Möglichkeit, daß die Epidermis sowie das Nucellarhäutchen eine Substanzfreisetzung behinderten. Zweitens ist es bei derartigem Vorgehen möglich, zwischen einer Schädigung der Keimblätter bzw. der Keimachse zu unterscheiden, das heißt, man kann erkennen, ob selektiv nur ein Samenorgan geschädigt wird und somit den Keimfähigkeitsverlust von Kakaosamen infolge Trocknung bedingt.

Das Ergebnis zeigen die Abbildungen 5 - 7. In allen Fällen findet die deutlichste Steigerung der Exsudationsrate exakt im kritischen Wassergehaltsbereich von Kakaosamen statt, also beim Übergang von 18,9 auf 17,5 % Feuchte.

Im Falle der Radikula macht sich bei weiterer Entwässerung offenbar bereits eine Limitierung aufgrund der viel geringeren Substanzmenge bemerkbar.

Zur Absicherung dieser an mittels wässriger Lösungen von PEG 4000 getrockneter Samen gewonnenen Ergebnisse wurden außerdem Samen bei unterschiedlichen Temperaturen für die Dauer von 14 bzw. 72 Stunden luftgetrocknet. Dies erschien wichtig, da im ersteren Falle bereits vor Ermittlung der Leitfähigkeit in A. bidest. in wässrigen Lösungen getrock-

net wurde, also die Gefahr einer Exsudation während der Trocknung bestand.

Die Ergebnisse offenbaren jedoch das genaue Gegenteil davon ( Abb. 8 - 10 ). Bei vergleichbaren Wassergehalten der Samen liegt stets der Wert luftgetrockneter Kakaosamen unter demjenigen mittels Lösungen von PEG 4000 getrockneter Samen. Ansonsten zeigt auch dieser Versuchsansatz im Vergleich zu den folgenden Experimenten mit Erdnußsamen, daß die Exsudationsratensteigerung irreversibel ist, und daß nach Unterschreiten der kritischen Hydratation der Betrag dieser Exsudationsrate sprunghaft ansteigt. Die für die Erhöhung der Exsudationsrate verantwortliche Schädigung ist also vor Beginn der Einquellung eingetreten und die Menge der exsudierbaren Substanzen ist nicht limitierend. Im Falle der Erdnuß beschränkte sich die Untersuchung auf die einzelnen Samenorgane, da anhand der Ergebnisse mit Kakaosamen deutlich wurde, daß ein Effekt bei Betrachtung der einzelnen Samenorgane klarer zum Ausdruck kommt als in Experimenten mit ganzen Samen.

Die eingesetzten Mengen stellten einen Kompromiß zwischen der gegenüber Kakaosamenorganen geringeren Masse und der bei Gewichtsgleichheit hingegen sehr viel größeren Oberfläche dar.

Die Erdnußsamen wurden entweder bei 22° C in 100 %iger

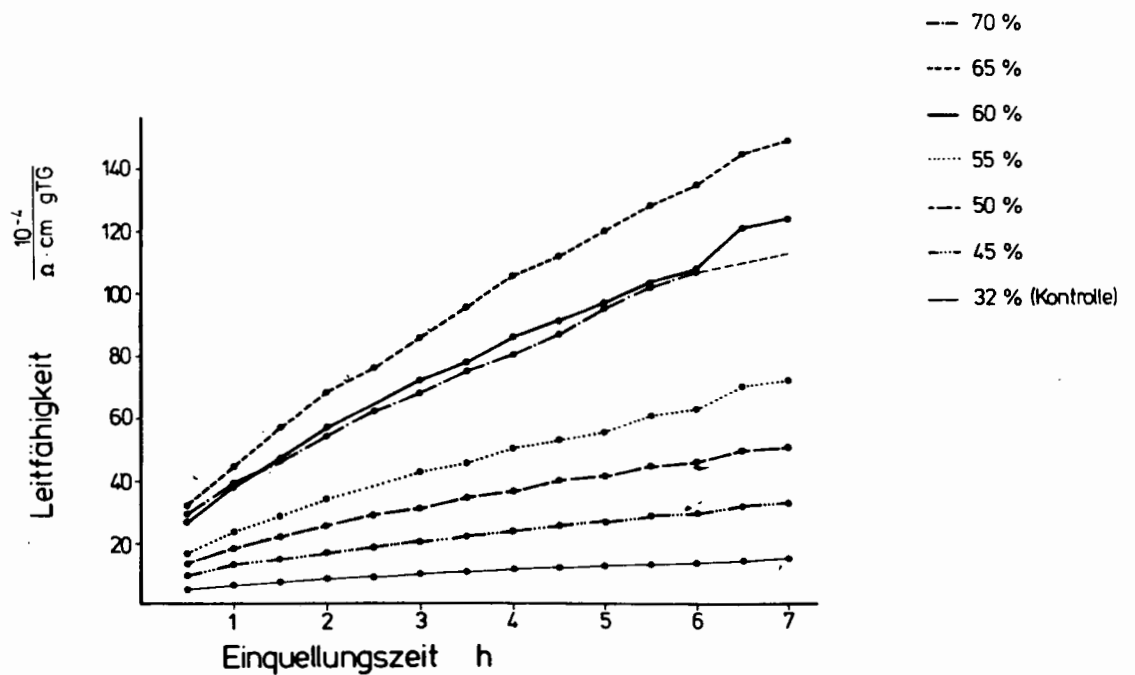


Abbildung 6: Exsudation mittels wässriger Lösungen von PEG 4000 getrockneter Kakaokotyledonen

Legende: Siehe Abbildung 5

Feuchte auf Wassergehalte von 13,3 bzw. 18,1 % eingequollen, oder in A. bidest. bei der gleichen Temperatur auf eine Hydratation von 39,6 % gebracht. Wiederum bewirkte eine

Einquellung stets eine Verringerung der Exsudationsrate, jedoch blieb diese über die Zeit nicht konstant wie im Falle von Kakaosamen ( Abb. 11 und 12 ). D. h., die Exsudation

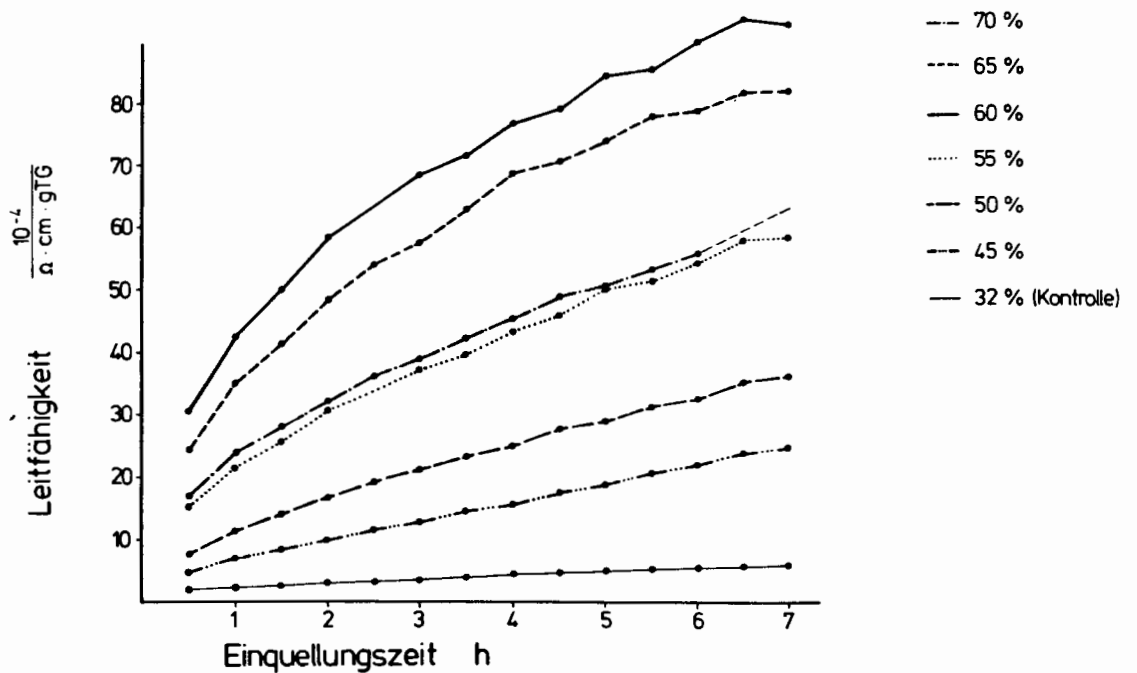


Abbildung 7: Exsudation mittels wässriger Lösungen von PEG 4000 getrockneter Kakaoradikulae

Legende: Siehe Abbildung 5

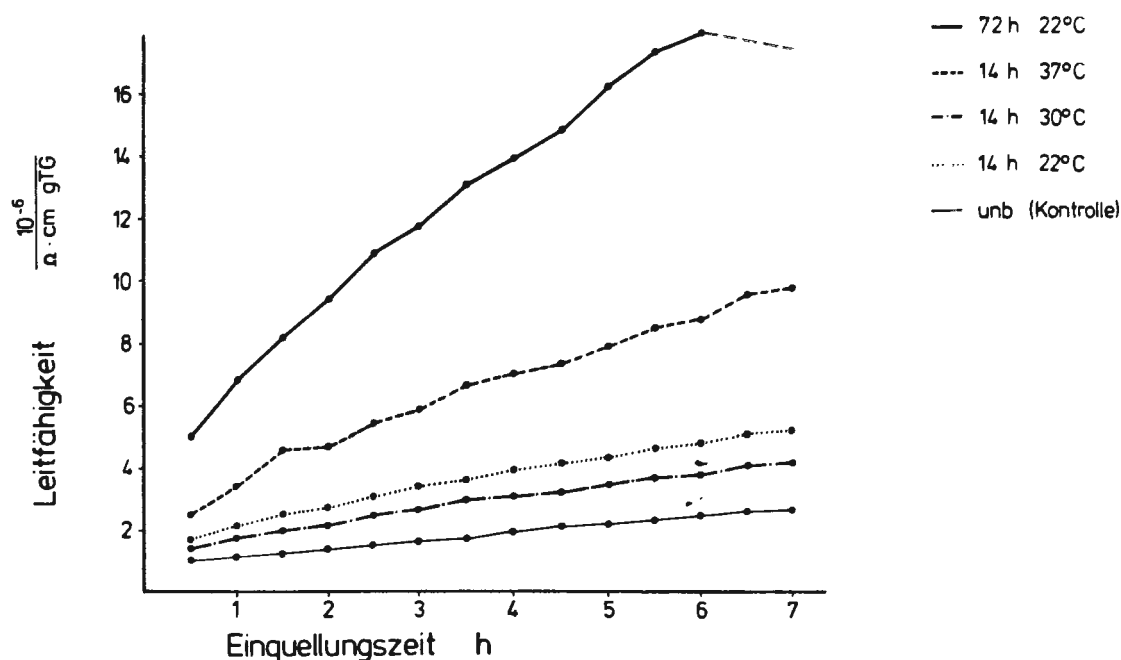


Abbildung 8: Exsudation luftgetrockneter Kakaosamen

Eingesetzt wurden reife Kakaosamen eines Wassergehaltes von  $34,7 \pm 3,1\%$ , einer Keimfähigkeit von 100 % sowie eines mittleren Frischgewichtes von  $1,6 \pm 0,2$  g/Same. Die Trocknung wurde bei Temperaturen von 22, 30 bzw. 37° C über einen Zeitraum von 14 bzw. 72 Stunden im Trockenschrank vollzogen. Während der gesamten Versuchsdauer wurde eine Temperatur von 30° C aufrechterhalten.

Angegeben sind die Mittelwerte aus vier Wiederholungen. Die Angaben zur Kurvenbezeichnung geben die Trocknungsdauer und -temperatur wieder. In den folgenden runden Klammern ist die Hydratation der Samen bzw. Samenorgane nach Trocknung vermerkt. Der Wert in eckigen Klammern ist die rechnerisch ermittelte Exsudationsrate ( über den gesamten Versuchszeitraum gemittelt ).

pegelt sich nach einer gesteigerten Anfangsexsudation auf geringere Werte ein, so daß eine über den gesamten Kurvenverlauf gemittelte Exsudationsrate den tatsächlichen Verhältnissen sicherlich nicht gerecht wird.

Der Vergleich von Kakao- und Erdnußsamen zeigt somit ein deutlich differierendes Exsudationsverhalten vorgetrockneter Samen, welches auf eine durch Entwässerung induzierte irreversible Veränderung von Membranen selektiv nur in Kakaosamen hindeutet.

Diese tabellarische Gegenüberstellung macht deutlich, daß sowohl die Absolutwerte als auch die zeitliche Charakteristik der Wasseraufnahme beider Samenarten so ähnlich sind, daß sich eine Verrechnung erübrigt.

#### 4 Diskussion

Im ersten Abschnitt dieser Versuchsreihe konnte gezeigt werden, daß Kakaosamen während ihrer Embryogenese

**Tabelle 2: Wasseraufnahme von Kakaosamen und -samenorganen während der Exsudationsmessung**

#### 3.5 Wasseraufnahme von Kakao- und Erdnußsamen bei Einquellung

Für einen möglichst exakten Vergleich des Exsudationsverhaltens einquellender Kakao- und Erdnußsamen ist es erforderlich festzustellen, welche Menge des vorgelegten Einquellwassers im Verlaufe der Leitfähigkeitsmessung von den Samen bzw. Samenorganen aufgenommen wird. In einem Parallelversuch wurde deshalb anhand von vier Zeitentnahmen innerhalb der Exsudationszeitspanne die vom eingesetzten Samenmaterial aufgenommene Wassermenge ermittelt (Tab. 2 und 3). Gezeigt sind nur die Daten für ein- bzw. sechsstündige Einquellung.

| Materialart | mittlere Wasseraufnahme ( ml ) |             |
|-------------|--------------------------------|-------------|
|             | nach 1 h                       | nach 6 h    |
| ganze Samen | 0,10 - 0,75                    | 0,50 - 2,10 |
| Keimblätter | 0,70 - 1,35                    | 0,95 - 2,60 |
| Keimachsen  | 0,03 - 0,10                    | 0,03 - 0,15 |

Tabelle 3: **Wasseraufnahme von Erdnußsamen und -samenorganen während der Exsudationsmessung**

| Materialart | mittlere Wasseraufnahme ( ml ) |             |
|-------------|--------------------------------|-------------|
|             | nach 1 h                       | nach 6 h    |
| Keimblätter | 0,75 - 1,25                    | 1,55 - 2,25 |
| Keimachsen  | 0,07 - 0,10                    | 0,08 - 0,13 |

keine Periode vermindert Hydratation, gefolgt von einer erneuten Zunahme des Wassergehaltes bis zum Reifezeitpunkt, durchlaufen ( Rühl 1988 ). Dieser Sachverhalt macht die eingangs erwogene Möglichkeit, Kakaosamen könnten in einem früheren Entwicklungsstadium weniger trocknungssensitiv sein, sehr unwahrscheinlich.

Die Resultate im Zusammenhang mit der Variation der Trocknungsmethode und -rate belegen, daß Kakaosamen nicht wie von Chin et al. ( 1984 ) erwogen aufgrund einer ungeeigneten Entwässerungsmethode oder einer schlecht gewählten Dehydrationsrate zu Unrecht als unorthodox ( "recalcitrant" ) eingestuft wurden, sondern tatsächlich einen extremen Vertreter dieser Samenarten darstellen.

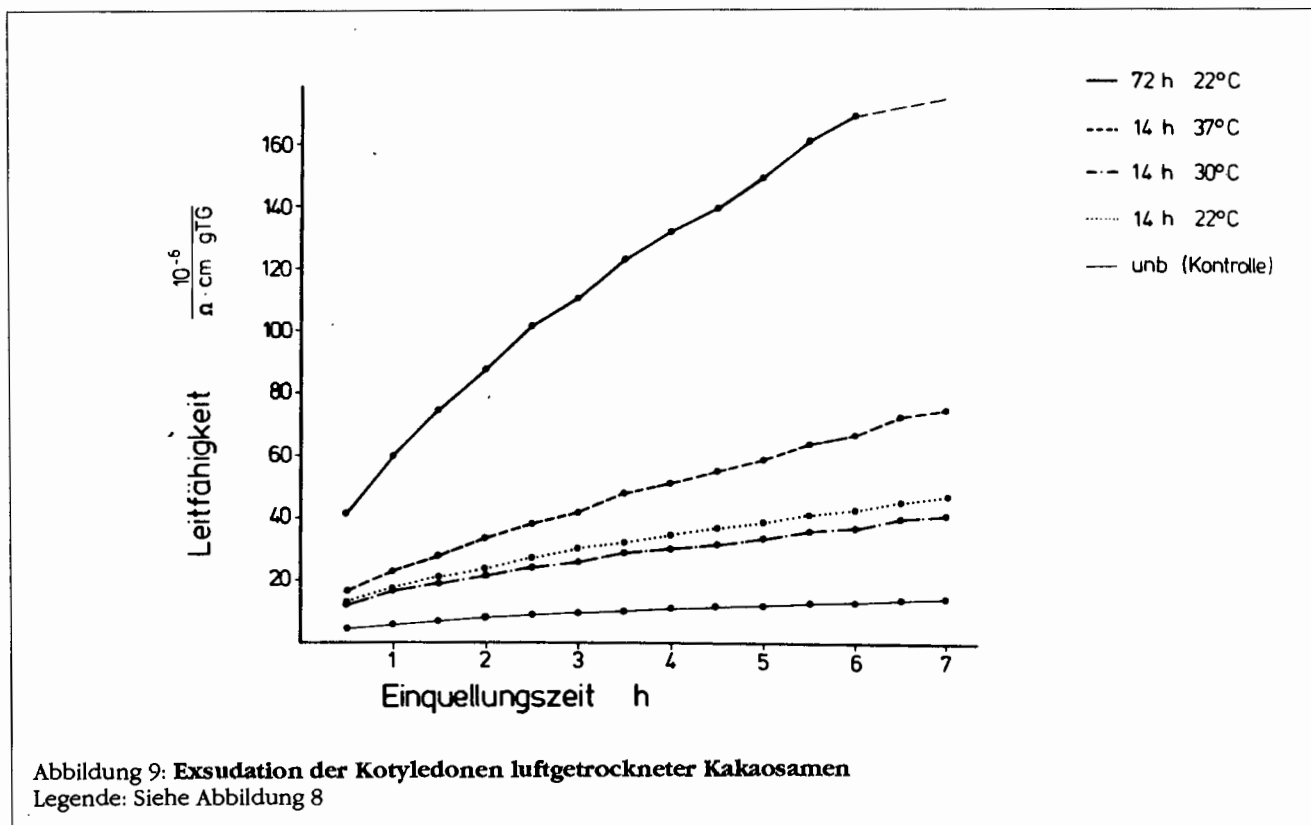
Ein großes Manque der Experimente zur Entwässerung von Kakaosamen ist die notwendigerweise recht lang gewählte Trocknungsdauer. Diese Zeitspanne erschwert besonders die Eingrenzung des Ortes der primären Schädigung auf ein Samenorgan. Hier ergibt sich ein entscheidender Anhaltspunkt aus dem Vergleich der Hydratationen von Keimachse und

Keimblättern im Verlaufe der Dehydratation von Kakao- und Erdnußsamen. Erdnußsamen zeigen dabei das für orthodoxe Samenarten typische Bild ( Klein und Pollock 1968 ). Im Gegensatz zu diesen hält die Keimachse von Kakaosamen über den gesamten interessanten Wassergehaltsbereich gegenüber den Keimblättern eine deutlich höhere Hydratation aufrecht, selbst bei Wahl des fettfreien Trockengewichts als Bezugsgröße, also bei Verrechnung des viel höheren nicht quellbaren Fettanteils der Keimblätter. Dieser Tatbestand kann durchaus als Indiz für eine primäre Schädigung der Kotyledonen bei Entwässerung gewertet werden, da die Keimblätter im Verlaufe der Trocknung viel eher niedrigen Wassergehalten ausgesetzt sind als die Keimachse.

Andererseits zeigte sich, daß die mit Kakaosamen isotonische PEG 4000- Konzentration mit zunehmendem Samenalter ansteigt ( Rühl 1986 ). Diese Anhaltspunkte sprechen im Falle der Keimachsen möglicherweise für die Beibehaltung einer hohen Stoffwechselrate sowohl bei Reife als auch erzwungener Entwässerung von Kakaosamen, so daß in der Keimachse von Kakaosamen eine durch Dehydratation bedingte Desorganisation des Stoffwechsels als mögliche Ursache des Trocknungsschadens durchaus in Frage kommt ( s. Hypothese von Berjak et al.1984).

Wenn auch die Membranverhältnisse außergewöhnlich komplex sind, gibt es doch ein relativ leicht zu bestimmendes Indiz für Membranveränderungen, die Messung der Exsudationsrate. Eine gesteigerte Freisetzung cytoplasmatischer Bestandteile wurde beobachtet, wenn man Samen erhöhter Temperatur, Kälte, Frost, Trocknung, Luftverunreinigungen und osmotischem Schock aussetzte (Schroth et al. 1966; Simon 1974; Hendricks und Taylorson 1976; Senaratna und Mc Kersie 1983 a,b ).

Betrachtet man im Lichte der bisherigen Erkenntnisse die



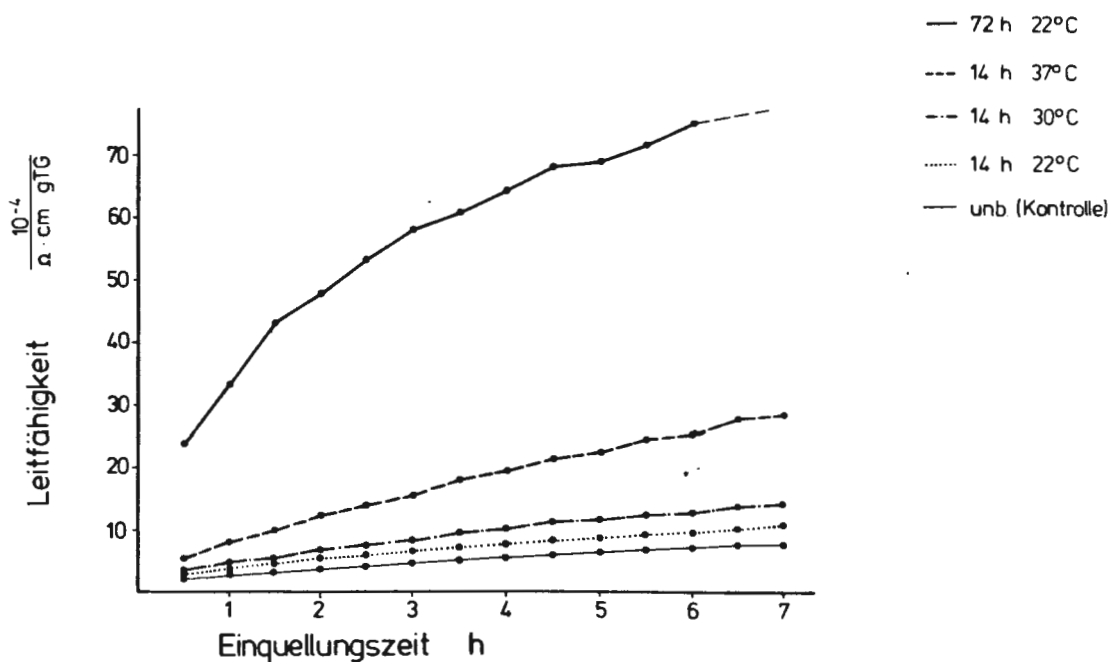


Abbildung 10: Exsudation der Radikulae luftgetrockneter Kakaosamen  
 Legende: Siehe Abbildung 8

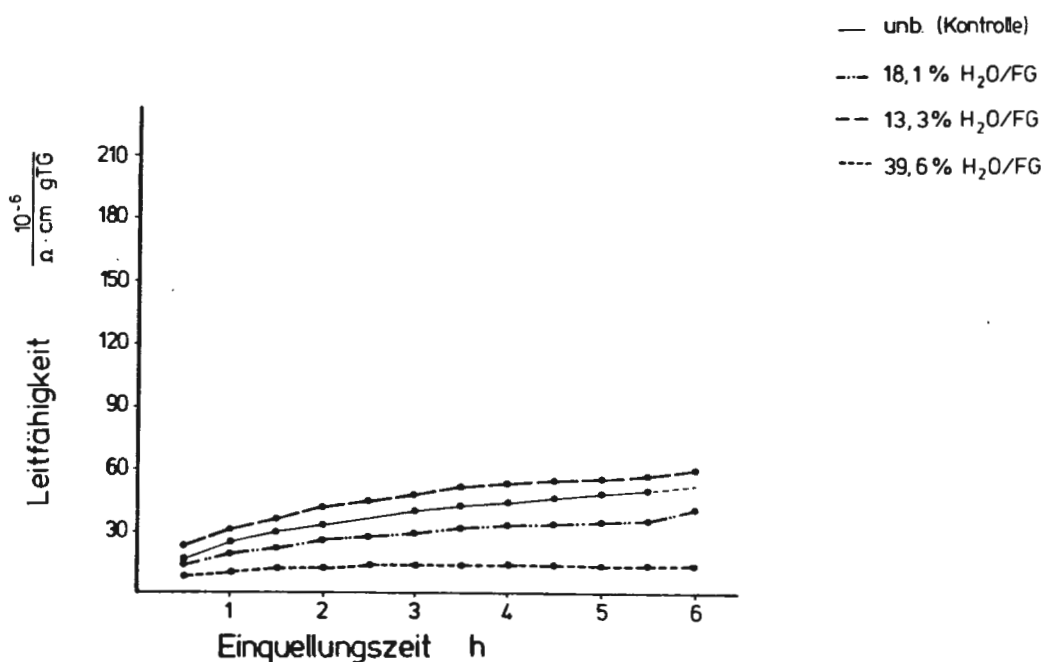
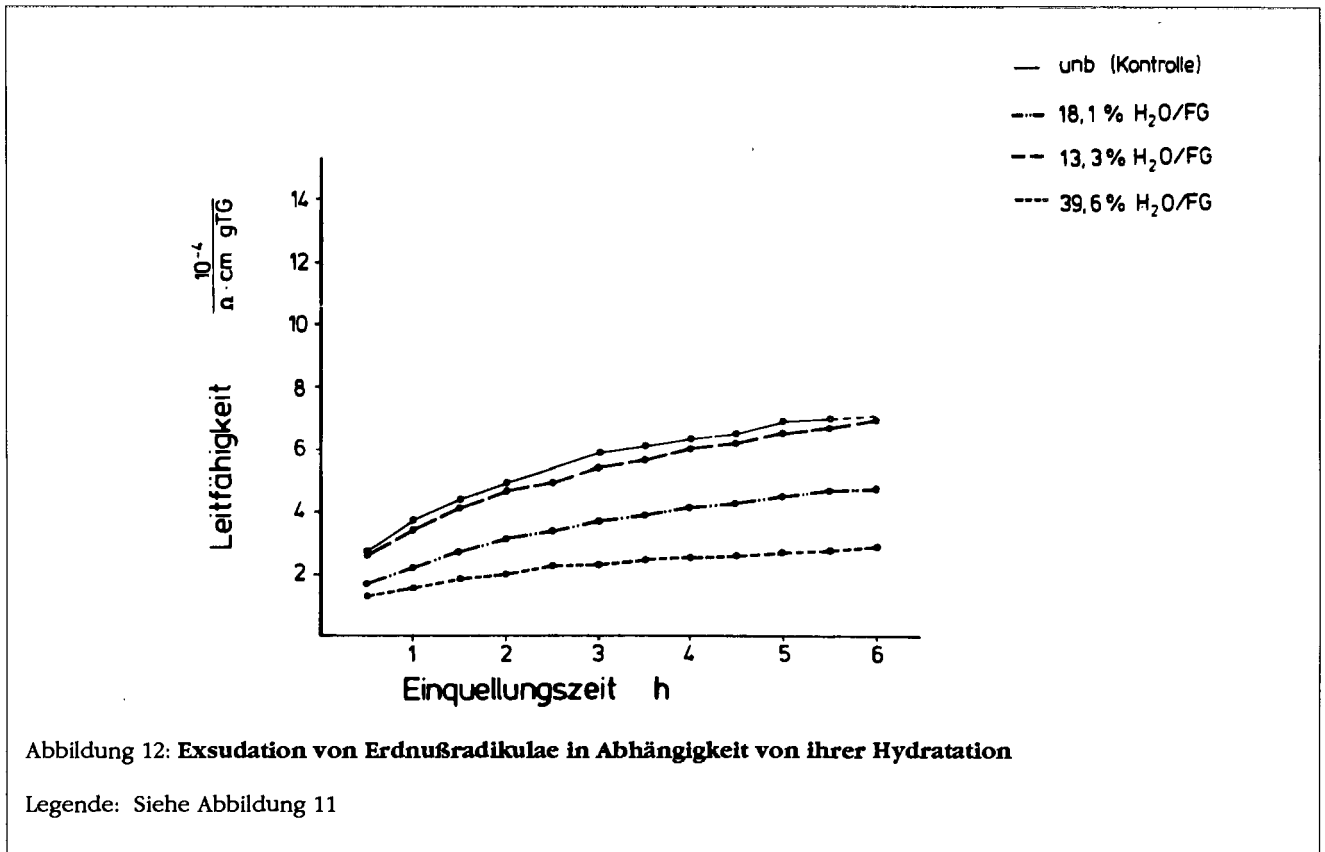


Abbildung 11: Exsudation von Erdnußkotyledonen in Abhängigkeit von ihrer Hydratation

Eingesetzt wurden reife Erdnußsamen eines Wassergehaltes von 5 - 6 %, einer Keimfähigkeit von 90 % und einem mittlerem Frischgewicht von  $0,35 \pm 0,05$  g/Same. Einquellung dieser als Kontrolle bezeichneten Samen wurde entweder in 100 % r. F. (13,3 % und 18,1 %) oder durch 21- stündige Imbibition der Samen in dest. Wasser (39,6 %) vollzogen. Angegeben sind die Mittelwerte aus vier Wiederholungen. Die Angaben zur Kurvenbezeichnung geben die Hydratation der Samenorgane zu Versuchsbeginn wieder. Der Wert in eckigen Klammern ist die rechnerisch ermittelte Exsudationsrate ( über den gesamten Versuchszeitraum gemittelt ).



Ergebnisse der Exsudation von Erdnuß- und Kakaosamen unterschiedlicher Hydratation, so läßt sich folgendes aussagen:

Erdnußsamenorgane zeigen bei allen untersuchten Feuchtegehalten das für orthodoxe Samenarten typische Bild einer erhöhten Anfangsexsudation mit nachfolgendem Einpegeln auf eine relativ geringe, nahezu einheitliche Exsudationsrate (Simon 1974). Auf unterschiedliche Wassergehalte getrocknete Kakaosamen und -samenorgane lassen ebenfalls eine gesteigerte Anfangsexsudation erkennen, aber auch eine mit abnehmender Hydratation konstante verstärkte Freisetzung cytoplasmatischer Bestandteile.

Die infolge Trocknung konstant über den Untersuchungszeitraum von sieben Stunden erhöhte Exsudationsrate deutet auf eine Membranschädigung hin, die über diese Zeitspanne nicht wieder hergestellt wird, also offensichtlich irreversibel ist.

Die kontinuierliche Steigerung der Exsudationsrate mit sinkender Samenhydratation könnte dadurch zustandekommen, daß sowohl infolge PEG 4000- als auch Lufttrocknung die oberflächlich gelegenen Zellen stärker in Mitleidenschaft gezogen werden als die zentraler positionierten. Da aber mit großer Wahrscheinlichkeit nur diese äußersten Zellschichten einen Beitrag zur Exsudation leisten, könnte eine zu erwartende sprunghafte Änderung der Substanzfreisetzung im kritischen Feuchtebereich von 17 - 19 % verdeckt oder verschleiert werden.

Andeutungsweise ist im kritischen Wassergehaltsbereich von Kakaosamen die größte Exsudationsratensteigerung zu verzeichnen. Die mit der nachfolgenden Feuchtegehaltssenkung zu beobachtende Abnahme der Exsudationsrate spricht für das Erreichen einer maximal möglichen Exsudationsrate

infolge Entwässerung und bestätigt damit die Grenzwertsituation von Kakaosamen.

Die mittels Lufttrocknung von Kakaosamen erzielten Resultate widersprechen den Ergebnissen, die durch Dehydratation mittels osmotischer Lösungen erreicht wurden, in keiner Weise, sondern bestätigen die Quantität der Exsudate. D. h., eine Trocknung mittels eines wäßrigen Systems wirkt sich nicht auf die Höhe der Exsudationsrate bei anschließender Rehydratation aus.

Der gezwungenermaßen mit 72 Stunden recht lang gewählte Trocknungszeitraum läßt zwar die Aussage zu, daß nach dieser Zeitspanne eine Membranschädigung infolge Entwässerung vorliegt, läßt aber eine Abschätzung, ob eine primäre oder sekundäre Schädigung der cytoplasmatischen Grenzstrukturen vorliegt, nicht zu.

Um eine Eingrenzung der geschädigten Membransysteme infolge Entwässerung vornehmen zu können, soll die subzelluläre Struktur während der Dehydratation verfolgt werden. Weiterhin kann diese Beobachtung der Ultrastruktur trocknender Kakaosamen Hinweise liefern, welches Samenorgan primär den Lebensfähigkeitsverlust bei Unterschreitung der kritischen Samenfeuchte bedingt (Rühl et al. 1988, in press).

#### Zusammenfassung

Eine für Kakaosamen geeignete Lagermethode fehlt weiterhin. Aufschlüsse über die Möglichkeit einer Langzeitlagerung als "recalcitrant" eingestufte Samen tropischer Pflanzenarten lassen sich von der Untersuchung der Ursachen der zugrundeliegenden Lagerparameter Trocknung und Kühlung erhoffen. Die primären Ursachen des Lebensfähigkeitsverlustes infolge Entwässerung und Temperatursenkung sind bisher nicht be-

kannt. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse dienen der Klärung der Ursachen dieser Trocknungssensitivität tropischer Samenarten am Beispiel von Kakaosamen.

Es konnte gezeigt werden, daß Kakaosamen unabhängig von der Trocknungsmethode und -rate bei Unterschreiten der kritischen Hydratation ihre Lebensfähigkeit verlieren. Die Keimachse von Kakaosamen hält im Verlaufe der Dehydratation über den kritischen Feuchtebereich für Kakaosamen hinweg stets einen nahezu doppelt so hohen Wassergehalt aufrecht wie die Keimblätter. Dieser Sachverhalt steht im deutlichen Gegensatz zu den Befunden für orthodoxe Erdnußsamen. Die Exsudationsrate einquellender Kakaosamen und Samenorgane zeigt eine irreversible Steigerung mit sinkender Samenfeuchte. D. h., Trocknung von Kakaosamen führt zu einer bleibenden Membranschädigung, deren Ausmaß offensichtlich bei Unterschreitung der kritischen Feuchte besonders hoch ist. Hier müssen ultrastrukturelle Befunde eine Verdeutlichung bringen.

#### **Investigations in the causes of sensitivity to cold and water stress of tropical seeds, represented by cacao seeds. II. Dehydration parameters and leakage of desiccating cacao seeds and seed organs.**

An appropriate method for the preservation of cacao seeds is still lacking. Information about the long term storage of seeds from tropical crops classified as "recalcitrant" may be obtained from investigations in water stress and cooling, which form the basis of preservation. At present, the causes of viability loss due to desiccation and low temperatures are not known. The results shown in this study, shall serve for the elucidation of the causes of sensitivity to water stress of tropical seeds.

It could be demonstrated, that cacao seeds loose their viability during reduction of their hydration beneath the critical level, irrespective of dehydration method and desiccation rate. The radicle of cacao seeds maintains nearly twofold the water content of the cotyledons during dehydration beneath the critical hydration. This contradicts the results obtained with peanut seeds significantly. The leakage rate of cacao seeds and seed organs shows an irreversible increase with decreased seed moisture. That means, desiccation of cacao seeds leads to a permanent membrane damage. The extend of deterioration is particularly large while passing through the critical hydration. Ultrastructural observations have to clarify these findings.

#### **Literatur**

Abdul-Baki, A.A. und Anderson, J.D.: Viability and leaching of sugars from germinating barley. - *Crop Sci.* 10, (1970), S. 31.

Askenov, S.I., Askochenskaya, N.A., Petinov, N.S.: The fractions of water in wheat seeds. - *Fiz. Rast.* 16, (1969), S. 58 - 62.

Askenov, S.I., Askochenskaya, N.A., Golovina, E.A.: State of water in seeds of different qualitative composition and change of it under temperature influence. - *Sov. Plant Physiol.* 24, (1977), S. 1007 - 1015.

Baird, L.A.M., Leopold, A.C., Bramlage, W.J., Webster, B.D.: Ultrastructure modifications associated with imbibition of the soybean radicle. - *Bot. Gaz.* 140, (1979), S. 371 - 377.

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

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. 2: Viability and environmental control. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1982).

Biryuzova, V.L. und Rapaport, A.L.: Cryofractographic investigation of the structure of yeast cells in an anabiotic state. - *Mikrobiologiya* 47, (1978), S. 300 - 305.

Blaurock, A.E. und Stoeckenius, W.: Structure of the purple membrane. - *Nature, New Biol.* 233, (1971), S. 152 - 155.

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

Brownlee, C., Roth-Bejerano, N., Kendrick, R.E.: *Sci. Prog. (London)*, (1979), S. 217 - 229.

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.

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

Chapman, D. und Wallach, F.H.: Recent physical studies on phospholipids and natural membranes. - In: *Biological membranes. Physical fact and function.* (ed.: Chapman, D.), Acad. Press, New York, (1968), S. 125 - 202.

Chapman, D., Keough, K.M., Urbina, J.: Biomembrane phase transition. Studies of lipid-water systems using differential scanning calorimeter. - *J. Biol. Chem.* 249, (1974), S. 2512.

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

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

Dizengremel, P. und Kader, J.: Effect of ageing on the composition of mitochondrial membranes from potato (*Solanum tuberosum*) slices. - *Phytochem.* 19, (1980), S.211 - 214..

Drost-Hansen, W.: Structure and properties of water at biological interfaces. - In: *Chemistry of the cell interfaces.* (ed.: Brown, H.D.), Acad. Press, New York, Part B, (1971), S. 1 - 184.

Drost-Hansen, W. und Clegg, J.S.: *Cell-associated water.* Acad. Press, New York, (1979).

Edwards, C.A. und Mumford, P.M.: The effect of drying method on the behaviour of sour orange (*Citrus aurantium*) seeds. - *Seed Sci. Technol.* 13, (1985), S. 227 - 234.

- Frye, C.D. und Edidin, M.: The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human hetero karyons. - *J. Cell Sci.* 7, (1970), S. 319 - 333.
- Garber, M.P. und Steponkus, P.L.: Alterations in chloroplast thylacoids during an in vitro freeze-thaw cycle. - *Plant Physiol.* 57, (1976), S. 673 - 680.
- Gorke, H.: Über chemische Vorgänge beim Einfrieren von Pflanzen. - *Landwirtsch. Vers. Stn.* 65, (1906), S. 149 - 160.
- Gupta, R.K. - *Biochem. Physiol. Pflanz.*, (1970), S. 389.
- Harrington, J.F.: Seed storage and longevity. - In: *Seed Biology III* (ed.: Kozłowski, T.T.), Acad. Press, New York, London, (1972), S. 145 - 240.
- Harvey, R.B.: Hardening process in plants and developments from frost injury. - *J. Agric. Res.* 15, (1918), S. 83 - 112.
- Hawker, L.E. und Madelin, M.F.: The dormant spore. - In: *The fungal spore*. (eds.: Weber, D.J. und Hess, M.W.), Wiley Interscience Press, New York, (1976), S. 1 - 72.
- Heber, U., Schmitt, J.M., Krause, G.H., Klossen, R.J., Santarius, K.A. - In: *Effects of low temperature on biological membranes*. (eds.: Morris, G.J. und Clarke, A.), Acad. Press, London, (1981), S. 263 - 283.
- Hegarty, T.W.: The physiology of seed hydration and dehydration, and the relation between water stress and the control of germination: a review. - *Plant Cell Environment* 1, (1978), S. 101 - 119.
- Hendricks, S.B. und Taylorson, R.B.: Variation in germination and amino acid leakage of seeds with temperature related to membrane phase change. - *Plant Physiol.* 58, (1976), S. 7 - 11.
- Hendricks, S.B. und Taylorson, R.B.: Dependence of phytochrome action in seeds on membrane organization. - *Plant Physiol.* 61, (1978), S. 17 - 19.
- Hendricks, S.B. und Taylorson, R.B.: Dependence of thermal responses of seeds on membrane transitions. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, (1979), S. 778 - 781.
- 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., Soetisna, U., Roberts, E.H.: The dry storage of citrus seeds. - *Ann. Bot.* 48, (1981), S. 865 - 872.
- 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.
- Kraft, J.M. und Erwin, D.C. - *Phytopathology* 57, (1967), S. 866.
- Lees, G.L. und Thompson, J.E.: An evaluation of the role of membrane self digestion in cotyledon senescence. - *Z. Pflanzenphysiol.* 95, (1980), S. 199 - 212.
- Lovelock, J.E.: The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. - *Biochim. Biophys. Acta* 10, (1953a), S. 414 - 426.
- Lovelock, J.E.: The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. - *Biochim. Biophys. Acta* 11, (1953b), S. 28 - 36.
- Marme, D.: Phytochrome: membranes as possible sites of primary action. - *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28, (1977), S. 173 - 198.
- Mazur, P.: Cryobiology: The freezing of biological systems. - *Science* 168, (1970), S. 939 - 949.
- Mazur, P.: A two-factor hypothesis of freezing injury. - *Experimental Cell Research* 71, (1972), S. 345 - 355.
- Mazur, P.: Freezing of living cells: mechanisms and implications. - *Amer. J. Physiol.* 247, (1984), S. 125 - 142.
- Mazur, P., Kemp, J.A., Miller, R.H.: Survival of fetal rat pancreases frozen to - 78 and - 196° C. - *Science* 73, (1976), S. 4105 - 4109.
- Mc Kersie, B.D. und Stinson, R.H.: Effect of dehydration on leakage and membrane structure in *Lotus corniculatus* L. seeds. - *Plant Physiol.* 66, (1980), S. 316 - 320.
- 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.
- Michel, B.E. und Kaufmann, M.R.: The osmotic potential of polyethylene glycol "6000". - *Plant Physiol.* 51, (1973), S. 914 - 916.
- Mollenhauer, A., Schmitt, J.M., Coughlan, S., Heber, U.: Loss of membrane proteins from thylacoids during freezing. - *Biochim. Biophys. Acta* 728, (1983), S. 331 - 338.
- Mumford, P.M. und Panggabean, G.: A comparison of the effects of dry storage on seeds of Citrus species. - *Seed Sci. Technol.* 10, (1982), S. 257 - 266.
- 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.
- Nunes, M. d'Avila: A spin label study of erythrocyte membranes during simulation of freezing. - *J. Membr. Biol.* 60, (1981), S. 155 - 162.
- Öpik, H.: The ultrastructure of coleoptile cells in dry rice (*Oryza sativa* L.) grains after anhydrous fixation with osmium tetroxide vapour. - *New Phytol.* 85, (1980), S. 521 - 529.



- Oldfield, E. und Chapman, D.: Dynamics of lipids in membranes. Heterogeneity and the role of cholesterol. - FEBS Lett. 23, (1972), S. 285 - 297.
- Palta, J.P., Levitt, J., Stadelmann, E.J.: Freezing injury in onion bulb cells. II. Post-thawing injury on recovery. - Plant Physiol. 60, (1978), S. 398 - 401.
- Pauli, R.E.: Temperature-induced leakage from chilling-sensitive and chilling-resistant plants. - Plant Physiol. 68, (1981), S. 149 - 153.
- Perry, D.A. und Harrison, J.G. - J. Exp. Bot. 21, (1970), S. 504.
- Peveling, E. und Robenek, H.: The plasmalemma structure in the phycobiont at different stages of humidity. - New Phytol. 84, (1980), S. 371 - 374.
- Porter, K.R. und Tucker, J.B.: The ground substance of the living cell. - Scient. Amer. 243, (1981), S. 41 - 51.
- Quail, P.H. - In: Plant Biochemistry. (eds.: Bonner, J. und Varner, J.C.), Acad. Press, New York, (1976), S. 683 - 711.
- Rogerson, N.E. und Matthews, S.: Respiratory and carbohydrate changes in developing pea (*Pisum sativum* L.), seeds in relation to their ability to withstand desiccation. - J. Exp. Bot. 28, (1977), S. 304 - 313.
- Rothman, J.E. und Lenard, J.: Membrane asymmetry. - Science 195, (1977), S. 743 - 753.
- Rühl, G.F.: Untersuchungen zu den Ursachen der Kühlungs- und Trocknungsempfindlichkeit von Kakaosamen. - Dissertation, Techn. Universität Braunschweig, (1986).
- Rühl, G.F.: Untersuchungen zu den Ursachen der Kühlungs- und Trocknungsempfindlichkeit tropischer Samen am Beispiel des Kakao. I. Einfluß des Samenentwicklungszustandes. - Landbauforschung Völkenrode 38 (3), (1988), S. 220 - 234.
- Rühl, G.F., 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 38 (4), (1988), in press.
- Schroth, M.N., Weinhold, A.R., Hayman, D.S.: The effect of temperatur on quantitative differences in exudates from germinating seed of bean, pea, and cotton. - Can. J. Bot. 44, (1966), S. 1429 - 1432.
- 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.
- Simon, E.W.: Phospholipids and plant membrane permeability. - New Phytol. 73, (1974), S. 377 - 420.
- Simon, E.W. und Raja Harun, R.M.: Leakage during seed imbibition. - J. Exp. Bot. 23, (1972), S. 1076 - 1085.
- Singer, S.J.: The molecular organization of membranes. - Ann. Rev. Biochem. 43, (1974), S. 805 - 833.
- Steponkus, P.L.: Role of the plasmamembrane in freezing injury and cold acclimation. - Ann. Rev. Plant Physiol. 35, (1984), S. 543 - 584.
- Stewart, R.R.C. und Bewley, J.D.: Protein synthesis and phospholipids in soybean axes in response to imbibitional chilling. - Plant Physiol. 68, (1981), S. 516 - 518.
- Stier, A. und Sackmann, E.: Spin labels as enzyme substrates. Heterogeneous lipid distribution in liver microsomal membranes. - Biochim. Biophys. Acta 311, (1973), S. 400 - 408.
- Subrahmanyam, P., Reddy, M.N., Rao, A.S.: Exudation of certain organic compounds from seeds of groundnut. - Seed Sci. Technol. 11, (1983), S. 267 - 272.
- Swift, J.G. und Buttrose, M.S.: Freeze-etch studies of protein bodies in wheat scutellum. - J. Ultrastr. Res. 40, (1972), S. 378 - 390.
- Tappel, A.L.: Effect of low temperatures and freezing on enzymes and enzyme systems. - In: Cryobiology (ed.: Maryman, H.T.), Acad. Press, New York, San Francisco, London, (1966), S. 163 - 177.
- Thomson, W.W.: Ultrastructure of dry seed tissue after a non-aqueous primary fixation. - New Phytol. 82, (1979), S. 207 - 212.
- Van der Woude, W.J. und Toole, V.K.: Studies of the mechanism of enhancement of phytochrome-dependent lettuce seed germination by prechilling. - Plant Physiol. 66, (1980), S. 220 - 224.
- Verzar, F.: Intrinsic and extrinsic factors of molecular ageing. - Exp. Geront. 3, (1968), S. 69 - 75.
- Volger, H., Heber, U., Berzborn, R.J.: Loss of function of biomembranes and solubilization of membrane proteins during freezing. - Biochim. Biophys. Acta 511, (1978), S. 455 - 469.
- Webster, B.D. und Leopold, A.C.: The ultrastructure of dry and imbibed cotyledons of soybean. - Amer. J. Bot. 64, (1977), S. 1286 - 1293.
- Wood, A. und Paleg, L.G.: The influence of gibberellic acid on the permeability of model membrane systems. - Plant Physiol. 50, (1972), S. 103 - 108.
- Wood, A. und Paleg, L.G.: Alteration of liposomal membrane fluidity by gibberellic acid. - Aust. J. Plant Physiol. 1, (1974), S. 31 - 40.
- Wood, A., Paleg, L.G., Spotswood, T.M.: Hormone-phospholipid interaction: a possible hormonal mechanism of action in the control of membrane permeability. - Aust. J. Plant Physiol. 1, (1974), S. 167 - 169.
- 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.