



# **Untersuchungen zur Bewurzelung und Blüteninduktion an Langstecklingen von *Pyrus communis* Sorten**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Gartenbauwissenschaften

Dr. rer. hort.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Ing. agr. Kathrin Rump

geboren am 23. Februar 1975 in Springe

2012

Referent: Prof. Dr. W. Spethmann  
Korreferentin: Prof. Dr. T. Winkelmann  
Tag der Promotion: 28. September 2011



## Zusammenfassung

### Untersuchungen zur Bewurzelung und Blüteninduktion an Langstecklingen von *Pyrus communis* Sorten

In vergangenen Versuchen zeigten Langstecklinge von *Pyrus communis* ‘Williams Christ’, die als Wasserreiser von tragenden Mutterpflanzen geerntet wurden, eine gute Bewurzelung und nach der Überwinterung überraschenderweise ebenfalls eine gute Blütenbildung. Wasserreiser werden als Konkurrenztriebe bezeichnet, die am Baum nicht blühen.

Die Vermehrung von Birnensorten erfolgt normalerweise über die Veredelung auf Quitte, die als Unterlage oft nicht winterhart ist und schlecht auf alkalischen Böden wächst. Die Vermehrung wurzelechter Birnensorten könnte diese Problematik vermeiden. Die frühe Blüte an den Langstecklingen könnte es ermöglichen, die Produktionszeit in der Vermehrung von Obstgehölzen zu verkürzen, da die unproduktive, juvenile Phase der Pflanzen entfällt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Kurz- und Langstecklinge der Sorten *P. communis* ‘Williams Christ’, ‘Conference’ und ‘Vereins Dechant’ im Sommer als diesjährige senkrechte Triebe geerntet und im Folienhaus, ausgestattet mit einem Hochdrucknebelsystem, gesteckt. Die Sorte ‘Williams Christ’ wurde von 40- und 15-jährigen Bäumen geerntet, um den Einfluss des Mutterpflanzalters beurteilen zu können. Im folgenden Frühjahr wurden die Bewurzelung und die Blütenbildung bonitiert. Da die Stecklinge von reproduktiven Mutterbäumen geerntet wurden, sollte mittels histologischer Untersuchungen und Genexpressionsanalysen der Knospen geklärt werden, ob die Stecklinge zum Erntezeitpunkt bereits zur Blüte induziert waren oder ob die Umstimmung zur Blüte während der Bewurzelung im Folienhaus durch die zum Teil sehr hohen Temperaturen erfolgte. Die Expressionsanalysen wurden für die blühfördernden Gene *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1*, *APETALA 1* und *LEAFY 1* sowie für das Blütenrepressorgen *TERMINAL FLOWER 1* durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Kurzstecklinge von jüngeren Mutterpflanzen besser und die Kurzstecklinge von älteren Mutterpflanzen schlechter bewurzelten als die Langstecklinge. Die Bewurzelungsqualität wurde vom Mutterpflanzenalter nicht beeinflusst. Der Bewurzelungserfolg der *Pyrus* Sorten war von Jahr zu Jahr verschieden und lag für ‘Williams Christ’ zwischen 15 und 82 %. Die Blütenbildung an Stecklingen von ‘Williams Christ’ von jüngeren Mutterbäumen war höher als die an den Stecklingen der älteren Mutterbäume. Die Blütenbildung an den Stecklingen von ‘Conference’ war in allen Jahren geringer als an ‘Williams Christ’, und die Stecklinge von ‘Vereins Dechant’ zeigten keine Blütenbildung. Bereits zu Versuchsbeginn zeigten die Meristeme der Knospen von ‘Williams Christ’ erste morphologische Veränderungen über eine Verbreiterung des Apex. In den Knospen beider Sorten konnte zu Versuchsbeginn die Expression der blühfördernden Gene nachgewiesen werden. Ein Einfluss der hohen Temperaturen auf die Blüteninduktion konnte nicht festgestellt werden. Die molekulargenetischen Ergebnisse zeigten vielmehr, dass die Blüteninduktion in den Knospen von ‘Williams Christ’ und ‘Conference’ bereits am Baum stattfand und sich hohe Temperaturen während der Kultur im Folienhaus eher nachteilig auf die Blütenbildung auswirkten. Die Blütenbildung bei *Pyrus* scheint zudem sehr stark sortenabhängig zu sein. Wenn es gelingt, die Bewurzelung der Langstecklinge von *Pyrus* Sorten zu verbessern, bietet

diese Art der Vermehrung eine Möglichkeit um die Produktionszeit von Birnen zu verkürzen und die Problematik mit Quittenunterlagen zu umgehen.

## Summary

### **Studies on flower induction and rooting of long cuttings of *Pyrus communis* cultivars**

Previous experiments showed that long cuttings of *Pyrus communis* 'Williams Christ' harvested as water shoots from bearing mother plants presented good rooting results and after hibernation, surprisingly, also a good flowering. Water shoots are usually known as non flowering shoots. Cultivars of pears are normally propagated by budding on rootstocks of quince which have poor winter hardiness and grow poorly on alkaline soils. This problem could be avoided by propagating pears on their own roots. The early flowering of the long cuttings might shorten the time of propagation of fruit trees because there is no unproductive, juvenile phase of the plants.

In this study short and long cuttings of the varieties *Pyrus communis* 'Williams Christ', 'Conference' and 'Vereins Dechant' were harvested in summer as vertical young shoots and set in a foil house with a high pressure fog system. The cuttings of 'Williams Christ' were harvested from 40 - and 15-year-old mother plants to prove the influence of the age of mother trees.

The following spring the rooting and flower formation were evaluated. Since the cuttings were harvested from reproductive mother trees it should be clarified by histological examinations and gene expression analysis if the buds of the cuttings were already induced at harvest or if they were induced to flower during the rooting by the very high temperatures in the foil house. The expression analyses were performed with the flowering genes *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1*, *APETALA 1* and *LEAFY 1* and the repressor gene *TERMINAL FLOWER 1*.

The results showed that short cuttings from younger mother plants rooted better and the short cuttings from older mother plants rooted worse than the long cuttings. The quality of rooting was not influenced by the mother plants age. The success of rooting of *Pyrus* species was different from year to year and it ranged from 15 - 82 % for 'Williams Christ'. The flowering of cuttings from 'Williams Christ' from younger mother trees was higher than that of the cuttings of the older mother plants. The flowering on the cuttings of 'Conference' was less in all years compared to 'Williams Christ' and the cuttings of 'Vereins Dechant' showed no flowering. From the beginning of the experiments the meristems of the buds of 'Williams Christ' already showed the first morphological changes by broadening of the apex. At beginning of the experiments the expression of flowering genes in buds of 'Conference' and 'Williams Christ' was detected already. An influence of the high temperatures on flower induction could not be determined. The expression results showed even more that flower induction in the buds of 'Williams Christ' and 'Conference' took already place on the tree before harvest and those high temperatures during the formation of flowers had negative effects on flowering. The flowering in *Pyrus* also seemed to depend on the cultivar. If it is possible to improve the rooting of the long cuttings of *Pyrus* cultivars this propagation method will be an option to shorten the time of production and to avoid the problems with propagation on rootstocks of quince.

**Schlagworte**

- Birne
- Langsteckling
- Blüteninduktion



**Keywords**

- Pear
- Long cutting
- Flower induction

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	I
Summary .....	III
Schlagworte .....	IV
Keywords .....	V
Inhaltsverzeichnis .....	1
Tabellenverzeichnis .....	5
Abbildungsverzeichnis.....	9
Abkürzungsverzeichnis.....	14
Einheiten .....	15
1. Einleitung .....	16
1.1 Hintergrund für die vorliegende Dissertation .....	16
1.2 Historische Entwicklung von <i>Pyrus communis</i> .....	16
1.3 Wirtschaftliche Bedeutung von <i>Pyrus communis</i> .....	17
1.4 Vermehrung von Kulturbirnen.....	19
1.5 Phasenwechsel bei Obstgehölzen .....	20
1.6 Vermehrung von <i>Pyrus communis</i> Sorten über Langstecklinge.....	21
1.7 Stecklingsvermehrung von <i>Pyrus communis</i> Sorten.....	22
1.8 Blütenbildung an Apfel und Birne.....	25
1.9 Beeinflussung der Blütenbildung.....	26
1.10 Blüteninduktion bei <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	27
1.11 Blüteninduktion bei Apfel und Birne.....	31

1.12	Zielsetzung der Arbeit.....	32
2.	Material und Methoden .....	33
2.1	Bewurzelung und Blütenbildung in der Stecklingsvermehrung von <i>Pyrus communis</i> Sorten.....	33
2.1.1	Stecklingsmaterial.....	33
2.1.2	Bewurzelung der Stecklinge im Folienhaus .....	36
2.1.3	Bewurzelung der Stecklinge in der Klimakammer.....	38
2.1.4	Dokumentation der klimatischen Bedingungen.....	39
2.1.5	Statistische Auswertung.....	40
2.2	Histologische Untersuchungen zur Blütendifferenzierung an ‘Williams Christ‘ .....	41
2.2.1	Einbetten und Schneiden der Knospen .....	41
2.2.2	Mikroskopie .....	43
2.2.3	Statistische Auswertung.....	43
2.3	Molekulargenetische Untersuchungen zur Blüteninduktion an <i>Pyrus</i> <i>communis</i> Sorten.....	44
2.3.1	Extraktion von Nukleinsäuren .....	45
2.3.2	Agarosegelelektrophorese und Geldokumentation.....	47
2.3.3	RNA und DNA Quantifizierung.....	47
2.3.4	cDNA-Synthese .....	48
2.3.5	Polymerase Kettenreaktion .....	48
2.3.6	Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR).....	50
2.3.7	Ableitung und Design der verwendeten Primer.....	51
2.3.8	Sequenzierung der amplifizierten Produkte.....	52

2.3.9	Berechnung der Ergebnisse aus der qRT-PCR.....	52
2.3.10	Statistische Auswertung.....	53
3.	Ergebnisse.....	54
3.1	Bewurzelung und Blütenbildung von <i>Pyrus communis</i> Sorten .....	54
3.1.1	Bewurzelung .....	54
3.1.2	Blütenbildung.....	62
3.2	Histologische Untersuchungen zur Blütendifferenzierung an ‘Williams Christ‘ .....	69
3.3	Molekulargenetische Untersuchungen zur Blüteninduktion an <i>Pyrus</i> <i>communis</i> Sorten.....	73
3.3.1	‘Williams Christ‘ .....	75
3.3.2	‘Conference‘ .....	89
4.	Diskussion .....	93
4.1	Bewurzelung und Blütenbildung von <i>Pyrus communis</i> Sorten .....	93
4.1.1	Bewurzelung .....	93
4.1.2	Blütenbildung.....	98
4.2	Blütendifferenzierung und Blüteninduktion von <i>Pyrus communis</i> Sorten .....	105
4.2.1	Blütendifferenzierung .....	105
4.2.2	Blüteninduktion .....	107
4.3	Abschlussbetrachtung .....	114
5.	Literaturverzeichnis .....	118
6.	Anhang .....	128
	Lebenslauf .....	144

Erklärung .....145

Danksagung .....146

**Tabellenverzeichnis**

· Tabelle 1: Verwendung, Herkunft und Status der Mutterpflanzen von <i>Pyrus communis</i> in den Versuchsjahren sowie die Anzahl der Stecklinge. (Standort Karlsruhe/ Grünwettersbach; Wurzeln)	34
· Tabelle 2: Ernte-, Steck-, und Boniturtermin aller Stecklinge in den Versuchsjahren (2005-2008)	35
· Tabelle 3: Behandlung der Stecklinge in den Versuchsjahren	35
· Tabelle 4: Durchschnittliche Länge der Langstecklinge zu Versuchsbeginn (gemittelter Wert von 20 Stecklingen) beziehungsweise Angaben über den Längenbereich, in dem sich die Stecklinge zu Versuchsbeginn befanden	35
· Tabelle 5: Boniturschema für Topfstecklinge nach SPETHMANN (2000). Die Boniturnote erfolgt nach der Intensität der Bewurzelung des Topfballens	38
· Tabelle 6: Zusammensetzung einer 70 %-FPA-Lösung zur Fixierung von Knospen (nach M. Neumüller, TU München/ Dürnast)	41
· Tabelle 7: Komponenten und Lösungen zur Einbettung in Historesin (Leica)	42
· Tabelle 8: Behandlung der Knospen zur Einbettung in Kunstharz	42
· Tabelle 9: Arbeitsanweisung zur Extraktion pflanzlicher RNA (Invisorb® Spin Plant RNA Mini Kit der Firma Invitex)	45
· Tabelle 10: Arbeitsanweisung zur Extraktion pflanzlicher DNA (modifiziert nach DOYLE und DOYLE, 1990)	46
· Tabelle 11: Elongationsfaktor aus <i>Malus x domestica</i>	47
· Tabelle 12: Arbeitsanweisung zur cDNA-Synthese mit dem cDNA-Synthese Kit der Firma Fermentas	48
· Tabelle 13: Pipettierschema für die PCR	48
· Tabelle 14: Thermocycler-Programm zur Durchführung der PCR	49
· Tabelle 15: Thermocycler-Programm zur Durchführung der qRT-PCR	50
· Tabelle 16: Pipettierschema für die qRT-PCR	50
· Tabelle 17: Sequenzen, Produktgröße und Annealingtemperatur der für die qRT-PCR verwendeten sense- und antisense Primer für ‘Williams Christ’ (WC) und ‘Conference’ (Con)	51
· Tabelle 18: Arbeitsanweisung zur DNA-Extraktion aus einem Agarosegel (Kit NucleoSpin®Extract II von Macherey-Nagel)	52

- Tabelle 19: Effizienz der verwendeten Primerpaare und die eingesetzte Verdünnung der Templates in der qRT-PCR 53
- Tabelle 20: Durchschnittliche Wurzellänge\* an Kurz- und Langstecklingen von *P. communis* ‘Williams Christ‘ (WC) aus dem Versuchsjahr 2005 55
- Tabelle 21: Prozentuale Blüte an Lang- und Kurzstecklingen von *P. communis*-Sorten im Folienhaus (2005 - 2008) und unter kontrollierten Temperaturbedingungen in der Klimakammer (KK, 2008) 63
- Tabelle 22: Gemittelte Breiten- und Höhenwerte [ $\mu\text{m}$ ] der Meristemstadien I bis III in Knospen von Langstecklingen (T0 bis T9) und senkrechten Trieben am Baum (11.08. und 09.09.) von ‘Williams Christ‘ Wurzeln (2008). In Klammern angegeben finden sich die jeweils kleinste und höchste Breitenangabe eines Stadiums. 71
- Tabelle 23: Gesamtzahl der in der qRT-PCR getesteten Knospen von T0 bis T8 für ‘Williams Christ‘ (Langstecklinge, senkrechte (ST) und waagerechte (geb) Triebe am Baum, 2008) sowie die Anzahl der Knospen, die für die Auswertung der einzelnen Gene herangezogen werden konnten. Die Anzahl der Knospen, die für die Berechnung der Mittelwerte für *MdAP 1* an T0 und T1 herangezogen wurden, sind in Klammern aufgeführt und grau gekennzeichnet. 76
- Tabelle 24: Statistische Auswertung der Daten zu den relativen Expressionsdaten von *MdAP 1*, *MdSOC 1*, *PcAFL 1-1* und *PcTFL 1-1* in Knospen von Langstecklingen an ‘Williams Christ‘ Wurzeln (Folienhaus, 2008). Paarweise verglichen wurden die Mittelwerte zwischen den Zeitpunkten innerhalb eines Gens. 78
- Tabelle 25: Mittelwertangaben der relativen Expressionsraten von *MdSOC 1*, *PcAFL 1-1* und *PcTFL 1-1* in Knospen von Langstecklingen an ‘Williams Christ‘ Karlsruhe zum Zeitpunkt T0 (Folienhaus, 2008). *MdAP 1* konnte nicht nachgewiesen werden 79
- Tabelle 26: Statistische Auswertung der Daten zu den relativen Expressionsdaten von *MdAP 1*, *MdSOC 1*, *PcAFL 1-1* und *PcTFL 1-1* in Knospen von Langstecklingen an ‘Williams Christ‘ Wurzeln im Folienhaus (FH), am Baum von senkrechten Trieben (ST) und waagrecht gebundenen Ästen (geb) an zwei Terminen (T3 und T7). Paarweise verglichen wurden die Mittelwerte der Varianten innerhalb eines Gens. 81

- Tabelle 27: Verhältniswerte der blühhördernden Gene *MdAP 1*, *PcAFL 1-1* und *MdSOC 1* zum Repressorgen *PcTFL 1-1* in fünf verschiedenen Blütenknospen (A - E) geerntet von der Freifläche in Hannover/ Herrenhausen am 4.12.2009. Die Werte wurden gerundet. 83
- Tabelle 28: Verhältniswerte der Blütengene *MdAP 1*, *PcAFL 1-1* und *MdSOC 1* zum Repressorgen *PcTFL 1-1* gebildet aus den Mittelwerten der Expressionsraten an den Terminen 2007 und 2008 von Langstecklingen der Sorte ‘Williams Christ’. Die Werte für *MdAP 1* an T0 (2007, 2008) und T1 (2008) konnten nicht in Wiederholung abgesichert werden und sind daher grau dargestellt. Die Werte stammen von Langstecklingen aus Wurzeln, mit Ausnahme des Zeitpunktes T0 K: hier werden die Daten der Langstecklinge aus Karlsruhe gezeigt. Die angegebenen Werte wurden gerundet. 84
- Tabelle 29: Quantitative Genexpression von *MdAP 1* und *PcTFL 1-1* in den Einzelknospen von ‘Williams Christ’ Wurzeln und deren Knospenposition an Langstecklingen im Folienhaus von T0 bis T8 (2008). Dargestellt ist die jeweils stärkere Expression eines Gens innerhalb einer Knospe 86
- Tabelle 30: Quantitative Genexpression von *MdAP 1* und *PcTFL 1-1* in den Einzelknospen von ‘Williams Christ’ und deren Knospenposition an waagrecht gebundenen Ästen (geb) und senkrechten Trieben (ST) am Baum zu den Zeitpunkten T3 und T7 (2008). Dargestellt ist die jeweils stärkere Expression eines Gens innerhalb einer Knospe 86
- Tabelle 31: Gesamtzahl der in der qRT-PCR getesteten Knospen an T0, T3, T5 und T8 für ‘Conference’ Langstecklinge und senkrechte Triebe (ST) an T7 am Baum (2008) sowie die Anzahl der Knospen die für die Auswertung der einzelnen Gene herangezogen werden konnten. 89
- Tabelle 32: Verhältniswerte der Blütengene *MdAP 1*, *PcAFL 1-1* und *MdSOC 1* zum Repressorgen *PcTFL 1-1* gebildet aus den Mittelwerten der Expressionsraten an den Terminen 2008 von Langstecklingen der Sorte ‘Conference’. Die angegebenen Werte wurden gerundet. 91



- Tabelle 33: Quantitative Genexpression von *MdAP* 1 und *PcTFL* 1-1 in den Einzelknospen von ‘Conference‘ und deren Knospenposition an Langstecklingen im Folienhaus (an T0, T3, T5 und T8) und an senkrechten Trieben (ST) am Baum zum Zeitpunkt T7 (2008). Dargestellt ist die jeweils stärkere Expression eines Gens innerhalb einer Knospe (*MdAP* 1 = lila; *PcTFL* 1-1 = grün). Knospen für die keine Werte vorliegen sind mit einem X gekennzeichnet. 91
- Tabelle 34: Bewurzelungserfolg von *P. communis* ‘Williams Christ‘ und ‘Conference‘ an Kurz- und Langstecklingen eigener und zitierter Untersuchungen zum Vergleich. 94

**Abbildungsverzeichnis**

- Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entwicklung von Gehölzen von juvenil zu adult. Basierend auf Untersuchungen von Apfelsämlingen (verändert nach HANKE et al., 2007) 20
- Abbildung 2: a) Birnenbaum in Vollblüte am 16.04.2008 mit Blüten an senkrechten Trieben (Pfeil) und b) am 13.04.2011 ohne Blüten an den senkrechten Trieben. Dargestellt ist jeweils derselbe Baum, die Sorte ist unbekannt. 22
- Abbildung 3: Histologische Entwicklungsstadien vegetativer und reproduktiver Meristeme in Apfelknospen (HANKE 1981) 25
- Abbildung 4: Schematische Darstellung der Verteilung der Expression von *FT*, *LFY*, *SOC 1* und *AP 1* im Blatt sowie im vegetativen und reproduktiven Sprossmeristem (von links nach rechts) an *Arabidopsis thaliana* (verändert nach PARCY, 2005). „Detected“ bedeutet, dass die Expression nachgewiesen wurde, aber die örtliche Lage ist noch nicht bekannt. Sternchen bezeichnet die Lage des Sprossapikalmeristems. Die Nummern geben die Stadien des Blütenmeristems an. *CAULIFLOWER (CAL)* ist *AP 1* sehr ähnlich. 29
- Abbildung 5: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genen in der Blütenregulierung und der Einflüsse von endogenen und exogenen Signalwirkungen an *Arabidopsis thaliana* (JUNG und MÜLLER, 2010). Negative und positive Wechselwirkungen sind mit Pfeilen dargestellt. Pfeile mit Spitze bedeuten fördernde, abgeflachte Pfeile bedeuten hemmende/unterdrückende Wechselwirkung. Gestrichelte Pfeile bedeuten spekulative Interaktionen Die farbige gekennzeichneten Gene wurden in dieser Arbeit an ‘Williams Christ‘ untersucht. 30
- Abbildung 6: Typischer Wuchs senkrechter Triebe an *P. communis* ‘Williams Christ‘ zum Zeitpunkt der Ernte 33
- Abbildung 7: Boniturschema für die Bewurzelung im Topf/Grundbeet nach SPETHMANN (2000) 37
- Abbildung 8: Folienkammer mit Hochdrucknebelsystem innerhalb einer Klimakammer 39

- 
- Abbildung 9: Bewurzelung\* an Stecklingen von *P. communis* ‘Williams Christ‘ (WC) aus dem Versuchsjahr 2005. Lang: Langsteckling, Kurz: Kurzsteckling 54
  - Abbildung 10: Bewurzelung\* an Lang- und Kurzstecklingen von ‘Williams Christ‘ (WC) aus dem Versuchsjahr 2006. Lang: Langsteckling, Kurz: Kurzsteckling 55
  - Abbildung 11: Qualität der Stecklingsbewurzelung von ‘Williams Christ‘ (WC) anhand der prozentualen Anteile in den verschiedenen Boniturstufen der Ballenbonitur im Versuchsjahr 2006. Lang = Langsteckling, Kurz = Kurzsteckling 56
  - Abbildung 12: Bewurzelung\* an Langstecklingen von ‘Williams Christ‘, ‘Conference‘ und ‘Vereins Dechant‘ aus dem Versuchsjahr 2007. Lang = Langsteckling 57
  - Abbildung 13: Qualität der Bewurzelung von *P. communis* ‘Williams Christ‘, ‘Conference‘ und ‘Vereins Dechant‘ anhand der prozentualen Anteile in den verschiedenen Boniturstufen im Versuchsjahr 2007. Lang = Langsteckling 58
  - Abbildung 14: Bewurzelung\* an Langstecklingen von ‘Williams Christ‘ und ‘Conference‘ aus dem Versuchsjahr 2008. Von ‘Williams Christ‘ wurden Stecklinge zweier Standorte getestet (Wurzen und Karlsruhe). Lang = Langsteckling 59
  - Abbildung 15: Qualität der Bewurzelung an Langstecklingen von ‘Williams Christ‘ und ‘Conference‘ anhand der prozentualen Anteile in den verschiedenen Boniturstufen im Versuchsjahr 2008. Von ‘Williams Christ‘ wurden Stecklinge zweier Standorte getestet (Wurzen und Karlsruhe). Lang = Langsteckling 60
  - Abbildung 16: Bewurzelung\* an Langstecklingen von ‘Williams Christ‘ und ‘Conference‘ in der Klimakammer (2008). Von ‘Williams Christ‘ wurden Stecklinge zweier Standorte getestet (Wurzen und Karlsruhe). Lang = Langsteckling. 61
  - Abbildung 17: Qualität der Bewurzelung von Langstecklingen von *P. communis* ‘Williams Christ‘ und ‘Conference‘ anhand der prozentualen Anteile in den verschiedenen Boniturstufen in der Klimakammer (2008). An ‘Williams Christ‘ wurden Stecklinge zweier Herkünfte getestet (W: Wurzen, K: Karlsruhe). (Lang = Langsteckling) 61
-

- 
- Abbildung 18: Blütenbildung an Langstecklingen von ‘Williams Christ‘ im Frühjahr 2007 62
  - Abbildung 19: Blütenbildung an einem a) bewurzelten Langsteckling und b) unbewurzelten Langstecklingen von ‘Williams Christ‘ aus dem Folienhaus (April 2007) 64
  - Abbildung 20: Anteil der bewurzelten und unbewurzelten Stecklingen mit Blüte von ‘Williams Christ‘ (WC), ‘Conference‘ (Con) und ‘Vereins Dechant‘ (VD) im Folienhaus (FH) und unter kontrollierten Bedingungen (KK), ( 2005 – 2008) (Lang = Langsteckling, Kurz = Kurzsteckling) 65
  - Abbildung 21: Prozentualer Anteil blütenbildender Knospen bezogen auf die Position der Nodien an bewurzelten und unbewurzelten Langstecklingen von ‘Williams Christ‘ (Wurzen) in den Jahren 2007 (a) und 2008 (b). Die Position ergibt sich durch die Nummerierung der Nodien am Steckling von der Spitze zur Basis. Die terminale Knospe hatte die Position ‘apikal‘ (siehe Skizze). 66
  - Abbildung 22: Mutterbäume der Sorte ‘Conference‘ zur Vollblüte a) ohne Blütenbildung und b) mit Blütenbildung an den senkrechten Trieben am 22. April 2009 in Ruthe 68
  - Abbildung 23: Mutterbäume der Sorte ‘Williams Christ‘ zur Vollblüte an a) senkrechten und b) waagrecht gebundenen Trieben (eingekreist) am 28. April 2009 in Wurzen (Fotos: A. Zschammer) 68
  - Abbildung 24: Morphologische Entwicklungsstufen der Blütendifferenzierung an *P. communis* ‘Williams Christ‘ und die Einteilung in verschiedene Stadien anhand histologischer Schnitte (a bis d: 100fach vergrößert; e: 25fach vergrößert). Der Maßstab ist jeweils mit 100 µm angegeben. Vegetatives, abgeflachtes Meristem: Stadium I (a), vegetatives, gewölbtes Meristem: Stadium II (b), Zwischenstadium II – III (c), generatives Pflockmeristem: Stadium III (d), Infloreszenzmeristem: Stadium V (e). Breiten- und Höhenmessung [µm] des Meristems zwischen den Blattprimordien (f). 70
  - Abbildung 25: Prozentuale Verteilung der verschiedenen Stadien der Knospenentwicklung von T0 bis T9 an Langstecklingen sowie an zwei Terminen an senkrechten Trieben (ST) am Baum von *P. communis* ‘Williams Christ‘ Wurzen (2008). Ausgewertet wurden die Knospen an den Positionen der Nodien 2 bis 7 sowie die apikale Knospe. 72

- Abbildung 26: Relative Expressionsraten von *MdAP 1*, *MdSOC 1*, *PcAFL 1-1* und *PcTFL 1-1* in Knospen von Langstecklingen an ‘Williams Christ‘ Wurzeln (Folienhaus, 2008). Die Kurven zeigen die Mittelwerte der Expressionsdaten aus den Knospen eines Termins. Die Darstellung der Expression von *MdAP 1* an T0 und T1 ist gestrichelt dargestellt, da die Einzeldaten der Knospen nicht in technischer Wiederholung vorlagen. Die Pfeile geben die Standardabweichung der Werte an. 78
- Abbildung 27: Relative Expressionsraten von *MdAP 1*, *MdSOC 1*, *PcAFL 1-1* und *PcTFL 1-1* in Knospen von Langstecklingen an ‘Williams Christ‘ Wurzeln (Folienhaus, 2007). Die Kurven zeigen die Mittelwerte der Expressionsdaten aus den Knospen eines Termins. Die Darstellung der Expression von *MdAP 1* an T0 zu T1 ist gestrichelt dargestellt, da die Einzeldaten der Knospen nicht in technischer Wiederholung vorlagen. Die Pfeile geben die Standardabweichung der Werte an. 79
- Abbildung 28: Relative Expressionsraten von *MdAP 1*, *MdSOC 1*, *PcAFL 1-1* und *PcTFL 1-1* in Knospen von Langstecklingen an ‘Williams Christ‘ Wurzeln im Folienhaus, am Baum von senkrechten Trieben (ST) und waagrecht gebundenen Ästen (geb) an zwei Terminen (T3 und T7). Die Punkte zeigen die Mittelwerte der Expressionsdaten aus den Knospen eines Termins bezogen auf T0. Die Pfeile geben die Standardabweichung der Werte an. 81
- Abbildung 29: Relative Genexpression fünf verschiedener Blütenknospen (A - E) von ‘Williams Christ‘ geerntet von der Freifläche in Hannover/ Herrenhausen am 4.12.2009. Die Punkte zeigen die Mittelwerte der Expressionsdaten einer Knospe aus 2 technischen Wiederholungen an. Die Balken geben die Standardabweichung der Werte an. 83
- Abbildung 30: Darstellung der relativen Genexpressionsraten von *MdAP 1*, *MdSOC 1*, *PcAFL 1-1* und *PcTFL 1-1* im Vergleich zur mittleren Tagestemperatur und den Tageshöchstwerten (°C) vom 22.07.08 bis 18.09.08 im Folienhaus an Langstecklingen von ‘Williams Christ‘. Die Balken der Genexpressionsraten wurden mit einer Trendlinie versehen. 88

- Abbildung 31: Relative Expressionsraten von *MdAP 1*, *MdSOC 1*, *PcAFL 1-1* und *PcTFL 1-1* in Knospen von Langstecklingen an ‘Conference‘ aus dem Folienhaus (T0, T3, T5 und T8, 2008). Die Kurven zeigen die Mittelwerte der Expressionsraten aus den Knospen eines Termins. Die Balken geben die Standardabweichung der Werte an. 90

## Abkürzungsverzeichnis

<i>AFL 1</i>	<i>APPLE FLORICAULA 1</i>
<i>AP 1</i>	<i>APETALA 1</i>
bp	Basenpaare
<i>CO</i>	<i>CONSTANS</i>
EtBr	Ethidiumbromid
FH	Folienhaus
<i>FT</i>	<i>FLOWERING LOCUS T</i>
KK	Klimakammer
<i>LFY</i>	<i>LEAFY</i>
LM	Längenmarker
<i>Md</i>	<i>Malus x domestica</i>
NE	Nicht Ermittelt
<i>Pc</i>	<i>Pyrus communis</i>
<i>SOC 1</i>	<i>SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1</i>
<i>TFL 1</i>	<i>TERMINAL FLOWER 1</i>

**Einheiten**

h	hour/ Stunde
mbar	Millibar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min.	Minuten
Mio.	Millionen
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
sek.	Sekunde
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung



## 1. Einleitung

### 1.1 Hintergrund für die vorliegende Dissertation

Die überraschende Beobachtung, dass lange Stecklinge der Sorte *Pyrus communis* ‘Williams Christ‘ (gewachsen als neue, senkrechte Triebe im oberen Kronenbereich einer 37 Jahre alten Erwerbsanlage) sowohl gut bewurzelten als auch Blüten im folgenden Frühjahr zeigten (Kapitel 1.6), bilden den Ausgangspunkt für die vorliegenden Untersuchungen. Die Blütenbildung an den senkrechten Trieben einiger Obstgehölze (darunter u. a. Apfel und Birne) erfolgt normalerweise erst, wenn diese sich neigen und Fruchtriebe bilden und das passiert nach 2 oder 3 Jahren (HILKENBÄUMER, 1964). Somit zeigten die verwendeten Stecklinge gleichzeitig juvenile (gute Bewurzelung) und adulte Merkmale (Blütenbildung). Diese erstaunliche Beobachtung wurde in der vorliegenden Dissertation untersucht und im Folgenden soll auf die Gattung *Pyrus* sowie die verschiedenen Aspekte dieser Arbeit eingegangen werden.

### 1.2 Historische Entwicklung von *Pyrus communis*

Die Gattung *Pyrus* besteht aus über 20 Arten, von denen die Hälfte in Europa, Nordafrika und Kleinasien und die andere Hälfte in Asien heimisch ist (JANICK, 2002). Birnen gehören zur Ordnung der Rosales, der Familie der *Rosaceae* und werden der Unterfamilie der *Maloideae* zugeordnet (FITSCHEN, 2007).

Der deutsche Begriff ‘Birne’ stammt ursprünglich von dem lateinischen Wort *pirum* ab. Der englische Name ‘pear’ bildete sich aus dem angelsächsischen Wort *pere* oder *peru hu*, dessen Ursprung ebenso auf den lateinischen Begriff zurückzuführen ist (JANICK, 2002; HEILMEYER, 2004). Die erste Erwähnung der Birne findet sich in Homer’s Odyssee, wo die Birne - neben Apfel, Feige, Olive und Granatapfel - zu den Geschenken der Götter zählte. Diese Früchte finden sich dann ebenfalls in der christlichen Ikonographie als Metapher für heilige Bäume wieder (JANICK, 2002). Die Kultur der asiatischen Birne reicht 2500 bis 3000 Jahre zurück und wird in 1200-Jahre alten chinesischen Chroniken beschrieben (JANICK, 2002).

Der exakte Ursprung der europäischen Birne ist unbekannt, aber bei Ausgrabungen in der Schweiz fand man getrocknete Fruchtteile in Höhlen aus der Eiszeit. In Frankreich wurde die Birne vermutlich durch die Römer eingeführt. Die erste

Ansammlung von Birnensorten wird Karl dem Großen (742-814) zugeschrieben (HEDRICK 1921; JANICK, 2002). Durch die Erwähnung der Birne in Shakespeares Literatur wird deutlich, dass Birnen um 1500 in England allgemein bekannt waren. Um 1600 kamen die ersten Birnensorten aus Frankreich nach Deutschland (HEILMEYER, 2004).

### **1.3 Wirtschaftliche Bedeutung von *Pyrus communis***

Wirtschaftliche Bedeutung haben heute die weichfleischige europäische *Pyrus communis* und die hartfleischige asiatische *Pyrus pyrifolia* (JANICK, 2002). Während die Birne zur Zeit der Renaissance in Frankreich und später auch in Deutschland noch beliebter war und stärker angebaut wurde als z. B. der Apfel (HEILMEYER, 2004), nimmt die Birnenproduktion, betrachtet für Nordeuropa, heute nur einen kleinen Teil der Kernobstproduktion ein und umfasst etwa 5 bis 15 % (BÜNEMANN, 2002).

Heute spielen Birnen wirtschaftlich eine geringere Rolle als Äpfel (AID, 2004). Nach einem massiven Absterben der Birnen (pear decline) in den 60er Jahren und durch Unverträglichkeiten mit den Unterlagen (HIGDON und WESTWOOD, 1963) gelten Birnen bis heute als problematisch im Anbau. Sie benötigen einen warmen Standort, und das Obst ist im Vergleich zum Apfel nicht sehr lange lagerfähig. Das Holz ist empfindlicher als das des Apfels und auch geschmacklich findet der Apfel größere Akzeptanz beim Verbraucher (AID, 2004; JANICK, 2002).

Nach BÜNEMANN (2002) wurden 1965 im ‚Alten Land‘ noch 1700 ha mit Birnen bewirtschaftet, während es dort heute nur noch 300 ha sind, wobei 61 % der Bäume älter als 25 Jahre und 20 % jünger als 10 Jahre sind. Deutschlandweit werden nach den Angaben des BUNDESSORTENAMTES (2003) Birnen auf einer Fläche von 2100 ha mit einer Erntemenge von rund 47.000 t angebaut. Das entspricht etwa 3,9 % des in Deutschland produzierten Obstes (zum Vergleich Apfel: 77 %). Europaweit werden seit 10 Jahren etwa 2,5 bis 3 Mio. Tonnen jedes Jahr produziert (COSTES et al., 2003).

In den letzten Jahren ist eine weitere Abnahme der kultivierten Flächen zu verzeichnen, da die Produktion von Birnen vielen Einflüssen unterliegt, die mit großen Risiken, verbunden sind - wie Spätfröste während der Blüte, schlechtes Wetter während der Bestäubung etc. (COSTES et al., 2003). Nordeuropa importiert

zusätzlich Birnen sowohl aus den Mittelmeer-Ländern als auch aus der südlichen Hemisphäre (WERTHEIM et al., 2001; BÜNEMANN, 2002).

Die wohl bekannteste Sorte ist ‘Williams Christ’ (Syn. ‘Bartlett’, ‘Williams Bon Chrétien’). Sie wurde 1770 in Berkshire (GB) gefunden und kam zwischen 1799 und 1817 unter verschiedenen Namen in den Handel. Der Blühbeginn wird bei Mitte April bis Anfang Mai als mittelfrüh angegeben und die Erntereife der Früchte ist Anfang September erreicht (BUNDESSORTENAMT, 2003; HEDRICK, 1921).

Die Sorte ‘Conference’ (Syn. ‘Konferenzbirne’) befindet sich seit 1894 im Handel. Bei ‘Conference’ handelt es sich um die meist angebaute Sorte im Erwerbsanbau in Mittel- und Westeuropa mit konstant hohen Erträgen. Die Blüte erfolgt mittelfrüh von Mitte April bis Anfang Mai und die Früchte haben Mitte September ihre Erntereife erreicht (BUNDESSORTENAMT, 2003). Die Niederlande und Belgien verzeichnen, hauptsächlich mit Pflanzungen dieser zwei Sorten, eine geringe Zunahme in der Birnenproduktion (WERTHEIM et al., 2001; BÜNEMANN, 2002).

#### 1.4 Vermehrung von Kulturbirnen

Schon sehr früh befasste man sich mit der Kultur, der Vermehrung und der Steigerung des Fruchtertrages von Obstsorten. Theophrastus von Eresos, (370-286 v. Chr.) der als der erste Gelehrte gilt, der sich ernsthaft mit der Holz- und Baumkunde befasst hat, schrieb in seinem Buch '*De causis Plantarum*' über die Vermehrung von Birnen. Er beschrieb die Vermehrung über Aussaat und Stecklinge und auch die Pfropfung wurde bereits beschrieben. Um den Fruchtertrag zu steigern schilderte er die Behandlungen des Wurzelschnittes, des Ringelns sowie das Schlagen von Eisennägeln in den Stamm. Er erkannte die Notwendigkeit der Fremdbestäubung und verglich bereits den Anbau von Birnen auf unterschiedlichen Böden und in verschiedenen Situationen (JANICK, 2002).

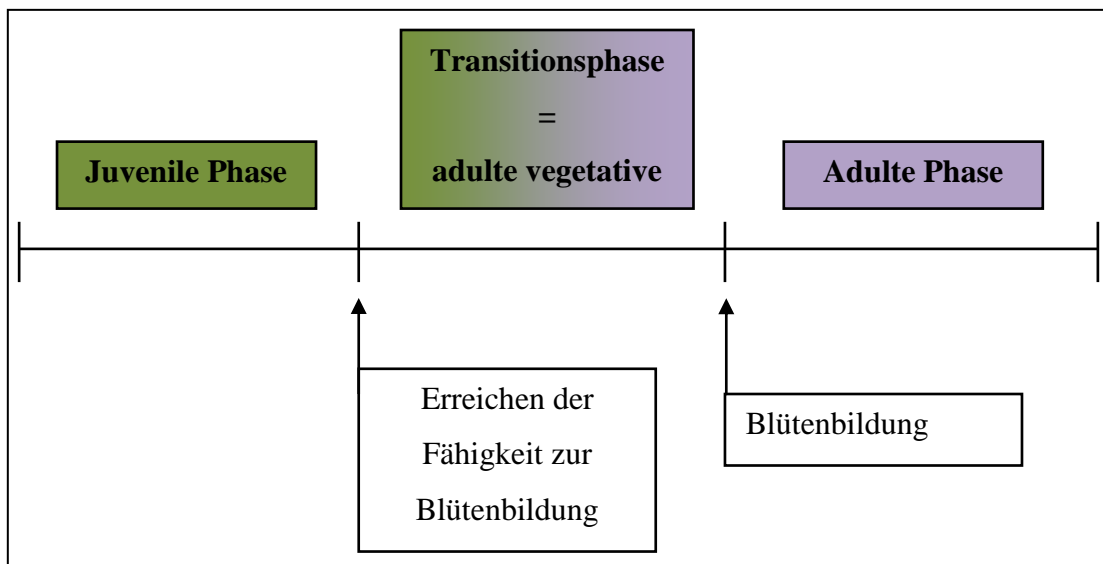
Da Kernobstsorten stark heterozygot sind, ist die große Variabilität über eine generative Vermehrung von Obstbäumen unerwünscht, und so hat sich die Vermehrung der Ertragssorten auf einer geeigneten Unterlage durchgesetzt (FRIEDRICH et al., 1978). Die Veredelung ist für Obstbauern auf rein praktische und ökonomische Gründe zurückzuführen. Der Ertrag muss gesichert und der Anbau möglichst unkompliziert sein. Die Unterlage beeinflusst und verbessert das Edelreis in vielerlei Weise, hauptsächlich in der Wuchsstärke, der Lebensdauer und der Frostanfälligkeit aber vor allem hinsichtlich der Blüte und der Reifezeit der Früchte (FRIEDRICH et al., 1978).

Unterlage für Birnen in Erwerbsanlagen ist in der Regel Quitte, während im Streuobstbau Sämlingsunterlagen Verwendung finden (BUNDESSORTENAMT, 2003). Die vegetativ vermehrten Reiser der Quitte sind die Sorten A und EM C, wobei EM C schwachwüchsiger als A ist. Quitte gilt als blühverfrühende Unterlage mit generell schwachem Wuchs und mag warmen, durchlüfteten Boden (AID, 2004). Um eventuelle Unverträglichkeiten zu vermeiden, gibt es Zwischenveredelungen mit bestimmten Birnensorten (BUNDESSORTENAMT, 2003; FRIEDRICH et al., 1978). Je nach Sorte beginnen veredelte Birnen nach drei bis sechs Jahren zu tragen und erreichen ihre volle Ertragskapazität acht Jahre nach der Pflanzung (BÜNEMANN, 2002).

### 1.5 Phasenwechsel bei Obstgehölzen

Alle Pflanzen durchlaufen eine sogenannte juvenile Phase bevor sie reproduktiv werden und Blüten ausbilden. Die Juvenilität ist definiert als der Zeitraum, in dem die Pflanze nicht zur Blüte gebracht werden kann (GOLDSCHMIDT und SAMACH, 2004).

Nach einer vegetativen (juvenilen) Phase gelangen Pflanzen in die generative (adulte) Phase. Der Übergang zwischen diesen beiden wird Transitionsphase (adulte, vegetative Phase) genannt (Abbildung 1). Dieser Übergang wird beeinflusst von endogenen und exogenen Faktoren, die den Wechsel im Sprossmeristem vom Blatt zur Entwicklung reproduktiver Organe fördern oder unterdrücken (HANKE et al., 2007).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Entwicklung von Gehölzen von juvenil zu adult. Basierend auf Untersuchungen von Apfelsämlingen (verändert nach HANKE et al., 2007)

Die juvenile Phase ist von Pflanze zu Pflanze unterschiedlich und so blühen Birnensämlinge erst nach 9 bis 10 Jahren (VISSER, 1964). Ein wesentlicher Bestandteil in der Züchtung an Obstgehölzen ist daher seit vielen Jahren die Verkürzung dieser juvenilen Phase, um früher Erträge erzielen zu können und die unproduktive Standzeit zu verkürzen. Alle Maßnahmen, die Blüte zu fördern oder auch zu verfrühen (z. B. über Gibberelline) wirken erst, wenn sich die Pflanzen in der Transitionsphase befinden (HANKE et al., 2007). Wann genau diese Übergangsphase erreicht ist, ist von Pflanze zu Pflanze unterschiedlich. Nach HANKE et al. (2007) liegt die Transitionsphase für Apfelsämlinge zwischen dem 77. und dem 122. Nodium.

### 1.6 Vermehrung von *Pyrus communis* Sorten über Langstecklinge

Eine Möglichkeit, sowohl die Produktionszeit als auch die juvenile Phase bei *Rosaceae* zu verkürzen, wurde bei SPETHMANN und HUHNS (2001) und SPETHMANN (2002) in der Stecklingsvermehrung über die Verwendung von Langstecklingen beschrieben. In Versuchen mit deutlich längeren Stecklingen als bisher üblich, konnten 1,5 bis über 2 Meter lange Ruten der Sorte *Rosa canina* 'Pfänders', die als Unterlage zur Anzucht von Stammrosen verwendet wird, bis zu 100 % problemlos bewurzelt und dadurch die Produktionszeit zur Herstellung von Stammrosen erheblich verkürzt werden. Bis dahin galten Stecklinge der Sorte 'Pfänders' als schwer bewurzelt und die Vermehrung erfolgte über Aussaat (SPETHMANN und HUHNS, 2001). Weitere Versuche mit langen Stecklingen (80 bis 100 cm) u.a. von Spitzahorn, Stieleiche, Ulme, Winterlinde, Hainbuche und Birne zeigten ebenso gute Bewurzelungsergebnisse (SPETHMANN, 2002 und 2003). An den Langstecklingen der Sorte *P. communis* 'Williams Christ' konnte neben den guten Bewurzelungsergebnissen zusätzlich eine bereits im ersten Frühjahr stattfindende Blüte beobachtet werden. Bei dem verwendeten Stecklingsmaterial handelte es sich um sogenannte Wasserreiser, und damit war diese Beobachtung sehr ungewöhnlich, da Wasserreiser am Baum keine Blüten ausbilden (MBABU und SPETHMANN, 2005; MEIER, 2004). Da die geernteten Reiser gut bewurzeln und auch nach kurzer Zeit Blüten bilden, verfügten sie sowohl über juvenile als auch reproduktive (adulte) Merkmale. SPETHMANN (2007) vermutet einen Phasenwechsel bei *Rosaceae* in der Vermehrung über Langstecklinge ähnlich wie beim Pfropfen auf eine schwachwachsende Unterlage. Senkrechte Triebe aus dem oberen Kronenbereich werden in der Praxis als nicht blühende Konkurrenztriebe, Räuber, Sommerschosse oder meist als Wasserreiser bezeichnet, die entfernt werden müssen. Eine große Anzahl Wasserreiser senkt die Belichtung im Inneren des Baumes um bis zu 50 % (TYMOSZUK et al., 1980). Ganz allgemein gilt, dass diese senkrechten Schosse zur Erziehung der Krone genutzt werden können. Wenn sie sich neigen oder waagrecht gebunden werden, können sie im 2. oder 3. Jahr ebenfalls Blüten bzw. Fruchtspieße ausbilden, und sie werden so zur Kronenerziehung genutzt (HILKENBÄUMER, 1964). Insbesondere die Architektur von Birnenbäumen ist gekennzeichnet durch kräftige, aufrechte Äste mit monopodialer Verzweigung vor der Blütenbildung (COSTES et al., 2003).

Abbildung 2a/b zeigt beispielhaft denselben Birnenbaum in unterschiedlichen Jahren. Gut zu erkennen ist die hohe Anzahl senkrechter Triebe (aus dem Vorjahr) im oberen Kronenbereich. Während der Vollblüte zeigten 2008 (entgegen der Literaturangaben) wenige senkrechte Schosse Blütenbildung (a, Pfeil), während 2011 keiner der Schosse eine Blüte aufwies (b).



**Abbildung 2: a) Birnenbaum in Vollblüte am 16.04.2008 mit Blüten an senkrechten Trieben (Pfeil) und b) am 13.04.2011 ohne Blüten an den senkrechten Trieben. Dargestellt ist jeweils derselbe Baum, die Sorte ist unbekannt.**

### **1.7 Stecklingsvermehrung von *Pyrus communis* Sorten**

Obstgehölze werden seit Jahrhunderten veredelt (Kapitel 1.4) und die Vermehrung von Birne auf eigener Wurzel ist heute eher ungewöhnlich. Obwohl es in den vergangenen Jahren viele Untersuchungen mit erfolgreicher Bewurzelung (z.T. > 90 %) an Birnenstecklingen gab (FADL und HARTMANN, 1967; HIGDON und WESTWOOD, 1963; GILLIAM et al., 1987), hat sich diese Vermehrungsform nicht durchgesetzt. Die Unverträglichkeiten zwischen Edelreis und Unterlage sind bei Birne nicht allgemein gültig, sondern stark standort- und sortenabhängig und in

vielen Fällen wurde durch eine Zwischenveredelung das Problem der Unverträglichkeit gelöst (MAC CÁRTHAIGH und HORNIG, 2000). Das ist vermutlich der Grund dafür, dass mit weiteren Vermehrungsformen nicht intensiv gearbeitet wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Vermehrung der verschiedenen *Pyrus* Sorten durch die Verwendung konventioneller und langer Stecklinge durchgeführt, und im weiteren Verlauf werden diese als Kurz- bzw. Langstecklinge bezeichnet.

In der konventionellen Stecklingsvermehrung verwendet man Stecklinge mit einer Länge von 5 bis 20 cm (SPETHMANN, 2003 und 2007). Der wichtigste Einflussfaktor bei der konventionellen Vermehrung über Stecklinge ist die Juvenilität der Mutterpflanze (SPETHMANN, 2000 und 2003). Die Altersgrenze einer erfolgreichen Vermehrung bei Gehölzen liegt zwischen 7 und 10 Jahren. Versuche mit verschiedenen Arten zeigten, dass Bewurzelungsrate, Hauptwurzelzahl, Höhenzuwachs und Vitalität der Stecklinge mit zunehmendem Alter der Mutterpflanze abnahmen, während der Anteil der kallusbildenden Stecklinge zunahm (SPETHMANN, 2000). Der tatsächliche Altersstatus des Reisers wird allerdings nicht nur durch das Alter der Mutterpflanze bedingt, sondern auch durch seine Position am Baum. Die juvenilsten Stecklinge mit der besten Bewurzelung sind immer an der Stammbasis zu finden (POWER et al., 1988; SPETHMANN, 2000).

Im Vergleich kurzer und langer Stecklinge von 40jährigen Mutterpflanzen bewurzelten Langstecklinge entgegen den Erwartungen signifikant besser als deren Kurzstecklinge (NGUYEN, 2006). Zudem konnte festgestellt werden, dass vertikale Langstecklinge, geerntet aus dem oberen Kronenbereich, besser bewurzelten als die von anderen Positionen am Baum (NGUYEN, 2006). In der Bewurzelung von Langstecklingen 15- und 40jähriger 'Williams Christ'- Mutterpflanzen gab es keine signifikanten Unterschiede (NGUYEN, 2006). Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass die bisher geltenden Parameter in der Bewurzelung der konventionellen Stecklingsvermehrung auf lange Stecklinge von alten Mutterpflanzen nur bedingt zutreffen. Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Stecklingsvermehrung ist der richtige Steckzeitpunkt. Dieser variiert je nach Gattung und kann vor oder nach der Blüte sowie während oder nach dem Austrieb liegen oder



auch bei unterschiedlichen Verholzungsgraden erfolgen (FADL und HARTMANN, 1967; SPETHMANN, 2000).

Versuche vergangener Jahre ergaben einen optimalen Stecktermin für Langstecklinge von Obstgehölzen um den 20. Juli (mündliche Angaben: W. HUHNS und W. SPETHMANN). Dieser Steckzeitpunkt ermöglicht es, die Ernte von Langstecklingen mit dem jährlichen Sommerschnitt zu verbinden und die geschnittenen Reiser für die Vermehrung zu nutzen. Der jährliche Sommerschnitt ist notwendig, um Konkurrenztriebe, die für den Ertrag nicht notwendig sind, zu entfernen, da sie dem Baum Nährstoffe und Licht entziehen (HILKENBÄUMER, 1964; TYMOSZUK et al., 1980).

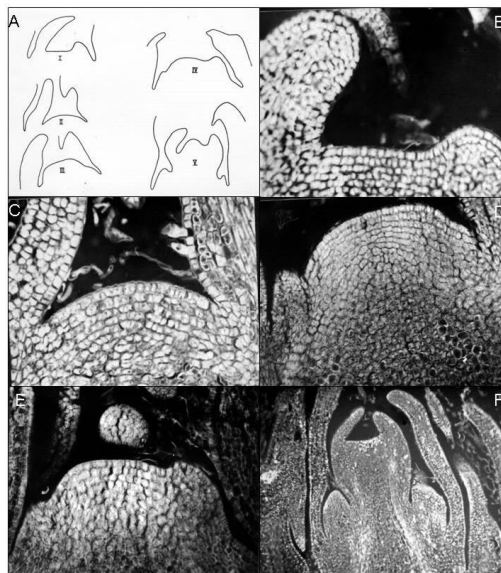
Die Vermehrung von Langstecklingen erfolgt an der Leibniz Universität Hannover in einem Folienhaus ausgestattet mit einem Hochdrucknebelsystem (Foganlage). Sowohl der Erntezeitpunkt der Stecklinge als auch die darauffolgende Bewurzelungsphase liegen mitten im Sommer, und so können die Lufttemperaturen im Folienhaus an heißen Tagen unter direkter Sonneneinstrahlung Temperaturen bis zu 50 °C erreichen. Durch den starken Nebel - erzeugt durch die Foganlage - erfolgt eine Verdunstungskühlung an den Pflanzen, und sie nehmen keinen Schaden. Krautige Pflanzen können maximal Temperaturen von 37 bis 41 °C ohne letale Folgen aushalten (SCHÖFFL und PANIKULANGARA, 2006). Durch die hohe Temperatur und die stets feuchte Luft treten keine Fungiziderkrankungen auf und weder die Substrat- noch die Lufttemperatur spielen eine große Rolle bei der Bewurzelung (SPETHMANN, 2000).

Die Zeitspanne, in der die Bewurzelung erfolgt, ist sehr kurz und kann durch Zugabe von Auxin an der Basis der Stecklinge beschleunigt werden. Innerhalb der ersten Tage kommt es zur Initiierung der Wurzeln (SPETHMANN und HAMZAH, 1988; GILLIAM et al., 1987; HARTMANN et al., 2001). Die Wurzeln können sich im gesamten Internodialbereich der Stecklinge entwickeln (SPETHMANN, 2000).

### 1.8 Blütenbildung an Apfel und Birne

Nach HILKENBÄUMER (1964) zählt die Birne zu den blühschwierigen Arten, da sie erst an mehrjährigen Trieben Blütenknospen bilden - als eine Ausnahme wird u.a. ‘Conference‘ genannt. FEUCHT (1982) dagegen beschreibt einjährige Langtriebe bei Birnen allgemein als leichtblühend und zwar endständig und seitlich (der Begriff Langtrieb meint hier alle Triebe länger als 25 cm). Die physiologische Umstimmung dauert etwa zwei bis drei Wochen und liegt zeitlich unmittelbar vor der morphologischen Blütenbildung, die dann bereits unter dem Mikroskop erkennbar ist (FEUCHT, 1982; HÄTTASCH, 2008). Die Blütenbildung an Apfel erfolgt immer zuerst in den terminalen Knospen und dann in den lateralen, während die Infloreszenz bei Birne von Jahr zu Jahr und auch von Trieb zu Trieb unterschiedlich ist: sowohl Seiten als auch Apikalmeristeme können zuerst blühen (ESUMI et al., 2005).

Die Blütendifferenzierung an Apfel wird nach HANKE (1981) in fünf Stadien unterschieden (Abbildung 3). Im vegetativen Zustand (Stadium I) ist das Meristem flach, danach kommt es zu einer halbkugeligen Wölbung der Apex-Oberfläche (Stadium II). Etwa ab Mitte Juli erfolgt der Beginn der reproduktiven Entwicklung, erkennbar als Pflöckmeristem, und eine morphologische Differenzierung beginnt (Stadium III). Ab Anfang August finden sich dann bereits Infloreszenzmeristeme (Stadien IV und V) (HANKE 1981, Abbildung 3A).



**Abbildung 3: Histologische Entwicklungsstadien vegetativer und reproduktiver Meristeme in Apfelknospen (HANKE 1981)**

**Schema über die einzelnen Stadien (I-V) der morphologischen Veränderungen von vegetativ zu generativ (A). I: Flaches, vegetatives (B) und II: vegetatives halbkugeliges Meristem (C).**

**III: Reproduktives Pflöckmeristem (D). IV-V: Infloreszenzmeristeme (E, F)**

Die Anlage der Blüte erfolgt bei Kernobst gleichzeitig mit der Fruchtbildung (FEUCHT, 1982; SCHUMACHER, 1989). Das bedeutet, dass bereits im Sommer des Vorjahres feststeht, welche Knospe im Frühjahr blüht und welche vegetativ bleibt. Die Blüteninduktion ist abhängig vom bestehenden Fruchtansatz, da eine starke Fruchtbildung die Blütenbildung hemmt und so die Alternanz fördert. Umwelteinflüsse oder extreme Eingriffe in der Blütendifferenzierung bestimmen dann über die Qualität der Blütenknospen (FEUCHT, 1982). Die Blüteninduktion an Kurztrieben von Apfel erfolgt etwa bis Mitte Juni und an den Langtrieben eher später, ist aber von Jahr zu Jahr unterschiedlich (HANKE, 1981). Bei Birne erfolgt die Blüteninduktion nach WEBSTER (2002) zuerst (im Juni/Juli) im Blütencluster an terminalen Enden der kurzen/mittellangen Austriebe, danach an den Ästen 2-jähriger oder älterer Hölzer. Bei CARRERA (1982) wird die darauffolgende Blütendifferenzierung an Birne von Mitte Juni bis Ende Juli angegeben. Die erste sichtbare Differenzierung beim Kernobst sind die Kelchblätter, die Ende Juli bis Anfang August angelegt sind (FEUCHT, 1982).

### **1.9 Beeinflussung der Blütenbildung**

Es gibt praktische Maßnahmen, die Blütenbildung zu fördern. Nach SCHUMACHER (1989) konkurrieren bei Obstbäumen Wachstum und Blütenbildung miteinander und Zweige von 1 bis 15 cm Länge sind die fruchtbarsten. In der Praxis werden Langtriebe daher waagrecht gebunden. Diese Maßnahme stört die natürliche Wuchsrichtung der Pflanze. Das Wachstum wird stark gehemmt, und es entstehen Seitentriebe, die den optimalen Triebblängenklassen angehören. Ohne Binden hätten die Langtriebe eine Länge erreicht, bei der nur ausnahmsweise Blüten entstanden wären. Die von den Blättern gebildeten Assimilate der nun gebundenen Triebe werden nicht mehr für das Wachstum gebraucht, sondern eingelagert. Auch WERTHEIM (2001), SANYAL und BANGERTH (1998) weisen darauf hin, dass horizontales Wachstum von Zweigen an Apfelbäumen die Blütenknospenbildung begünstigt. Maßnahmen, die Blüte zu fördern funktionieren nach HANKE et al. (2007) aber erst, wenn sich die Bäume bereits in der Transitionsphase befinden.

Der Vorgang der Blüteninduktion ist gerade bei Obstgehölzen von großer Bedeutung. Denn während einjährige, krautige Pflanzen in der reproduktiven Phase möglichst viele Blüten bilden (um viele Samen bilden zu können) erhält ein Baum den Hauptteil seiner Knospen im vegetativen Zustand aufrecht, und nur ein Teil der

Knospen bildet Blüten und schließlich Früchte (BANGERTH, 2009). Damit stellt sich auch die Frage, ob ein Baum überhaupt ein jährliches, anregendes Signal für die Blütenbildung braucht oder ob Gehölze nicht sowieso mit Erreichen der reproduktiven Phase ständig zur Blütenbildung induziert sind und die Knospen unter der Kontrolle eines Inhibitors stehen (GOLDSCHMIDT und SAMACH, 2004).

### **1.10 Blüteninduktion bei *Arabidopsis thaliana***

Die Blüteninduktion bei *A. thaliana* erfolgt über verschiedene komplexe Signalwege wie Vernalisation, Photoperiode, Gibberelline sowie autonome Signale (LEVY und DEAN, 1998; ZEEVAART, 2006). Das Zusammenspiel dieser Faktoren bestimmt die weitere Entwicklung des Sprossapikalmeristems, und der Übergang in ein Blütenmeristem wird über Blütenmeristem-Identitäts-Gene kontrolliert (SIMPSON und DEAN, 2002).

Hauptsächlich wird die Expression blühfördernder Gene bei *A. thaliana* über die Photoperiode (unter Langtagbedingungen) und Gibberellin (unter Kurztagbedingungen) beeinflusst. Während die Gibberellinbiosynthese die Transkripte fördert oder hemmt und somit direkt die Gene beeinflusst, wirkt die Photoperiode im Langtag über eine bestimmte Tageslänge auf die Blätter (TAIZ und ZEIGER, 2006; HANKE et al., 2007), und die Expression von *CONSTANS* (*CO*) wird aktiviert: das Gen *CO* unterliegt dem circadianen Rhythmus, und das Protein wird durch Licht stabilisiert. Überschneiden sich bei Abenddämmerung (nur unter Langtagbedingungen) die Expression des Gens und die Stabilität des Proteins, wird das Protein akkumuliert und eine Beschleunigung der Blütenbildung eingeleitet. *CO* induziert dann die Integratoren *FLOWERING LOCUS T* (*FT*), *LEAFY* (*LFY*) und *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC 1*) (PARCY, 2005).

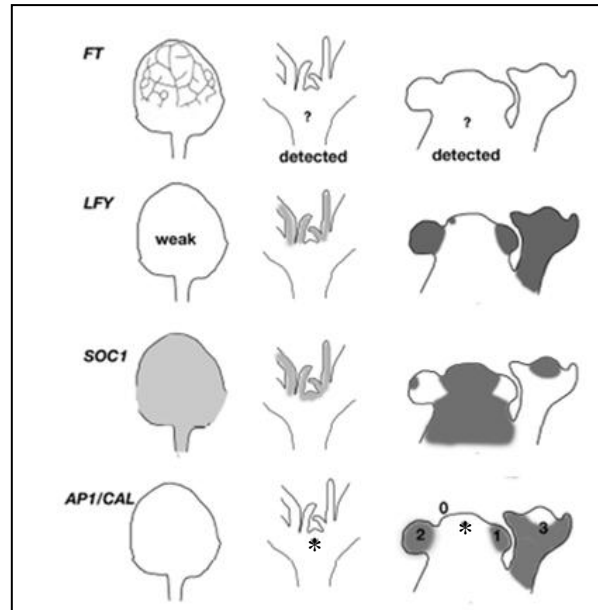
Das Protein *CO* aktiviert die Transkription von *FT* im Vaskulärsystem des Blattes und *FT* selbst kodiert ein Protein (*FT*), das dann im Meristem der Pflanze zusammen mit dem Transkriptionsfaktor *FD* (*FLOWERING LOCUS D*) das Blütenmeristemidentitätsgen *APETALA 1* (*AP 1*) aktiviert. Alle Vorgänge dieser Signalkette vom Blatt zum Meristem sind noch nicht erforscht, aber *FT* wird über das Phloem zum Meristem transportiert und ist vermutlich das langgesuchte ‘Florigen‘ (ZEEVAART, 2006; CORBESIER et al., 2007; GIAKOUNTIS und COUPLAND, 2008; ZEEVAART, 2008).

Die Festlegung der Blüte bei *A. thaliana* findet in Relation zur Veränderung in der Expression der Gene *LFY*, *AP 1* und *TERMINAL FLOWER 1 (TFL 1)* statt (HEMPEL et al., 1997 und 2000). Weil *LFY* und *AP 1* früh in der Blütenentwicklung exprimiert werden und kurz danach die Blüte induziert wird, werden sie auch als molekulare Marker während der Blüteninduktion bei *A. thaliana* genutzt (HEMPEL et al., 1997).

Das Gen *TFL 1* unterdrückt die Blütenbildung im Apex und verzögert den Übergang von der vegetativen zur reproduktiven Entwicklung. Die Überexpression von *TFL 1* erhöht die vegetative Wachstumsphase und hält die Infloreszenz aufrecht. *TFL 1* verzögert die Blüte durch die Repression einiger Gene, wie zum Beispiel von *LFY* und *AP 1* (LEVY und DEAN, 1998; HEMPEL et al., 2000; GIAKOUNTIS und COUPLAND, 2008). Damit gilt *TFL 1* als Repressor und Infloreszenzmeristem-Identitätsgen (HEB, 1999; HANKE et al., 2007). *LFY* und *TFL 1* werden auch als Identitäts-Gene und Blühzeitpunkts-Gene bezeichnet (HEB, 1999; PARCY, 2005; HANKE et al., 2007).

Abbildung 4 zeigt, dass sich Transkripte von *LFY* und *AP 1* an den Flanken des Meristems befinden, während sich *TFL 1* in der Mitte des Sprossapex befindet und *SOC 1* weit verbreitet im Meristem vorliegt (HEMPEL et al., 2000; PARCY, 2005 und CONTI und BRADLEY, 2007).

Es handelt sich sowohl bei *AP 1* als auch bei *SOC 1* um MADS-Box Gene (HEB, 1999; TAIZ und ZEIGER, 2006). Gene dieser Gruppe verfügen alle über ein konserviertes Sequenzmotiv das MADS-Box genannt wird (TAIZ und ZEIGER, 2006). Obwohl *FT* und *TFL* in unterschiedlicher Weise die Blühzeit regulieren, gehören sie zur selben Genfamilie (phosphatidylethanolamine-binding-protein, -PEBP-Familie). Wie das Protein von *FT* ist *TFL 1* mobil und wirkt an anderen Stellen, als die Expression stattfindet (KOBAYASHI et al., 1999; REMAY et al., 2009; CONTI und BRADLEY, 2007 und GIAKOUNTIS und COUPLAND, 2008).



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Verteilung der Expression von *FT*, *LFY*, *SOC 1* und *AP 1* im Blatt sowie im vegetativen und reproduktiven Sprossmeristem (von links nach rechts) an *Arabidopsis thaliana* (verändert nach PARCY, 2005). „Detected“ bedeutet, dass die Expression nachgewiesen wurde, aber die örtliche Lage ist noch nicht bekannt. Sternchen bezeichnet die Lage des Sprossapikalmeristems. Die Nummern geben die Stadien des Blütenmeristems an. *CAULIFLOWER (CAL)* ist *AP 1* sehr ähnlich.

An der Blüteninduktion sind sehr viel mehr Gene und Interaktionen zwischen Genen beteiligt (Abbildung 5). Gene können über unterschiedliche Signale aktiviert werden und dennoch miteinander interagieren. So reguliert Gibberellin sowohl die Expression von *SOC 1*, und unabhängig davon erhöht es die Transkription von *LFY* (HANKE et al., 2007). Und bei *SOC 1* laufen die verschiedenen Pfade der Blüteninduktion über Gibberellin, die Photoperiode und die autonome Entwicklung zusammen (MOON et al., 2003; JUNG und MÜLLER, 2010). In Abbildung 5 ist schematisch dargestellt, welche Interaktionen über welche Signalwege zwischen Genen stattfinden und es wird deutlich, dass *CO* über *FT* sowohl die Expression von *SOC 1* als auch von *AP 1* positiv reguliert während *TFL 1* die Expression der Gene *LFY* und *AP 1* hemmt.

Weiterhin ist das an der Blüteninduktion beteiligte Gen *AP 1* nicht nur ein Meristem-Identitäts-Gen, sondern auch ein Blütenorgan-Identitäts-Gen (HEB, 1999). Die Blütenorgan Identitäts Gene steuern die Ausbildung der einzelnen Blütenorgane und sind zu einem sogenannten ABC(DE)-Modell zusammengefasst (HEB, 1999; THEIBEN und BECKER, 2004). Dieses Modell wurde entwickelt, um gleichzeitige Aktivitäten von verschiedenen Genen besser veranschaulichen zu können. So ist *AP 1* ein Gen

der Klasse A was bedeutet, dass es für die Ausbildung von Kron- und Kelchblättern zuständig ist (HEB, 1999; TAIZ und ZEIGER, 2006). Es würde für die vorliegende Arbeit zu weit führen hier näher darauf einzugehen, aber es macht insgesamt deutlich um welchen umfassenden Komplex es sich bei der Blüteninduktion (und der späteren Differenzierung) handelt. Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf die an der Blüteninduktion von *A. thaliana* im Wesentlichen beteiligten Gene *AP 1*, *LFY 1*, *SOC 1* und *TFL 1* (HEMPEL et al., 2000; PARCY, 2005).

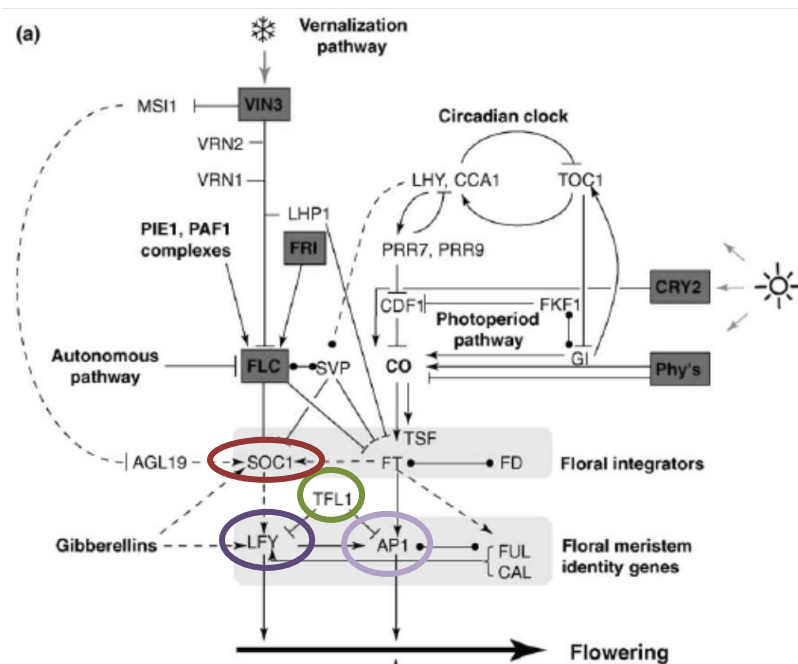


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genen in der Blütenregulierung und der Einflüsse von endogenen und exogenen Signalwirkungen an *Arabidopsis thaliana* (JUNG und MÜLLER, 2010). Negative und positive Wechselwirkungen sind mit Pfeilen dargestellt. Pfeile mit Spitze bedeuten fördernde, abgeflachte Pfeile bedeuten hemmende/unterdrückende Wechselwirkung. Gestrichelte Pfeile bedeuten spekulative Interaktionen Die farbig gekennzeichneten Gene wurden in dieser Arbeit an ‘Williams Christ’ untersucht.

### 1.11 Blüteninduktion bei Apfel und Birne

Bei der Blüteninduktion an Obstgehölzen spielen zum Teil ähnliche Gene wie bei *A. thaliana* eine Rolle. In Apfel und Birne wurden in den vergangenen Jahren homologe *AP 1*-, *SOC 1*- und *TFL 1*-Sequenzen nachgewiesen. Für *LFY* wurde ein Homolog gefunden: das *APPLE FLORICAULA* Gen (KOTODA und WADA, 2005; ESUMI et al., 2005; WADA et al., 2007). In Apfel und Birne wurden zwei Homologe von *TFL 1*, mit einer Übereinstimmung von 90 % auf Nukleinsäureebene, identifiziert (*TFL 1-1* und *TFL 1-2*). Ebenso wurden zwei Homologe von *LFY* mit bis zu über 99 % Identität nachgewiesen (*LFY 1* und *LFY 2*). Das Vorkommen solch ähnlicher Homologe ist auf den polyploiden Ursprung der *Maloideae* zurückzuführen (ESUMI et al., 2005; VELASCO et al., 2010).



### 1.12 Zielsetzung der Arbeit

Den Schwerpunkt in der vorliegenden Dissertation bildeten die Untersuchungen der Bewurzelung und der Blütenbildung an Langstecklingen der Birnensorte *P. communis* 'Williams Christ'. Ein Vergleich mit den Sorten 'Conference' und 'Vereins Dechant' sollte zeigen, ob diese ein ebensolches Bewurzelungs- und Blühverhalten wie die Stecklinge von 'Williams Christ' zeigten.

Folgende Aspekte sollten dabei berücksichtigt werden:

1. der mögliche Einfluss des Mutterpflanzenalters auf die Stecklinge
2. der Einfluss hoher Temperaturen während der Bewurzelungsphase als möglicher Faktor der Blüteninduktion

Hinsichtlich der Blüteninduktion sollten morphologische Untersuchungen und eine Genexpressionsanalyse Aufschluss darüber geben, ob es sich bei den Stecklingen um juvenile Triebe handelte, deren vegetative Knospen während der Vermehrungsphase zur Blütenbildung initiiert wurden oder ob die Knospen der Stecklinge bereits vor der Ernte in der generativen Phase waren. Dabei sollten

1. morphologische Veränderungen in den Knospenmeristemen von Langstecklingen und Trieben am Baum durch histologische Schnitte und
2. die Expression blühfördernder Gene (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1*, *APETALA 1* und *LEAFY 1*) und eines blühhemmenden Gens (*TERMINAL FLOWER 1*) in Knospen der Langstecklinge und Knospen von Trieben am Baum mittels quantitativer Real Time-PCR

exemplarisch für die Sorte 'Williams Christ' untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Bewurzelung und Blütenbildung in der Stecklingsvermehrung von *Pyrus communis* Sorten

#### 2.1.1 Stecklingsmaterial

In den Jahren 2005 bis 2008 wurden Kurz- und Langstecklinge der Sorten *P. communis* 'Williams Christ', 'Conference' und 'Vereins Dechant' verwendet. Die Sorten 'Williams Christ', 'Conference' und 'Vereins Dechant' wurden auf Quitte veredelt. Angaben über die Mutterpflanzen in den Versuchsjahren und die Stecklingsmenge finden sich in Tabelle 1. Bei den für die vorliegende Arbeit geernteten Langstecklingen handelte es sich um neue (diesjährige) senkrechte Triebe aus dem oberen Kronenbereich wie in Abbildung 6 dargestellt.



Abbildung 6: Typischer Wuchs senkrechter Triebe an *P. communis* 'Williams Christ' zum Zeitpunkt der Ernte

**Tabelle 1: Verwendung, Herkunft und Status der Mutterpflanzen von *Pyrus communis* in den Versuchsjahren sowie die Anzahl der Stecklinge. (Standort Karlsruhe/ Grünwettersbach; Wurzeln)**

	<i>Pyrus communis</i>			
Sorte	'Williams Christ' Karlsruhe	'Williams Christ' Wurzeln	'Conference'	'Vereins Dechant'
Versuchsjahr	2005 2008	2006 2007 2008	2007 2008	2007
Mutterpflanzenalter (in Jahren)	38 – 41	14 – 16	19 – 20	19
Standort	Grünwettersbach (Karlsruhe)	Prüfstelle BSA Wurzeln	Universitäts- gelände Ruthe	Universitäts- gelände Ruthe
Unterlage (Zwischen- veredelung)	Quitte A (Gellerts)	Quitte A (Gellerts)	Quitte, verschiedene	Quitte, verschiedene
Höhe Mutterpflanze	1,80 – 2,00 m			
Anzahl Kurzstecklinge	2005: 100 2008: 0	2006: 400 2007: 300 2008: 0	2007: 100 2008: 0	2007: 100
Anzahl Langstecklinge	2005: 100 2008: 425	2006: 400 2007: 300 2008: 425	2007: 100 2008: 425	2007: 100

Die Stecklinge wurden in 4-facher (2005-2006), 8-facher (2007) und 17-facher Wiederholung (2008) zu je 25 Stecklingen gesteckt. Der Transport der Stecklinge, die nicht vor Ort geerntet werden konnten, erfolgte in einem klimatisierten VW-Bus. Das Pflanzenmaterial 2005 wurde mit Wasser besprüht und anschließend in Plastiksäcken transportiert. Wegen Schäden an den Blättern (vermutlich verursacht infolge der hohen Temperaturen innerhalb der Säcke) erfolgte der Transport dann in loser Schüttung. Die Stecklinge wurden bewässert und mit nassen Laken umhüllt. Die Stecklinge wurden in den Jahren möglichst zeitnah zum Erntetermin gesteckt und im April des folgenden Jahres bonitiert (Tabelle 2).

Die Stecklinge von 'Williams Christ' wurden von zwei verschiedenen Erwerbsplantagen geerntet, um einen möglichen Einfluss des Mutterpflanzenalters zu untersuchen.

Die Behandlung der Stecklinge war in jedem Jahr gleich. Die Stecklinge wurden an der Basis entblättert, gerade angeschnitten und mit Bewurzelungspuder behandelt (Tabelle 3). Anschließend wurden die Stecklinge im Folienhaus mit Fog-System (s. Kapitel 2.1.2) in einem Torf-Sand Substrat in 12er Töpfe gesteckt (Tabelle 3). In den Jahren 2005 bis 2007 wurden nur Reiser verwendet, die das terminale Wachstum

bereits beendet hatten –das war erkennbar daran, ob die terminale Knospe bereits fertig ausgebildet war, oder noch grün und im Wachstum begriffen war. Im Versuchsjahr 2008 war dies aufgrund der hohen Probenzahl nicht möglich. Die Stecklinge, die zum Erntetermin das terminale Wachstum noch nicht abgeschlossen hatten, wurden gekennzeichnet und nicht für die morphologischen und molekulargenetischen Arbeiten verwendet.

**Tabelle 2: Ernte-, Steck-, und Boniturtermin aller Stecklinge in den Versuchsjahren (2005-2008)**

	Sorte	2005	2006	2007	2008
<b>Ernte/ Stecktermin</b>	‘Williams Christ’ Karlsruhe	18.07./ 20.07.	-	-	23.07./ 24.07.
	‘Williams Christ’ Wurzen	-	25.07./ 25.07.	24.07./ 25.07.	22.07./ 24.07.
	‘Conference’	-	-	25.07./ 25.07.	24.07./ 24.07.
	‘Vereins Dechant’	-	-	25.07./ 25.07.	-
<b>Bonitur</b>	alle Sorten	05.04.2006	13.04.2007	16.04.2008	16.04. 2009

**Tabelle 3: Behandlung der Stecklinge in den Versuchsjahren**

Behandlung	Substrat	Anzucht
Tauchen der Stecklingsbasis in Bewurzelungspuder: Wachstoffs IBS 0,5 % und Fungizid Euparen 10 %	Weißtorf/Sand 3:1 Osmocote plus 3-4M 2 kg/m <sup>3</sup> CaCO <sub>3</sub> pH 5,7	Folienhaus mit Fog-System alle Stecklinge in Töpfen

Vor dem Stecken wurde repräsentativ an 20 Stecklingen ihre Länge erfasst. Die Kurzstecklinge hatten 2005 und 2006 eine Länge von etwa 26 cm. Die Langstecklinge waren je nach Sorte und Jahr sehr unterschiedlich. In Tabelle 4 sind die Längenangaben der kürzesten und längsten Stecklinge angegeben.

**Tabelle 4: Durchschnittliche Länge der Langstecklinge zu Versuchsbeginn (gemittelter Wert von 20 Stecklingen) beziehungsweise Angaben über den Längenbereich, in dem sich die Stecklinge zu Versuchsbeginn befanden**

Sorte	mittlere Länge [cm]	Längenbereich [cm]	Länge [cm]	Längenbereich [cm]
	2005	2006	2007	2008
‘Williams Christ’ Karlsruhe	62	-	-	54-107
‘Williams Christ’ Wurzen	-	52-90	-	55-120
‘Conference’	-	-	-	36-92

### **2.1.2 Bewurzelung der Stecklinge im Folienhaus**

Die Stecklinge wurden in einem Filclair-Folienhaus, ausgestattet mit einem Hochdrucknebelsystem der Firma Plantfog, am Universitätsstandort in Ruthe kultiviert. Die Steckpläne finden sich im Anhang (A I).

Durch das Hochdrucknebelsystem konnte ein dichter schwebender Nebel erzeugt werden (Fog), und die Bewurzelung erfolgte bei nahezu 100 % relativer Luftfeuchte. Die Tropfengröße liegt nach Herstellerangaben bei 20 µm. Die Feuchtigkeit während der Bewurzelung wurde allein durch den Fog zur Verfügung gestellt, eine zusätzliche Bewässerung fand nicht statt. Neben der Befeuchtung diente der Nebel als Verdunstungskühlung, da im Sommer im Folienhaus häufig sehr hohe Lufttemperaturen (bis 50 °C) erreicht werden. Um die Luftfeuchtigkeit zu halten wurde das Folienhaus nicht gelüftet. Es erfolgte keine Temperaturregelung. Die Intervallschaltung der Hochdrucknebelanlage erfolgte alle 2-5 Minuten für 10-20 Sekunden, jeweils angepasst an die täglich wechselnden klimatischen Bedingungen.

Die Stecklinge wurden bis zur Bonitur im Folienhaus belassen. Das Hochdrucknebelsystem wurde mit Abnahme der Außentemperaturen (ab September) schrittweise herunter reguliert und spätestens Ende Oktober abgestellt, um die Pflanzen allmählich an die Witterungsbedingungen anzupassen. Im Anschluss erfolgte die Bewässerung nach Bedarf von Hand.

Das Folienhaus wurde im Winter nicht beheizt. Im Frühjahr 2006 wurde eine Wurzelbonitur durchgeführt (Abbildung 7). Je nach Bewurzelung und Kallusbildung wurden Noten von 2 bis 6 vergeben. Die Note 1 galt für unbewurzelte Stecklinge (Abbildung 7). Anschließend wurde von jedem Steckling die längste Hauptwurzel gemessen. Um das Weiterwachstum der Stecklinge zu ermöglichen, wurde dann in den darauffolgenden Jahren eine Ballenbonitur nach SPETHMANN (2000) durchgeführt (Tabelle 5). Hierbei wurde die Durchwurzelung des Ballens mit verschiedenen Noten (1 bis 4) beurteilt wie in Tabelle 5 dargestellt. Die Note 0 galt für unbewurzelte Stecklinge.

Zum Zeitpunkt der Ballenbonitur wurde ebenfalls die Blütenbildung an den Stecklingen bonitiert. Hierbei wurde die Blüte sowie ihre Position (Nodium) am Steckling erfasst. Die Ergebnisse der Blütenbildung werden gemeinsam mit den Bewurzelungsergebnissen in Kapitel 3.1 dargestellt. Abweichende Angaben der Gesamtmenge (n) der Stecklinge zwischen Versuchsstart und Bonitur ergeben sich durch Probennahmen für die molekulargenetischen und morphologischen Untersuchungen sowie durch Absterben einiger Stecklinge während der Bewurzelungsphase.

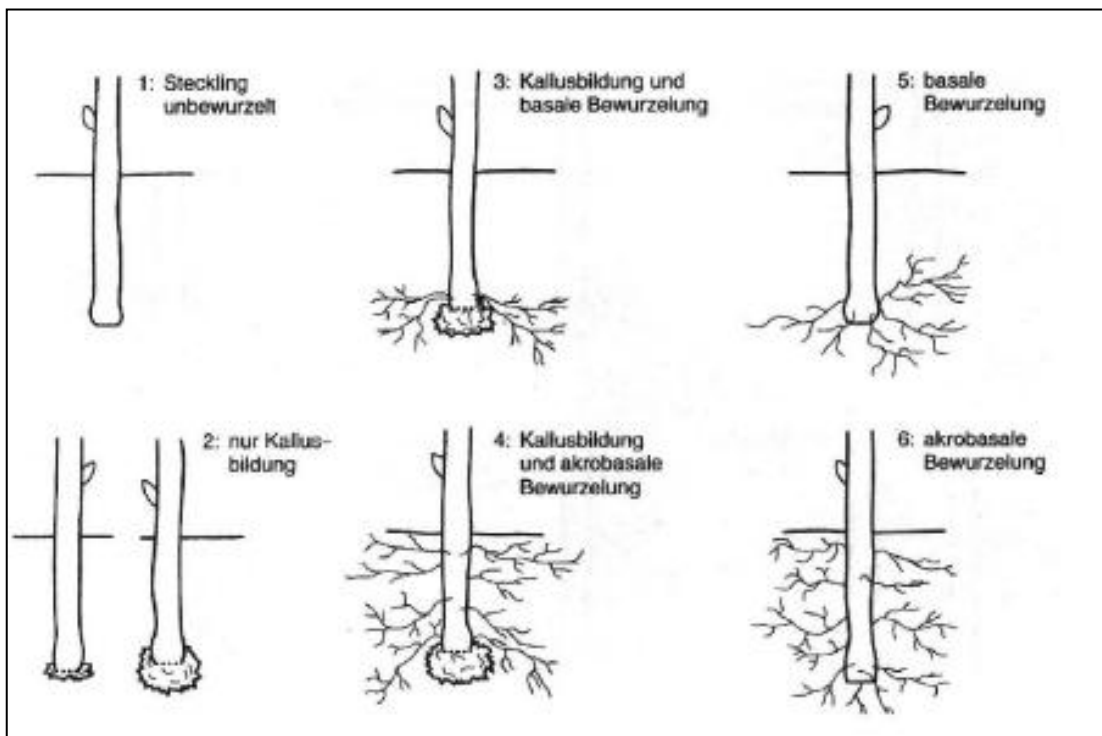







Abbildung 7: Boniturschema für die Bewurzelung im Topf/Grundbeet nach SPETHMANN (2000)

**Tabelle 5: Boniturschema für Topfstecklinge nach SPETHMANN (2000). Die Boniturnote erfolgt nach der Intensität der Bewurzelung des Topfballens**

<b>0</b>	unbewurzelt	
<b>1</b>	bewurzelt, keine Wurzeln sichtbar (Steckling lässt sich nicht aus Substrat herausziehen)	
<b>2</b>	bewurzelt, wenige Wurzeln sichtbar	
<b>3</b>	Ballen durchwurzelt	
<b>4</b>	Ballen stark durchwurzelt	

### 2.1.3 Bewurzelung der Stecklinge in der Klimakammer

Um zu überprüfen, ob die Blütenbildung eine Reaktion auf die hohen Lufttemperaturen - die im Fog erreicht werden können - war, wurden 2008 ebenfalls Stecklinge in einer Klimakammer unter kontrollierten Bedingungen (bei einer konstanten Temperatur von 28 °C) bewurzelt. Die Temperatur wurde im Zeitraum von 5:30 bis 10:00 Uhr von etwa 22 °C auf 28 °C hoch und abends von 21:30 bis 0:50 Uhr wieder auf 22 °C herunter reguliert. Die Beleuchtung wurde nachts ausgestellt und morgens etwa ab 5:00 Uhr beginnend, langsam bis auf die volle Intensität wieder eingeschaltet, um eine Kultur unter Langtagbedingungen zu simulieren.

Innerhalb der Klimakammer wurde eine Folienkammer mit Hochdrucknebelanlage so installiert, dass ein funktionierendes Vermehrungssystem - vergleichbar dem Folienhaus in Ruthe (s. Kapitel 2.1.2) - entstand (Abbildung 8).

Die Behandlung der Stecklinge und die Herstellung des Substrats erfolgten wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben. Die Stecklinge wurden nach der Bewurzelung Ende September ebenfalls nach Ruthe gebracht (um eine Gleichbehandlung der Stecklinge bei der Überwinterung zu sichern) und dort im darauffolgenden Frühjahr wie beschrieben bonitiert. Diese Stecklinge wurden nur hinsichtlich ihrer Blüte und Bewurzelung bonitiert, wie in Kapitel 2.2.2. beschrieben. Sie wurden nicht für die histologischen und molekulargenetischen Untersuchungen verwendet.



**Abbildung 8: Folienkammer mit Hochdrucknebelssystem innerhalb einer Klimakammer**

#### **2.1.4 Dokumentation der klimatischen Bedingungen**

Zur Erfassung der Temperatur und der Sonneneinstrahlung im Folienhaus wurden 2007 und 2008 im Pflanzenbestand an verschiedenen Stellen Temperaturfühler (drei auf Pflanzenhöhe und zwei im Substrat) sowie je ein Solarimeter im Pflanzenbestand und auf dem Dach installiert. Die Werte wurden mithilfe eines Dataloggers im 6-Minuten-Takt aufgezeichnet und regelmäßig ausgelesen. Die Auswertung der Daten konnte mit Excel durchgeführt werden. Die Temperaturwerte in der Klimakammer wurden 2008 ebenfalls in nach dieser Methode aufgezeichnet (drei Temperaturfühler im Pflanzenbestand, einer im Substrat).



Die Auswertung der Klimadaten lieferte Informationen über die Tagesmitteltemperatur (24h), die Temperatursumme, die Tagestemperatur, die Nachttemperatur, das Temperaturmaximum und -minimum pro Tag sowie der Sonneneinstrahlung. Die Messung der relativen Luftfeuchtigkeit im Fog erfolgte 2007 über eine kombinierte Feuchte-Temperatur-Sonde. Aufgrund der hohen Luftfeuchtigkeit (95-100 %) musste die Sonde wegen Defekts ständig repariert und ausgetauscht werden, so dass 2008 auf die Messung verzichtet wurde.

Alle verwendeten Messfühler sowie die Datalogger wurden freundlicherweise vom Fachgebiet Biosystem- und Gartenbautechnik der Leibniz Universität Hannover installiert und zur Verfügung gestellt.

### **2.1.5 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Freeware Programm R (Version 2.10.0)<sup>1</sup> durchgeführt. Zur statistischen Bewertung der Bewurzelung wurde ein nicht parametrischer Test ( $X^2$ -Homogenitätstest) zur Bearbeitung dichotomer Daten verwendet, mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$ . Für die statistische Auswertung der Wurzellänge wurde einer Rang-Varianz-Analyse für ungleiche Varianzen und einer Fehlerwahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  durchgeführt.

Die Daten, die auf Grund zu geringer Fallzahlen nicht statistisch ausgewertet werden konnten, wurden mit Hilfe des Programms Excel in einem Säulendiagramm dargestellt. Dies gilt auch für die Daten der Boniturnoten der Bewurzelung.

---

<sup>1</sup> <http://www.r-project.org/>

## 2.2 Histologische Untersuchungen zur Blütendifferenzierung an ‘Williams Christ‘

Um zu ermitteln, ab wann die Blütendifferenzierung in den Knospen der Langstecklinge von ‘Williams Christ‘ begann, wurden mit Versuchsbeginn und dann wöchentlich Knospen von den Stecklingen im Folienhaus geerntet, fixiert und in Kunstharz eingebettet, um histologische Dünnschnitte durchführen zu können.

### 2.2.1 Einbetten und Schneiden der Knospen

Die Knospen wurden vom Erntetermin der Stecklinge und danach wöchentlich geerntet und fixiert. Die Fixierung der Knospen erfolgte in FPA-Lösung, welche die Knospen in ihrem jeweiligen Zustand konservierte (Tabelle 6). Die Knospen konnten in FPA beliebig lange gelagert werden. Zur Einbettung der Knospen wurde das Historesin Embedding Kit der Firma Leica verwendet und die Behandlung erfolgte nach einem von M. Neumüller (TU München/ Dürnast) erstellten Protokoll (Tabelle 7 und Tabelle 8).

**Tabelle 6: Zusammensetzung einer 70 %-FPA-Lösung zur Fixierung von Knospen (nach M. Neumüller, TU München/ Dürnast)**

<b>FPA</b>	<b>70%</b>
Formaldehyd (35%)	125 ml
Propionsäure	125 ml
Aqua dest.	610 ml
EtOH (96%)	1640 ml
pH 4-5	

**Tabelle 7: Komponenten und Lösungen zur Einbettung in Historessin (Leica)**

Komponente	Chemische Spezifikation	Lösung (aus den Komponenten)
1	Basic Resin: Glycolmethacrylat (GMA), 50 ml	A
2	Aktivator: Dibenzolperoxid, 0,5 g	B = 1+2
3	Härter: nicht genannt, 1 ml auf 15 ml	C = 1+2+3

**Tabelle 8: Behandlung der Knospen zur Einbettung in Kunstharz**

Tag	Lösung	Behandlung
1	FPA	1 h unter Vakuum setzen, Exsikkator lüften, Vakuum wiederholen, lüften, über Nacht schütteln
2	70 % EtOH	über Nacht schütteln
3	90 % EtOH	2 h unter Vakuum setzen, lüften, über Nacht schütteln
4	96 % EtOH	über Nacht schütteln
5	B + 99 % EtOH (1:1)	2 h schütteln
	B	2 h schütteln
	B	2 h unter Vakuum setzen
	C	Einbetten der Knospen in Einbettmulden

Die Fixierung der Knospen sowie die Lagerung in den verschiedenen konzentrierten EtOH-Lösungen (Tabelle 8) sorgten dafür, dass Hohlräume bzw. mit Gewebewasser ausgefüllte Poren dehydriert und mit EtOH gefüllt wurden, um dem später zugefügten Kunstharz (Lösungen B und C) ein besseres Einfließen zu ermöglichen. Somit sollten Luftblasen im Pflanzenmaterial vermieden werden.

Die Polymerisation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur, anschließend konnten die Harzblöcke mit den darin befindlichen Knospen an kleinen Holzklötzen festgeklebt werden. Dies diente zur besseren Einspannung in das Mikrotom.

Die Schnitte wurden in Längsrichtung an dem Mikrotom Hydrax (Zeiss) in einer Schnittdicke von 8 µm durchgeführt. Die Schnitte wurden zur besseren Unterscheidung der Zellschichten mit einer 0,05 %igen Toluidinblaulösung eingefärbt und anschließend zur längeren Lagerung unter einem Deckglas versiegelt.

Für 'Williams Christ' wurden insgesamt 504 Knospen eingebettet, wovon 137 geschnitten wurden und 72 tatsächlich ausgewertet werden konnten. Pro Knospe wurden durchschnittlich etwa 100 Schnitte aufgelegt, um die Mitte des Meristems zu finden und zu vermessen. Die Höhe der verworfenen Knospen erklärt sich durch Luftblasen im Kunstharz, die zum Ausbrechen des Materials führten. Die Schichten der Blattprimordien lagen so dicht übereinander, dass sowohl Entwässerung als auch Entlüftung sehr schwierig waren. Ein weiterer Grund war, dass die Mitte des Meristems nicht mit Sicherheit bestimmt werden konnte.

### **2.2.2 Mikroskopie**

Die Objektträger wurden an dem Axioscope A1(Zeiss) in 25-, 100- bzw. 400facher Vergrößerung ausgewertet. Die Fotodokumentation erfolgte mit der Axio Cam MRc (Zeiss) und die Auswertung bzw. Vermessung mit dem Programm AxioVision 4.7. Die Meristeme wurden zwischen den Blattprimordien in ihrer Breite ( $\mu\text{m}$ ) gemessen und senkrecht zu dieser Vermessungslinie wurde die Höhe des Apex ( $\mu\text{m}$ ) gemessen.

### **2.2.3 Statistische Auswertung**

Eine statistische Untersuchung dieser Daten fand aufgrund der geringen auswertbaren Stichprobenzahl nicht statt.

### **2.3 Molekulargenetische Untersuchungen zur Blüteninduktion an *Pyrus communis* Sorten**

Während der Kultur der Stecklinge wurden 2007 und 2008 in wöchentlichen Abständen Knospen geerntet und zuerst in flüssigem Stickstoff, anschließend im Tiefkühlschrank bei etwa -80°C gelagert. Die Knospen wurden immer um dieselbe Tageszeit (zwischen 9:00 bis 9:30 Uhr) geerntet. Aufgrund der Boniturergebnisse der Blütenbildung (siehe Kapitel 2.3.2.) wurde Blütenbildung im oberen Bereich der Stecklinge vermutet. Neben der apikalen Knospe wurden die Seitenknospen der Positionen 2 bis 7 geerntet. Da die Genexpression im Bereich der Meristeme der Knospen untersucht werden sollte, wurden die Knospen vorsichtig entblättert, um das Meristem möglichst freizulegen. Zu jedem Zeitpunkt/jeder Variante wurde die RNA getrennt aus den geernteten Knospen isoliert. Die verwendeten Geräte und Materialien finden sich aufgelistet im Anhang (Tabelle A1).

### 2.3.1 Extraktion von Nukleinsäuren

Die Isolation der Gesamt-RNA aus den Knospen der verschiedenen Birnensorten wurde mit dem Invisorb<sup>®</sup> Spin Plant RNA Mini Kit nach den Anweisungen des Herstellers (Fa. Invitex) durchgeführt (Tabelle 9). Die RNA wurde aus den einzelnen Knospen extrahiert. Es wurden keine Mischproben verwendet. Die Frischmasse nach dem Entblättern der Knospen lag zwischen 0,4 und 35,4 mg.

**Tabelle 9: Arbeitsanweisung zur Extraktion pflanzlicher RNA (Invisorb<sup>®</sup> Spin Plant RNA Mini Kit der Firma Invitex)**

Mörsern der Knospen und sofortige Zugabe von 900 µl Lysis Solution RP
Sofort vortexen und ~20 min. bei Raumtemperatur schütteln (240 x g)
1 min. bei 12.000 x g zentrifugieren
Überstand auf Prefilter pipettieren und 1 min. bei 12.000 x g zentrifugieren; Filtrat in neues Gefäß pipettieren
Zugabe von 500 µl Ethanol (99,8%)
Das Gemisch auf RNA Binding Filter pipettieren; 1 min. bei 12.000 x g zentrifugieren und Durchfluss verwerfen
Zusätzlicher Arbeitsschritt zum DNA-Verdau: 5 µl DNase (1 U/µl) mit 95 µl DNase-Puffer (10 mM Tris-HCl, 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,5 mM CaCl <sub>2</sub> ; pH 7,6) mischen und auf die Membran des RNA Binding Filter pipettieren; 15 min. bei Raumtemperatur stehen lassen.
500 µl des Waschpuffers R1 auf die Membran pipettieren und 30 sek. bei 12.000 x g zentrifugieren; Durchfluss verwerfen
600 µl des Waschpuffers R2 auf die Membran pipettieren und 30 sek. bei 12.000 x g zentrifugieren; Durchfluss verwerfen (dieser Vorgang wird wiederholt)
3 min. Trocknen der Membran bei 14.500 x g
RNA Binding Filter auf ein 1,5 ml Eppendorfgefäß stellen und 50 µl Elution-Buffer R auf Filter pipettieren; 5 min. bei Raumtemperatur inkubieren und danach 1 min. bei 12.000 x g zentrifugieren; das Filtrat enthält die RNA

DNA wurde aus Blattmaterial von 'Williams Christ' nach dem modifizierten Protokoll von DOYLE und DOYLE (1990) isoliert (Tabelle 10).

**Tabelle 10: Arbeitsanweisung zur Extraktion pflanzlicher DNA (modifiziert nach DOYLE und DOYLE, 1990)**

Mörsern von 1-2 g Blattmaterial in flüssigem Stickstoff
Zugabe von 5 ml CTAB-Puffer + 0,2 % Mercapto-EtOH (3 % CTAB; 1,4 M NaCl; 0,2 % $\beta$ -Mercapto-EtOH; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8.0; 0,5 % PVP-40) vorgewärmt auf 60 °C
30 min. bei 60 °C (Wasserbad) inkubieren
5 ml CI-Mix (24:1 Chloroform + iso-Amylalkohol) dazugeben und schwenken (Abzug)
10 min zentrifugieren (höchste Stufe) und obere Phase abnehmen und in neues Reaktionsgefäß geben (ist die Lösung noch nicht klar, erneut Zugabe von CI-Mix und zentrifugieren)
Zugabe von 2/3 des Probevolumens eiskaltes Isopropanol; schwenken
5 min bei 4000 rpm zentrifugieren; Überstand abgießen
10 ml Waschpuffer (76 % (v/v) EtOH; 10 mM Ammoniumacetat) vorsichtig auf Pellet geben; Pellet 10-20 min in Puffer inkubieren (schwimmen lassen)
8 min bei 4000rpm zentrifugieren; Puffer abgießen
kurz zentrifugieren und Pellet bei Raumtemperatur komplett trocknen lassen
Zugabe von 3 ml TE-Puffer + RNase (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, 10 $\mu$ g/ml RNaseA); Pellet bei 37 °C komplett lösen (> 30 min)
1 ml 7,5 M $\text{NH}_4\text{Ac}$ dazu pipettieren, schwenken und Zugabe von 8 ml kaltem EtOH abs.
10-20 min bei 4000 rpm zentrifugieren; Überstand abgießen
Pellet bei 37 °C trocknen lassen (1 bis 1,5 Stunden)
Pellet in 500 $\mu$ l 10 mM Tris-Puffer aufnehmen und über Nacht im Kühlschrank lösen lassen

### 2.3.2 Agarosegelelektrophorese und Geldokumentation

Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte durch eine Gelelektrophorese mit einem 1,5%igem Agarosegel.

Die Agarose wurde mit einem 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris-base Ultra, 1 mM EDTA, pH 8.0) aufgekocht. Zum Anfärben der Nukleinsäuren wurden dem Gemisch 0,3 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) zugegeben.

Die Proben wurden mit einem 10%igem Anteil des Ladepuffers 'Orange G' (30 % Glycerin, 0,25 % Orange G) beschwert und pipettiert. Die anschließende Elektrophorese erfolgte bei 2-3 V/cm bis zur gewünschten Auftrennung der Proben. Zur Fotodokumentation und Auswertung wurden der BioDocAnalyse-Transilluminator und die Software BioDocAnalyse 2.0 der Firma Biometra verwendet.

### 2.3.3 RNA und DNA Quantifizierung

Die Quantifizierung der Nukleinsäuregehalte erfolgte über eine Photometermessung mit dem Nanodrop der Firma Peqlab und zusätzlich wurden die Proben zur Quantifizierung auf ein Gel aufgetragen. Die Kontamination auf DNA in den RNA-Extrakten wurde mit allen Proben über eine PCR mit einem Elongationsfaktor aus *Malus x domestica* überprüft (Tabelle 11) und auf ein Gel aufgetragen. Die Bindungsstelle der Primer befand sich im Intron und bei Nichterscheinen von Banden, wurde die Reinheit der RNA vorausgesetzt. Die Primer wurde freundlicherweise von dem JKI in Pillnitz/ Dresden durch H. Flachowsky zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 11: Elongationsfaktor aus *Malus x domestica***

Name	Zielgen	Primersequenz von 5' in 3' Richtung	Annealing- temperatur [°C]	Produkt- größe
MdEF_1alpha	Elongations- faktor	sense: TAC TGG AAC ATC ACA GGC TGA C antisense: TGG ACC TCT CAA TCA TGT TGT C	60,0	307bp



### 2.3.4 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem First Strand cDNA-Synthese Kit der Firma Fermentas (Tabelle 12). Für jede Probe wurde die erforderliche Menge ( $\mu\text{l}$ ) für 0,2  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA eingesetzt um 200 ng cDNA zu erhalten.

**Tabelle 12: Arbeitsanweisung zur cDNA-Synthese mit dem cDNA-Synthese Kit der Firma Fermentas**

Jeder Probe wird 1 $\mu\text{l}$ Hexamer Primer zugesetzt und bis 11 $\mu\text{l}$ mit superdest. $\text{H}_2\text{O}$ aufgefüllt; die Zugabe der Probe muss jeweils berechnet werden und ist abhängig von ihrem RNA-Gehalt (um 200 ng cDNA zu erhalten)
5 min bei 70 °C
Zugabe von 4 $\mu\text{l}$ 5 x Puffer, 2 $\mu\text{l}$ 10mM dNTP-Mix, 1 $\mu\text{l}$ Ribonuklease Inhibitor (20u/ $\mu\text{l}$ )
5 min bei 25 °C
Zugabe von 2 $\mu\text{l}$ M-MuLV Reverse Transkriptase (20u/ $\mu\text{l}$ )
10 min bei 25 °C, 60 min bei 37 °C, 10 min bei 70 °C

### 2.3.5 Polymerase Kettenreaktion

Dem Master Mix wurde zusätzlich Bovin Serum Albumin (BSA) zugefügt (Tabelle 13), da BSA den Erfolg einer PCR -besonders bei Templates mit geringer Ausbeute-erhöht. Durch BSA erfolgt eine Stabilisierung der Enzyme und es schützt ebenso vor einer Adhäsion der Enzyme an Reaktionsgefäßen oder Spitzen (Angabe Sicherheitsdatenblatt Appllichem).

**Tabelle 13: Pipettierschema für die PCR**

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonz. in der Reaktion
<b>Master-Mix</b>		
10 x Williams Puffer (100 mM Tris; 500 mM KCL; 20 mM $\text{MgCl}_2$ ; 0,01 % Gelatine )	1 $\mu\text{l}$	1x
2 mM dNTP-Mix	1 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{M}$ pro dNTP
Firepol Taq [5 U/ $\mu\text{l}$ , Solis Biodyne]	0,3 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{M}$
0,2 mg/ml BSA	2 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{M}$
Primer sense + antisense [2,5 $\mu\text{M}$ ]	1 $\mu\text{l}$	0,25 $\mu\text{M}$
	<b>Endvolumen</b>	
nach Zugabe von Rnase-freiem Wasser und 1 $\mu\text{l}$ RNA	10 $\mu\text{l}$	-

Die PCR erfolgte in dem Gerät T3 der Firma Biometra. Nach der Amplifikation wurden die Proben mit einem Zehntel des Volumens Orange-G-Ladepuffer (30 % Glycerin; 0,25 % Orange G) versetzt und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen. Zusätzlich wurden 4 µl eines 100 bp DNA-Längenmarkers in eine Geltasche pipettiert (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas).

**Tabelle 14: Thermocycler-Programm zur Durchführung der PCR**

<b>Vorgang</b>	<b>Dauer</b>	<b>Temperatur</b>
Initialer PCR-Aktivierungsschritt	5 min	95 °C
Drei-Schritt-Zyklus		
Denaturierung	45 sek.	94 °C
Annealing	45 sek.	60 °C (alle Primer)
Extension	1 min	72 °C
Zyklenzahl	35	
Extension	5 min	72 °C

### 2.3.6 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Die Real-Time PCR erfolgte in 0,1 ml Reaktionsgefäßen in dem Gerät Rotor Gene 3000 (Corbett). Jede Probe wurde in zweifacher technischer Wiederholung (Protokoll in Tabelle 15) durchgeführt. Verwendet wurde das Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix-UDG with Rox Kit der Firma Invitrogen (Tabelle 16). Die Quantifizierung der Gene wurde mit den in Tabelle 19 aufgeführten Verdünnungen der cDNA durchgeführt.

**Tabelle 15: Thermocycler-Programm zur Durchführung der qRT-PCR**

Vorgang	Dauer	Temperatur
Initialer PCR-Aktivierungsschritt	5 min	95 °C
Drei-Schritt-Zyklus		
Denaturierung	20 sek.	94 °C
Annealing	20 sek.	60 °C bzw. 61 °C
Extension	30 sek.	72 °C
Zyklenzahl	40	

**Tabelle 16: Pipettierschema für die qRT-PCR**

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonz. in der Reaktion
<b>Master-Mix</b>		
Puffer (Ready to use Mix)	10 µl	-
Primer sense + antisense [10 µM je Primer]	0,8 µl	400 nM
H <sub>2</sub> O	7,2 µl	-
Template	2 µl	20 ng
	<b>Endvolumen</b>	
nach Zugabe von Rnase-freiem Wasser und 1 µl RNA	20 µl	-

### 2.3.7 Ableitung und Design der verwendeten Primer

Die Primer für die qRT-PCR (Tabelle 17) wurden mit den Programmen GeneRunner und Clone9 (als Freeware/ Demoverionen aus dem Internet) auf ihren GC-Gehalt und auf Primer-Dimer-Bildung überprüft. Je nach Herkunft der abgeleiteten Primer wird vor den Namen *Md* für *Malus x domestica* bzw. *Pc* für *Pyrus communis* gesetzt. Die gesamte Sequenz der Zielgene sowie die Akzessionsnummern befinden sich im Anhang (A III).

**Tabelle 17: Sequenzen, Produktgröße und Annealingtemperatur der für die qRT-PCR verwendeten sense- und antisense Primer für ‘Williams Christ’ (WC) und ‘Conference’ (Con)**

Name	Zielgen	Primersequenz von 5' in 3' Richtung	Annealing [°C]		abgeleitet aus	Produkt- größe
			WC	Con		
<i>MdSOC 1</i>	<i>SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1</i>	sense TGAAGAGTGTGTGCGAAGC antisense TGCCACCTCAGAACTCATG	61	61	<i>Malus</i> x <i>domestica</i>	146 bp
<i>PcTFL 1-1</i>	<i>TERMINAL FLOWER 1</i>	sense CACCAAGCTAGTCTGCAATG antisense CTGTGGTGCCTGGAATGTCTG	60	60	<i>Pyrus</i> <i>communis</i>	194 bp
<i>MdAP 1</i>	<i>APETALA 1</i>	sense GAACAAGATCAACAGGCAGG antisense CAAGGATTTGCTCCATACATG	60	59	<i>Malus</i> x <i>domestica</i>	167 bp
<i>PcAFL 1-1</i>	<i>APPLE FLORICAULA 1</i>	sense GTCCAACCAAGGTGACAAAC antisense GGGCGTAGCAGTGCACATAG	60	60	<i>Pyrus</i> <i>communis</i>	102 bp
<i>PcACTIN</i>	$\beta$ -ACTIN	sense GGTGATGAAGCACAGTCGAA antisense CATACATGGCAGGCACATTG	61	61	<i>Pyrus</i> <i>communis</i>	238 bp

### 2.3.8 Sequenzierung der amplifizierten Produkte

Die Sequenzierung der für die qRT-PCR verwendeten Sequenzen von *PcAFL* 1-1, *PcTFL* 1-1, *MdAP* 1 und *MdSOC* 1 erfolgte durch die Firma SeqLAB. Hierzu wurde jeweils eine PCR-Reaktion mit den Primern (Tabelle 17) angesetzt und anschließend auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen. Die DNA-Extraktion erfolgte aus dem Agarosegel mit dem Kit NucleoSpin®Extract II (Tabelle 18). Die Proben und die Primer wurden von der Firma SeqLAB sequenziert, und das Ergebnis wurde elektronisch übermittelt. Die Ergebnisse der Sequenzierung finden sich im Anhang (Kapitel AIV).

**Tabelle 18: Arbeitsanweisung zur DNA-Extraktion aus einem Agarosegel (Kit NucleoSpin®Extract II von Macherey-Nagel)**

Ausschneiden des DNA Fragmentes aus dem Gel und Zugabe von 200 µl Puffer pro 100 mg Gel
Inkubieren der Probe bei 50 °C; etwa 10 min., bis zur völligen Auflösung des Gels
Pipettieren der Probe auf DNA bindenden Filter und Zentrifugieren bei 11000 x g (1 min)
Waschen der Membran durch Zugabe von 700 µl Waschpuffer und Zentrifugieren (1 min, 11000 x g), Vorgang wird wiederholt
Zugabe von 250 µl Waschpuffer und Trocknen der Membran bei 11000 x g, 5 min.
Durch Zugabe von 15 µl vorgewärmtem Elutions Puffer (70 °C) und Zentrifugieren (1 min, 11000 x g) Lösen der DNA aus Membran (Vorgang wiederholen)

### 2.3.9 Berechnung der Ergebnisse aus der qRT-PCR

Mittels einer Verdünnungsreihe jedes Primerpaares wurde die Primereffizienz (Tabelle 19) mit dem Programm Rotor Gene 6 (Corbett 3000) berechnet, die dann für alle weiteren Schwellenwerte (Ct-Werte) zur Berechnung herangezogen wurde. Idealerweise liegt die Effizienz eines Primerpaares bei 100 %, was aber in der Praxis kaum vorkommt. Gute Reaktionen werden erreicht, wenn die Effizienz eines Primers zwischen 90 - 110 % liegt (PFAFFL, 2004).

**Tabelle 19: Effizienz der verwendeten Primerpaare und die eingesetzte Verdünnung der Templates in der qRT-PCR**

Primerpaar	Effizienz		Verdünnung
	‘Williams Christ‘	‘Conference‘	
<i>PcACTIN</i>	1,07	0,88	1:100
<i>MdAP 1</i>	0,90	0,84	unverdünnt
<i>PcAFL 1-1</i>	0,97	0,75	1:10
<i>MdSOC 1</i>	0,99	1,0	1:10
<i>PcTFL 1-1</i>	0,97	0,78	unverdünnt

Die relative Quantifizierung der mRNA wurde mit einer Methode durchgeführt, die sowohl die Effizienz (E) der Primerpaare berücksichtigt als auch die Normalisierung über ein Referenzgen (Ref) ermöglicht. Jeder Ct-Wert eines Gens wurde gegen den jeweiligen Mittelwert vom Zeitpunkt Null (T0) berechnet und gegen ein Referenzgen (hier:  $\beta$ -ACTIN) normalisiert.

$$Expressionsrate = \frac{\left(1 + E_{Gen}^{(MWCt0_{Gen} - Ct_{Gen})}\right)}{\left(1 + E_{Ref}^{(MWCt0_{Ref} - Ct_{Ref})}\right)} \quad (\text{verändert nach PFAFFL, 2004})$$

Zur Auswertung wurden nur die Ct-Werte herangezogen, die in zweifacher technischer Wiederholung vorlagen.

### 2.3.10 Statistische Auswertung

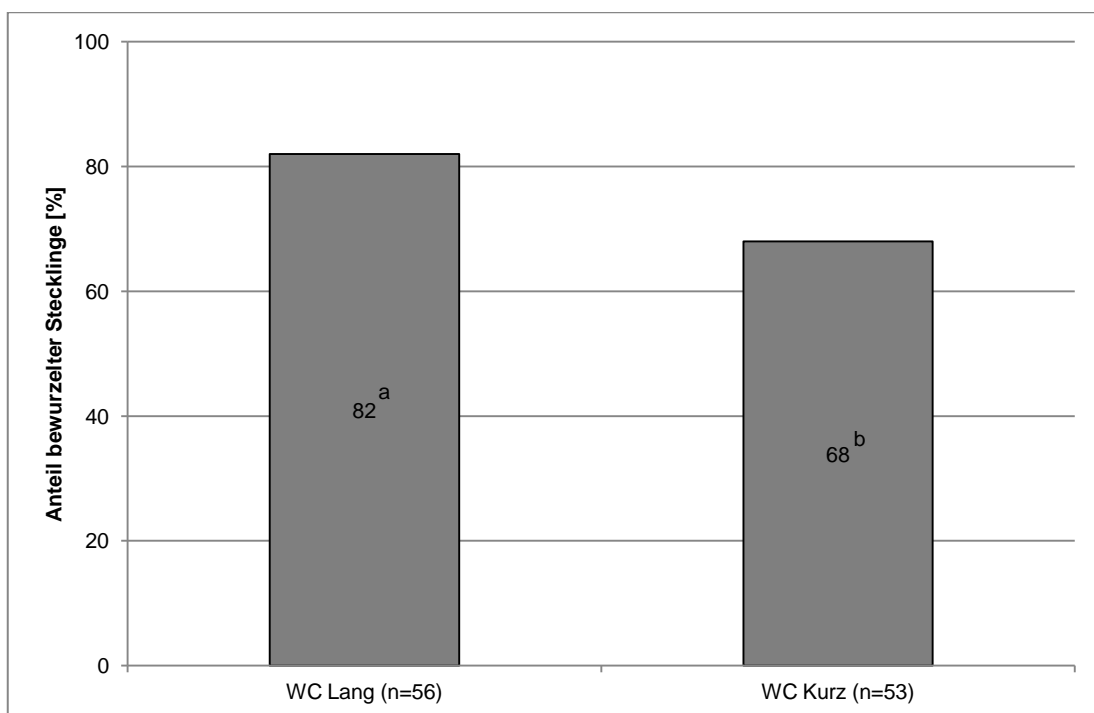
Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Freeware Programm R (Version 2.10.0) durchgeführt. Für die statistische Auswertung der relativen Genexpressionsraten wurde ein Lineares Modell mit Mittelwertsunterschieden zwischen den Zeitpunkten und den Knospenpositionen durchgeführt. Darauf aufbauend wurden in einem Tukey-Test paarweise Mittelwertsvergleiche zwischen den Zeitpunkten eines Gens durchgeführt, mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$ . Mittelwertsvergleiche ermöglichen es, die Restvarianz um mögliche Unterschiede zwischen den Knospenpositionen zu korrigieren. Bei Vorlage von signifikanten Unterschieden wurden die Werte mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Bewurzelung und Blütenbildung von *Pyrus communis* Sorten

##### 3.1.1 Bewurzelung

Die Bonitur der Bewurzelung wurde in jedem Jahr gemeinsam mit der Blütenbonitur (nach der Überwinterung) im April durchgeführt. Das verwendete Stecklingsmaterial 2005 und 2006 waren Kurz- und Langstecklinge von *P. communis* 'Williams Christ' (Tabelle 1). Im Jahr 2005 zeigten die Kurzstecklinge von 'Williams Christ' mit 68 % Bewurzelung signifikant geringere Bewurzelungsprozente im Vergleich zu den Langstecklingen mit 82 % (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Bewurzelung\* an Stecklingen von *P. communis* 'Williams Christ' (WC) aus dem Versuchsjahr 2005. Lang: Langsteckling, Kurz: Kurzsteckling**

\*Werte, die mit gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant nach dem  $\chi^2$ -Homogenitätstest, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$ .

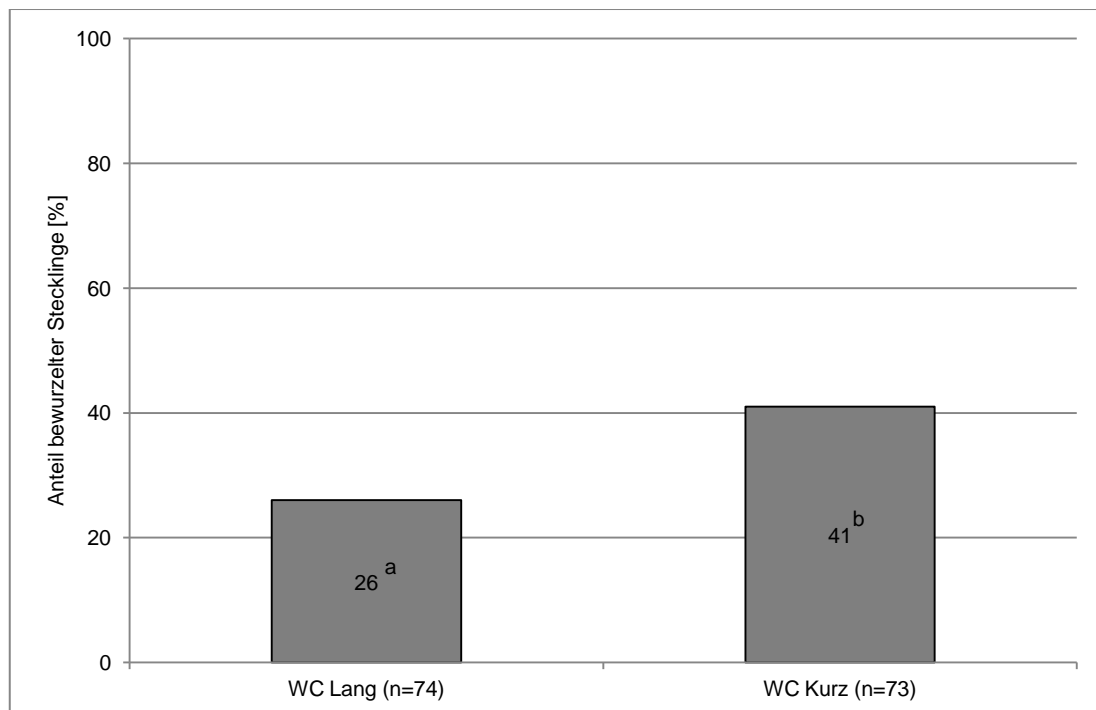
Die durchschnittliche Wurzellänge der längsten Wurzel an den Stecklingen lag zwischen 10,1 und 11,6 cm, ohne signifikante Unterschiede zwischen den Stecklingen (Tabelle 20).

**Tabelle 20: Durchschnittliche Wurzellänge\* an Kurz- und Langstecklingen von *P. communis* ‘Williams Christ‘ (WC) aus dem Versuchsjahr 2005**

	<b>WC Lang (n=46)</b>	<b>WC Kurz (n=36)</b>
<b>Wurzellänge [cm]</b>	11,6 <sup>a</sup>	10,1 <sup>a</sup>

\*Werte, die mit gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant nach einer Rang-Varianz-Analyse, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$ .

Die Bewurzelung der Kurzstecklinge 2006 von ‘Williams Christ‘ war mit 41 % signifikant besser als die der Langstecklinge mit 26 % (Abbildung 10). Insgesamt war die Bewurzelung 2006 deutlich schlechter als im Vorjahr, insbesondere die Langstecklinge bewurzelten über 50 % schlechter.

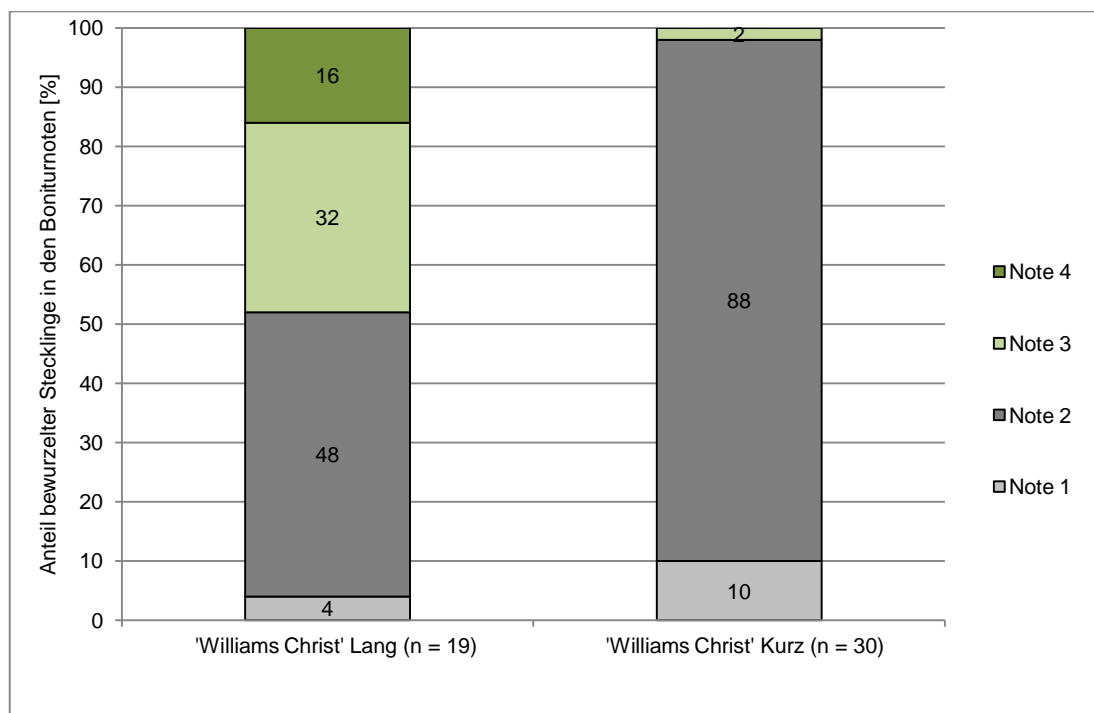


**Abbildung 10: Bewurzelung\* an Lang- und Kurzstecklingen von ‘Williams Christ‘ (WC) aus dem Versuchsjahr 2006. Lang: Langsteckling, Kurz: Kurzsteckling**

\*Werte, die mit gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant nach dem  $\chi^2$ -Homogenitätstest, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$ .



Die Bonitur der Bewurzelungsqualität ergab bei beiden Varianten einen hohen Anteil durchwurzelter Ballen in der Boniturstufe 2 (Abbildung 11). Von den bewurzelten Kurzstecklingen zeigte der größte Anteil (88 %) einen Ballen mit wenigen sichtbaren Wurzeln (Note 2). Von den bewurzelten Langstecklingen zeigte ebenso der Hauptteil (48 %) einen Wurzelballen der Note 2, 32 % zeigten ein durchwurzelter und 16 % einen stark durchwurzelter Ballen (Noten 3 und 4). Im Vergleich zeigten beide Varianten nur wenige Stecklinge in der Boniturnote 1 (Abbildung 11).

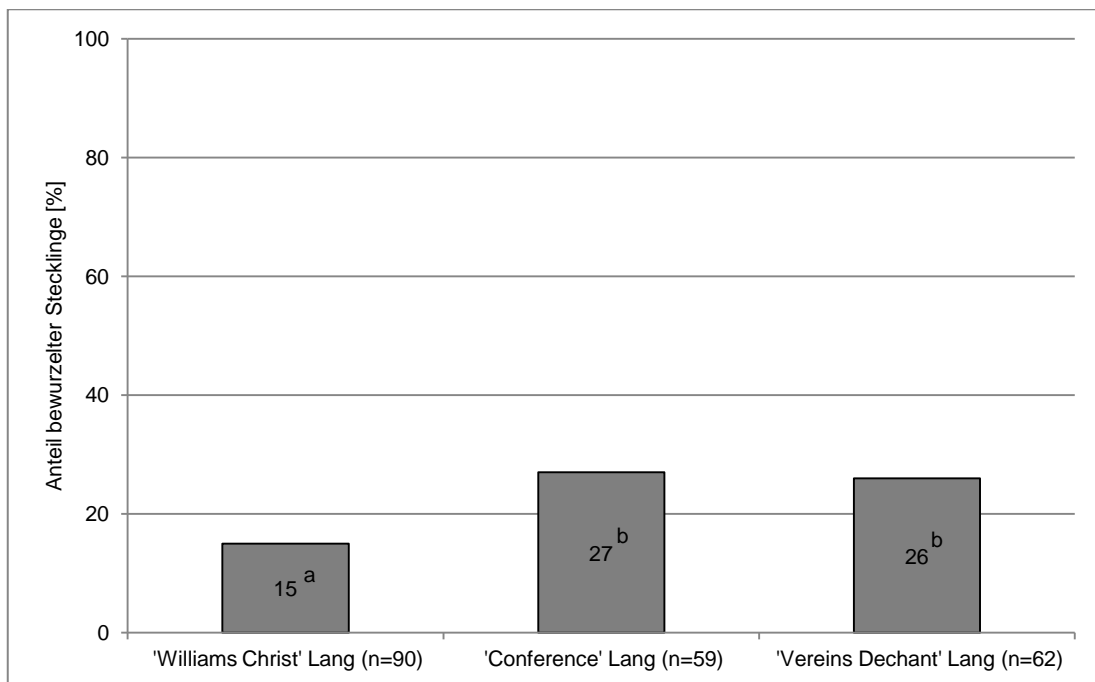


**Abbildung 11: Qualität der Stecklingsbewurzelung von 'Williams Christ' (WC) anhand der prozentualen Anteile in den verschiedenen Boniturstufen der Ballenbonitur im Versuchsjahr 2006. Lang = Langsteckling, Kurz = Kurzsteckling**

Note 1: bewurzelt, keine Wurzeln sichtbar  
 Note 2: bewurzelt, wenige Wurzeln sichtbar  
 Note 3: Ballen durchwurzelt  
 Note 4: Ballen stark durchwurzelt

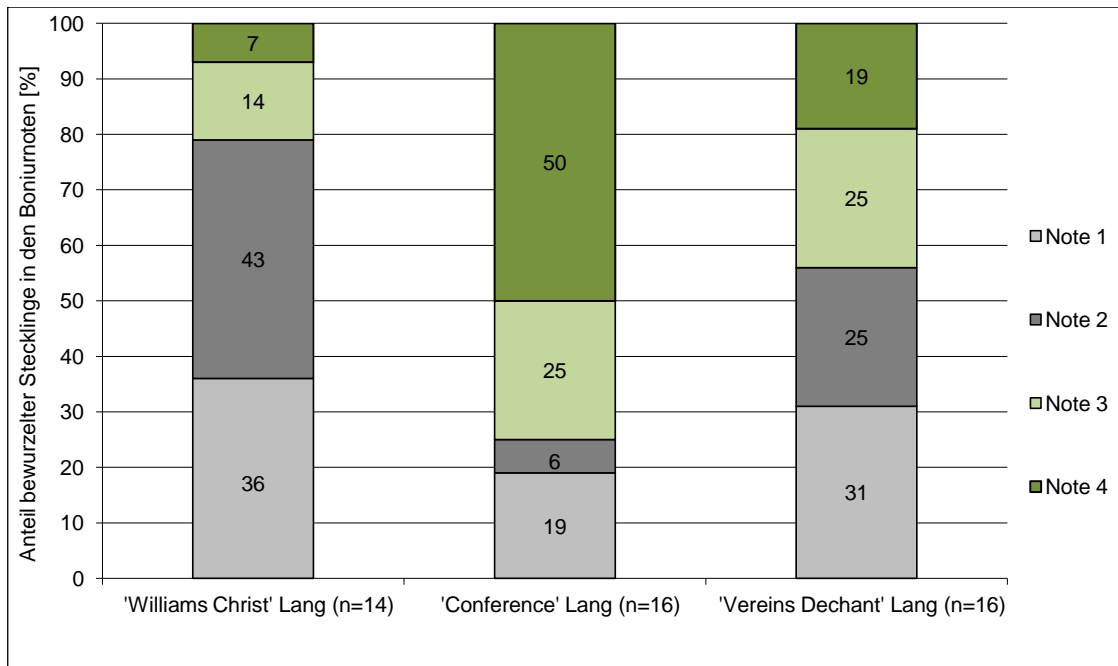
Im Versuchsjahr 2007 wurden Langstecklinge von 'Williams Christ', 'Conference' und 'Vereins Dechant' verwendet (Tabelle 1). Die Bewurzelung betrug für 'Williams Christ' 15 %, für 'Conference' 27 % und für 'Vereins Dechant' 26 %. Die Bewurzelung von 'Williams Christ' unterschied sich signifikant von der Bewurzelung bei 'Conference' und 'Vereins Dechant' (Abbildung 12). Wie aus Abbildung 13 deutlich wird, war die Qualität der Bewurzelung sehr unterschiedlich

zwischen den Sorten. Während 'Williams Christ' einen hohen Anteil bewurzelter Stecklinge mit den Noten 1 (keine Wurzeln sichtbar) und 2 (wenige Wurzeln sichtbar) aufwies, zeigten die Stecklinge von 'Conference' den höchsten Anteil mit 50 % an stark durchwurzelten Ballen (Note 4) und 25 % durchwurzelten Ballen (Note 3). Die Stecklinge der Sorte 'Vereins Dechant' zeigten 31 % Ballenbewurzelung in der Note 1, jeweils 25 % in den Noten 2 und 3 und 19 % starke Bewurzelung (Note 4).



**Abbildung 12: Bewurzelung\* an Langstecklingen von 'Williams Christ', 'Conference' und 'Vereins Dechant' aus dem Versuchsjahr 2007. Lang = Langsteckling**

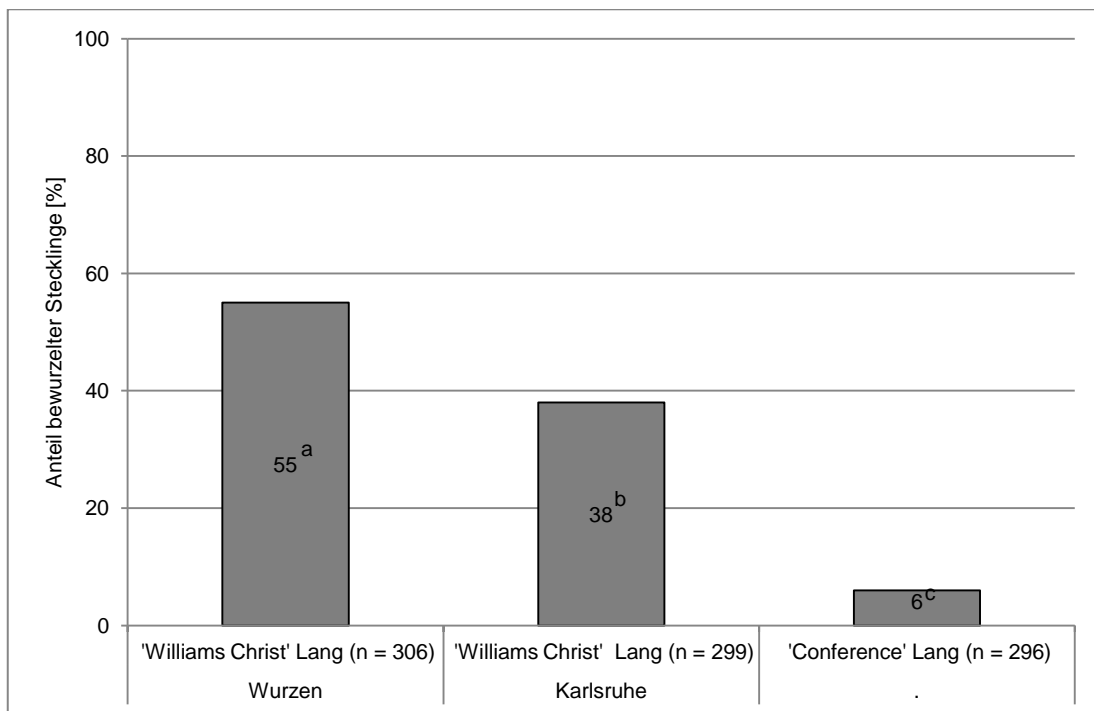
\*Werte, die mit gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant nach dem X<sup>2</sup>-Homogenitätstest, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$ .



**Abbildung 13: Qualität der Bewurzelung von *P. communis* 'Williams Christ', 'Conference' und 'Vereins Dechant' anhand der prozentualen Anteile in den verschiedenen Boniturstufen im Versuchsjahr 2007. Lang = Langsteckling**

- Note 1: bewurzelt, keine Wurzeln sichtbar  
 Note 2: bewurzelt, wenige Wurzeln sichtbar  
 Note 3: Ballen durchwurzelt  
 Note 4: Ballen stark durchwurzelt

Im Jahr 2008 wurden ausschließlich Langstecklinge von ‘Williams Christ‘ und ‘Conference‘ gesteckt (Tabelle 1). Die Langstecklinge der Sorte ‘Williams Christ‘ wurden an zwei Standorten -in Wurzen und Grünwettersbach/ Karlsruhe- geerntet. Der Bewurzelungserfolg von ‘Williams Christ‘ Wurzen lag mit 55 % am höchsten, gefolgt von ‘Williams Christ‘ Karlsruhe mit 38 % Bewurzelung und ‘Conference‘ mit 6 % Bewurzelung. Die Bewurzelung aller drei Sorten im Folienhaus unterschied sich signifikant voneinander (Abbildung 14).

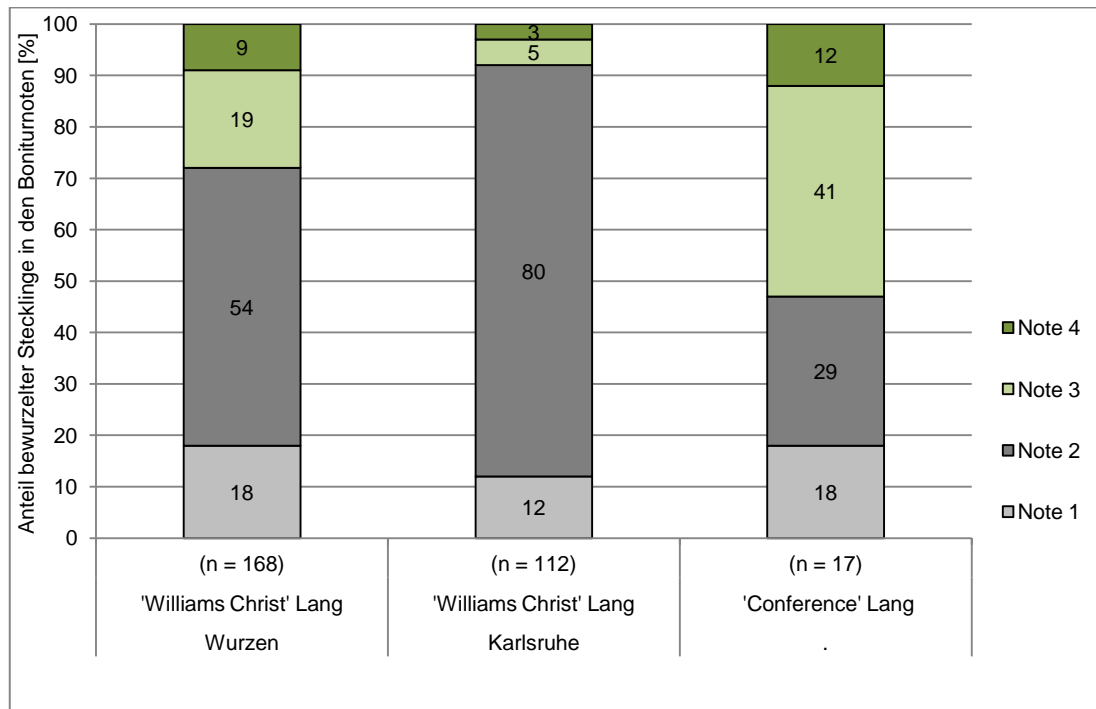


**Abbildung 14: Bewurzelung\* an Langstecklingen von ‘Williams Christ‘ und ‘Conference‘ aus dem Versuchsjahr 2008. Von ‘Williams Christ‘ wurden Stecklinge zweier Standorte getestet (Wurzen und Karlsruhe). Lang = Langsteckling**

\*Werte, die mit gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant nach dem X<sup>2</sup>-Homogenitätstest, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$ .

Die Bonitur der Bewurzelungsqualität zeigte einen hohen Anteil bewurzelter Stecklinge beider ‘Williams Christ‘ Varianten mit 54 % (Wurzen) und 80 % (Karlsruhe) in der Note 2, während die Bewurzelungsqualität der Stecklinge von ‘Conference‘ sich auf alle Boniturnoten verteilte und einen höheren Anteil Stecklinge mit durchwurzelten Ballen (Noten 3 und 4) aufwies (Abbildung 15), wie auch im Vorjahr.

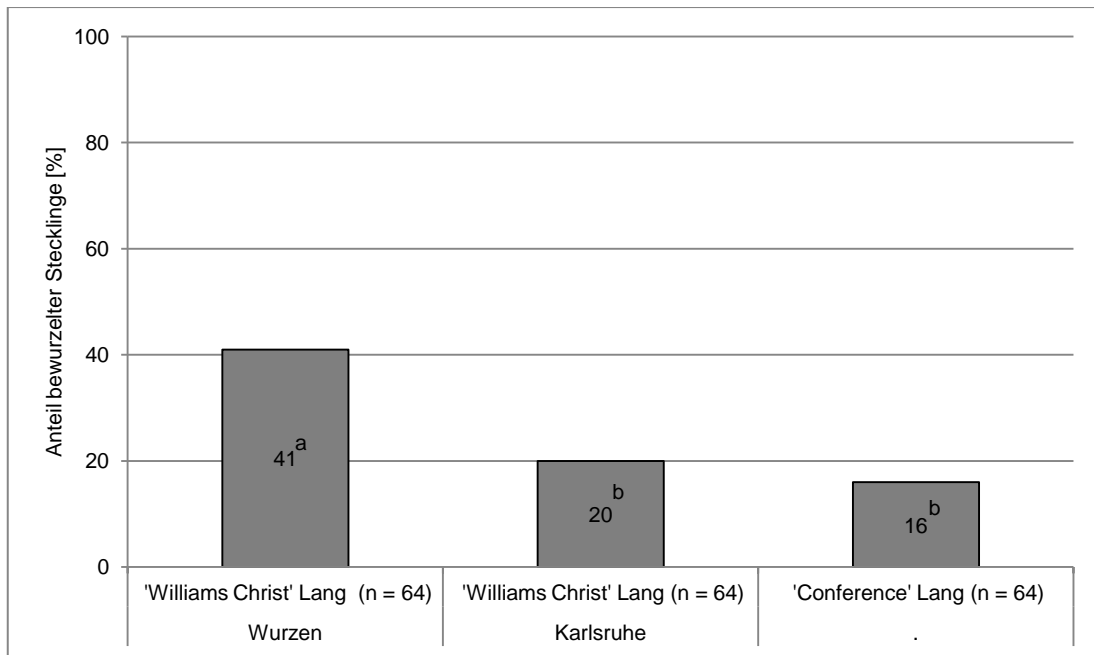
Insgesamt war das Ergebnis der Bewurzelung von 'Conference' deutlich schlechter als im Vorjahr, dagegen war die Bewurzelung von 'Williams Christ' 2008 deutlich besser.



**Abbildung 15: Qualität der Bewurzelung an Langstecklingen von 'Williams Christ' und 'Conference' anhand der prozentualen Anteile in den verschiedenen Boniturstufen im Versuchsjahr 2008. Von 'Williams Christ' wurden Stecklinge zweier Standorte getestet (Wurzen und Karlsruhe). Lang = Langsteckling**

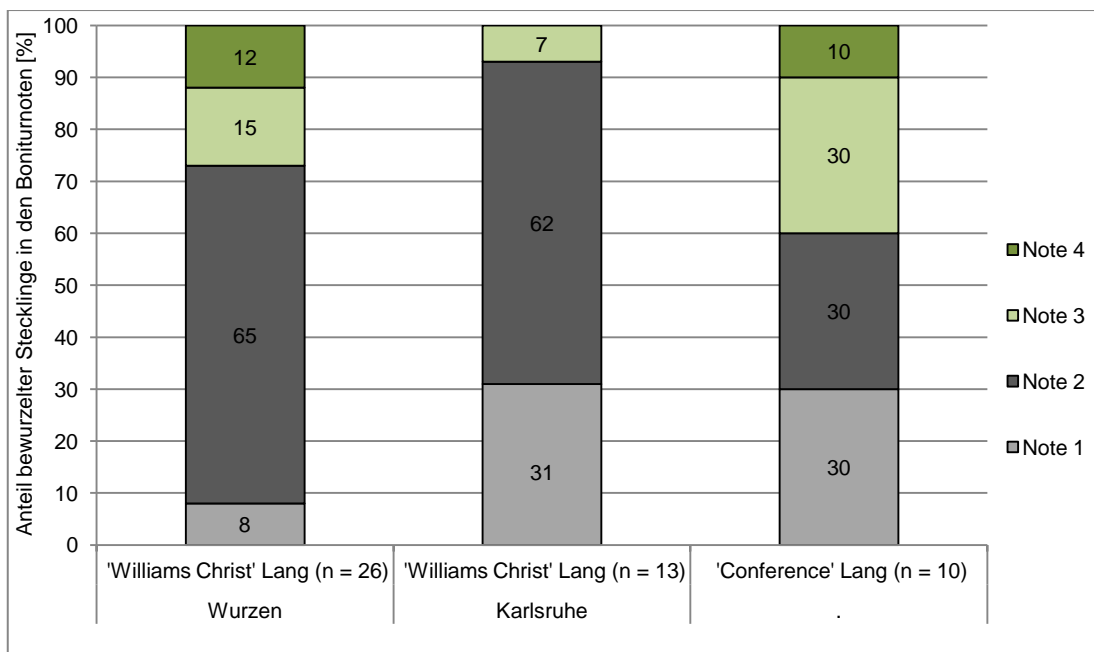
Note 1: bewurzelt, keine Wurzeln sichtbar  
 Note 2: bewurzelt, wenige Wurzeln sichtbar  
 Note 3: Ballen durchwurzelt  
 Note 4: Ballen stark durchwurzelt

Die Bewurzelung von 'Williams Christ' (Wurzen) unter kontrollierten Temperaturbedingungen lag bei 41 % und zeigte einen signifikanten Unterschied in der Bewurzelung zu 'Williams Christ' (Karlsruhe) mit 20 % Bewurzelung und 'Conference' mit 16 % Bewurzelung (Abbildung 16). Die Bonitur der Bewurzelungsqualität ergab auch hier einen höheren Anteil der bewurzelten Stecklinge beider 'Williams Christ' Varianten in der Boniturnote 2 mit 65 % und 62 % und eine gleichmäßige Verteilung über alle Boniturstufen bei 'Conference' mit jeweils 30 % in den Noten 1, 2 und 3 und 10 % in der Note 4 (stark bewurzelter Ballen) (Abbildung 17).



**Abbildung 16: Bewurzelung\* an Langstecklingen von 'Williams Christ' und 'Conference' in der Klimakammer (2008). Von 'Williams Christ' wurden Stecklinge zweier Standorte getestet (Wurzen und Karlsruhe). Lang = Langsteckling.**

\*Werte, die mit gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant nach dem X<sup>2</sup>-Homogenitätstest, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$ .



**Abbildung 17: Qualität der Bewurzelung von Langstecklingen von *P. communis* 'Williams Christ' und 'Conference' anhand der prozentualen Anteile in den verschiedenen Boniturstufen in der Klimakammer (2008). An 'Williams Christ' wurden Stecklinge zweier Herkünfte getestet (W: Wurzen, K: Karlsruhe). (Lang = Langsteckling)**

Note 1: bewurzelt, keine Wurzeln sichtbar  
 Note 2: bewurzelt, wenige Wurzeln sichtbar  
 Note 3: Ballen durchwurzelt  
 Note 4: Ballen stark durchwurzelt

Die Bewurzelung der Langstecklinge von 'Williams Christ' im Folienhaus war von Jahr zu Jahr sehr unterschiedlich, und auch innerhalb eines Jahres bewurzelten sich die Varianten und Sorten sehr unterschiedlich. Betrachtet man die Aufteilung der Bewurzelungsqualität in die Boniturstufen von 1 bis 4 zeigt sich, dass die Bewurzelung von 'Williams Christ' überwiegend mit der Note 2 (bewurzelt, wenige Wurzeln sichtbar) beurteilt wurde.

In jedem Jahr wurde zu Beginn der Versuche die Stecklingslänge erfasst (Tabelle 4). Bei der Frühjahrsbonitur konnte kein Längenwachstum der Stecklinge beobachtet werden. An wenigen Stecklingen fand eine Neutriebbildung statt.

### 3.1.2 Blütenbildung

Die typische Blütenbildung an Langstecklingen von 'Williams Christ' ist in Abbildung 18 dargestellt. Deutlich zu sehen ist, dass sich die Blüten hauptsächlich im oberen Bereich des Stecklings bildeten und am Steckling links ist zu beobachten, dass nicht immer eine terminale Blütenbildung am Steckling stattfand.

In der Blütenbildung an Stecklingen der Sorte 'Williams Christ' gab es 2005 und 2006 keine signifikanten Unterschiede zwischen Lang- und Kurzstecklingen, die Blütenbildung war an den Langstecklingen jedoch in beiden Jahren etwas höher (Tabelle 21). Die Stecklinge aus Wurzen zeigten 2006 eine etwas höhere Blütenbildung als die Stecklinge 2005 aus Karlsruhe (Tabelle 21).



**Abbildung 18: Blütenbildung an Langstecklingen von 'Williams Christ' im Frühjahr 2007**

**Tabelle 21: Prozentuale Blüte an Lang- und Kurzstecklingen von *P. communis*-Sorten im Folienhaus (2005 - 2008) und unter kontrollierten Temperaturbedingungen in der Klimakammer (KK, 2008)**

Kultur	Jahr	Sorte	Stecklingsart	Standort Mutterpflanze	n	Anteil der Stecklinge mit Blütenbildung [%]	
Folienhaus	2005	‘Williams Christ‘	Lang	Karlsruhe	56	11 <sup>a</sup>	
		‘Williams Christ‘	Kurz		53	8 <sup>a</sup>	
	2006	‘Williams Christ‘	Lang	Wurzen	74	18 <sup>a</sup>	
		‘Williams Christ‘	Kurz		73	11 <sup>a</sup>	
	2007	‘Williams Christ‘	Lang	Wurzen	90	80 <sup>a</sup>	
		‘Conference‘		Ruthe	59	3 <sup>b</sup>	
		‘Vereins Dechant‘		Ruthe	62	0 <sup>c</sup>	
	2008	‘Williams Christ‘	Lang	Wurzen	306	28 <sup>a</sup>	
		‘Williams Christ‘		Karlsruhe	299	15 <sup>b</sup>	
		‘Conference‘		Ruthe	296	3 <sup>c</sup>	
	KK		‘Williams Christ‘	Lang	Wurzen	64	11 <sup>a</sup>
			‘Williams Christ‘		Karlsruhe	64	3 <sup>b</sup>
‘Conference‘			Ruthe		64	3 <sup>b</sup>	

\*Werte, die mit gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant nach dem X<sup>2</sup>-Homogenitätstest, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$ . Statistisch ausgewertet wurde immer die Blütenbildung innerhalb eines Jahres. Die statistische Auswertung der Daten 2008 wurde getrennt je für das Folienhaus und die Klimakammer durchgeführt.

Die Blütenbildung bei den Birnensorten in den Jahren 2007 und 2008 im Folienhaus unterschied sich in jedem Jahr signifikant voneinander. In beiden Jahren war die Blütenbildung an ‘Williams Christ‘ höher als an ‘Conference‘. Bei Betrachtung der Standorte Wurzen und Karlsruhe war die Blütenbildung an den Langstecklingen des Standortes Wurzen signifikant höher. Die Stecklinge von ‘Vereins Dechant‘ zeigten 2007 keine Blütenbildung (Tabelle 21). Unter kontrollierten Bedingungen in der Klimakammer (2008) zeigten die Stecklinge von ‘Williams Christ‘ aus Wurzen die höchste Blütenbildung mit einem signifikanten Unterschied zu den Stecklingen aus Karlsruhe und zu ‘Conference‘ (Tabelle 21). Vergleicht man 2008 die Blütenbildung in der Klimakammer mit der Blütenbildung im Folienhaus, so wird deutlich, dass beide ‘Williams Christ‘ Varianten im Folienhaus mehr Blüten gebildet haben. Bei ‘Conference‘ war die Blütenbildung in der Klimakammer genau so hoch wie im Folienhaus (Tabelle 21).



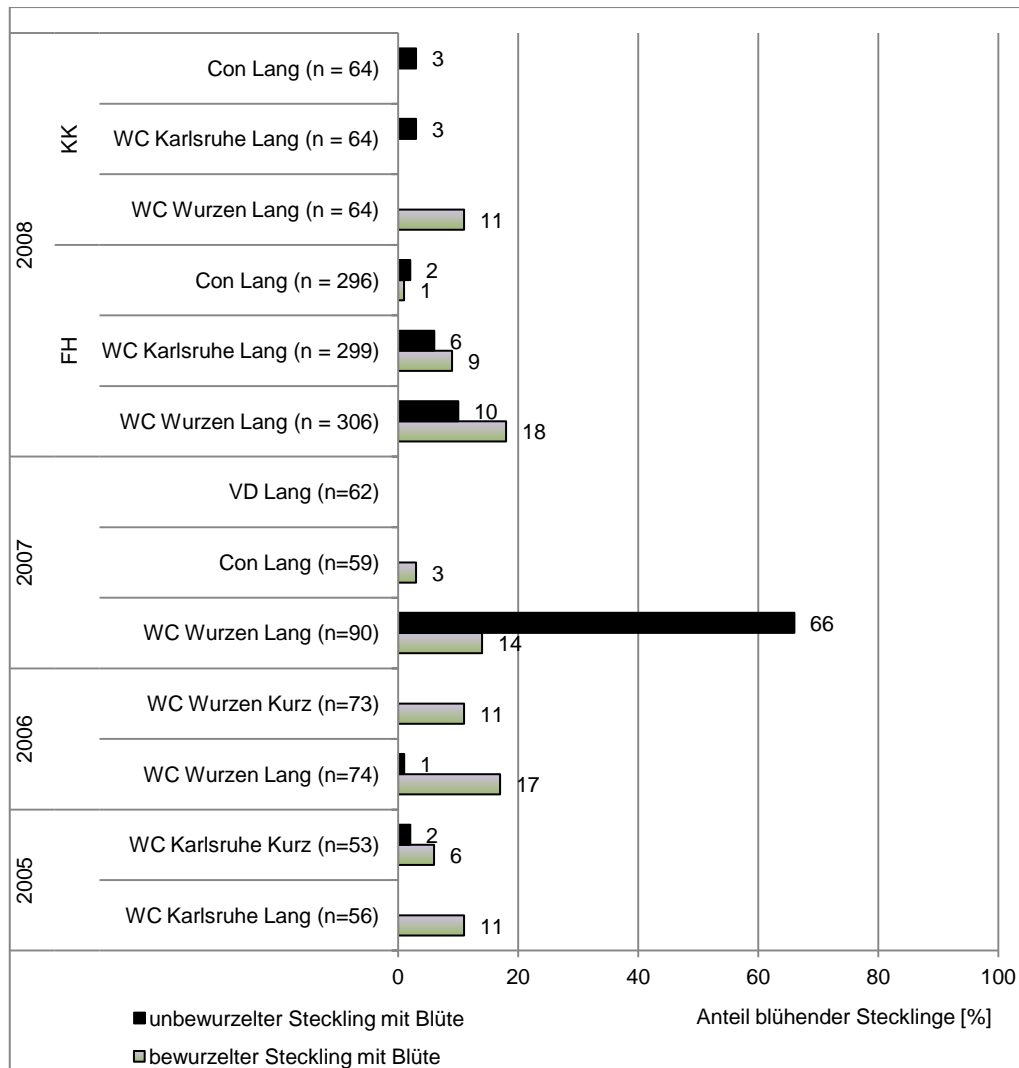
Tabelle 21 zeigt deutlich, dass die Blütenbildung bei ‘Williams Christ‘ im Jahr 2007 mit 80 % im Vergleich deutlich höher war als bei den anderen Sorten und auch in den anderen Jahren.

Die Bonitur der Stecklinge zeigte, dass Blütenbildung nicht nur an bewurzelten sondern auch an unbewurzelten Stecklingen stattfand. Abbildung 19 zeigt einen bewurzelten blühenden Steckling und daneben unbewurzelte blühende Stecklinge. Die Blütenbildung an den bewurzelten Stecklingen war insgesamt stärker über alle Knospenpositionen (Nodien) am Steckling verteilt und die Stecklinge wirkten vitaler als die unbewurzelten. Die unbewurzelten Stecklinge zeigten oft nur an ein oder 2 Positionen Blüten, selten an mehreren Positionen.



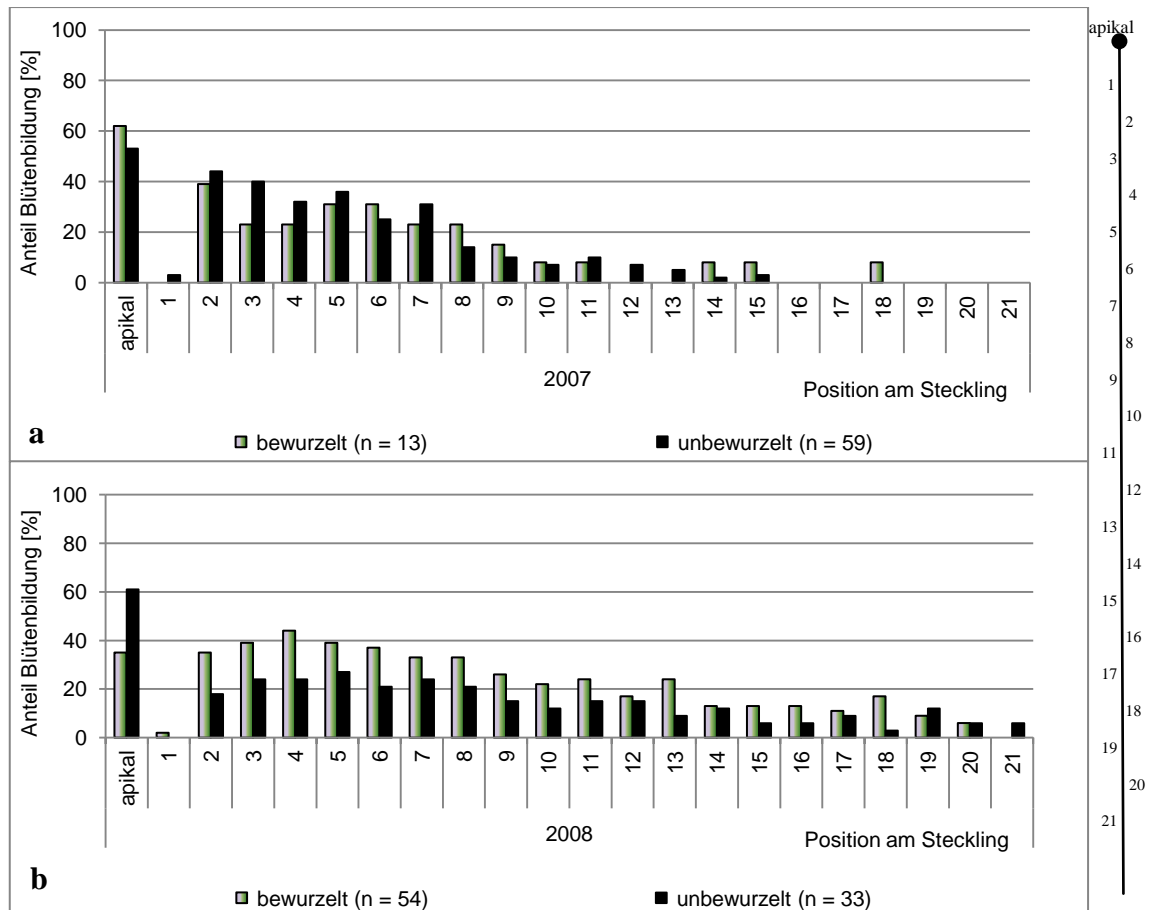
**Abbildung 19: Blütenbildung an einem a) bewurzelten Langsteckling und b) unbewurzelten Langstecklingen von ‘Williams Christ‘ aus dem Folienhaus (April 2007)**

In Abbildung 20 ist die Blütenbildung an bewurzelten und unbewurzelten Stecklingen von 2005 bis 2008 dargestellt. Insbesondere bei Langstecklingen von ‘Williams Christ‘ fiel auf, dass im Jahr 2007 66 % der Stecklinge keine Wurzel aber dennoch Blüten ausbildeten. Auch 2008 waren mehr als die Hälfte der blühenden Stecklinge von ‘Williams Christ‘ aus dem Folienhaus unbewurzelt. Die Sorte ‘Conference‘ zeigte ebenfalls unbewurzelte aber blühende Stecklinge. Diese Beobachtung wurde nicht nur im Folienhaus gemacht, sondern zeigte sich 2008 auch unter kontrollierten Bedingungen in der Klimakammer (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Anteil der bewurzelten und unbewurzelten Stecklingen mit Blüte von ‘Williams Christ‘ (WC), ‘Conference‘ (Con) und ‘Vereins Dechant‘ (VD) im Folienhaus (FH) und unter kontrollierten Bedingungen (KK), (2005 – 2008) (Lang = Langsteckling, Kurz = Kurzsteckling)**

Die Blütenbildung an den bewurzelten und unbewurzelten Stecklingen bildete sich verstärkt an den Sprossspitzen und im oberen Bereich und nahm zur Basis hin ab. Der größte Anteil der Blüten war an der apikalen Position zu finden, während kaum Blüten an Position 1 gebildet wurden (Abbildung 21). Die Ergebnisse 2007 zeigten an den bewurzelten und unbewurzelten Stecklingen eine Blütenbildung >20 % für die Positionen apikal und 2 bis 7. Aus diesem Grund wurden für die histologischen und molekularen Untersuchungen 2008 diese Positionen an den Stecklingen gerettet. Auch 2008 konnte an diesen Positionen der höchste Anteil Blüten verzeichnet werden (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Prozentualer Anteil blütenbildender Knospen bezogen auf die Position der Nodien an bewurzelten und unbewurzelten Langstecklingen von 'Williams Christ' (Wurzeln) in den Jahren 2007 (a) und 2008 (b). Die Position ergibt sich durch die Nummerierung der Nodien am Steckling von der Spitze zur Basis. Die terminale Knospe hatte die Position 'apikal' (siehe Skizze).**

Mit Ausnahme des Jahres 2007 war die Blütenbildung an den Langstecklingen von 'Williams Christ' zwar unterschiedlich von Jahr zu Jahr aber mit einer Blütenbildung zwischen 11 und 18 % an den bewurzelten Stecklingen nicht so stark abweichend voneinander. Auffallend war, dass die Blütenbildung an der Sorte 'Conference' sehr viel niedriger war und 'Vereins Dechant' gar keine Blüten ausbildete.

Betrachtet man die Blütenbildung an den unbewurzelten Stecklingen fällt besonders das Jahr 2007 mit 66 % unbewurzelten, blühenden Stecklingen auf. Hier zeigt sich, dass für eine erfolgreiche Blütenbildung (eine ausreichende Versorgungslage vorausgesetzt) offensichtlich keine Bewurzelung benötigt wird. Vergleicht man nun für 'Williams Christ' die Ergebnisse der Bewurzelung mit den Ergebnissen der Blütenbildung, wird deutlich, dass bei guter Bewurzelung (82 %) nur wenige Blüten (11 %) gebildet wurden (2005). Anders betrachtet war bei schlechter Bewurzelung

(15 %) die Blütenbildung besser (80 % im Jahr 2007). Diese Beobachtung konnte an ‘Conference‘ nicht gemacht werden. Hier betrug die Blütenbildung 2007 und 2008 je 3 % während die Bewurzelung einmal 27 % (2007) und einmal 6 % (2008) zeigte. Die Blütenbildung an ‘Williams Christ‘ Wurzeln und ‘Conference‘ unter kontrollierten Temperaturbedingungen war vergleichbar zu der Blütenbildung der Sorten im Folienhaus (Abbildung 20).

Vergleichend zu den Ergebnissen der Blütenbildung an den Stecklingen wurde im Frühjahr 2009 die Blütenbildung an den Mutterpflanzen geprüft. Hier zeigte sich, dass die Mutterbäume von ‘Conference‘ an den senkrechten Trieben im oberen Kronenbereich kaum Blüten ausgebildet hatten (Abbildung 22).

Die Mutterbäume der Sorte ‘Williams Christ‘ dagegen zeigten an den senkrechten Trieben eine üppige Blüte. Nach Auskunft der Mitarbeiter haben fast alle senkrechten Triebe geblüht. Die Blüten am Kurzholz waren durch Frost geschädigt und die für die Genexpressionsanalyse herunter gebundenen Zweige hatten nur endständig ein paar Blütenknospen (Mail A. Zschammer). Auch hier zeigte sich die Blütenbildung überwiegend im Terminalbereich der Triebe (Abbildung 23).



**Abbildung 22: Mutterbäume der Sorte 'Conference' zur Vollblüte a) ohne Blütenbildung und b) mit Blütenbildung an den senkrechten Trieben am 22. April 2009 in Ruthe**



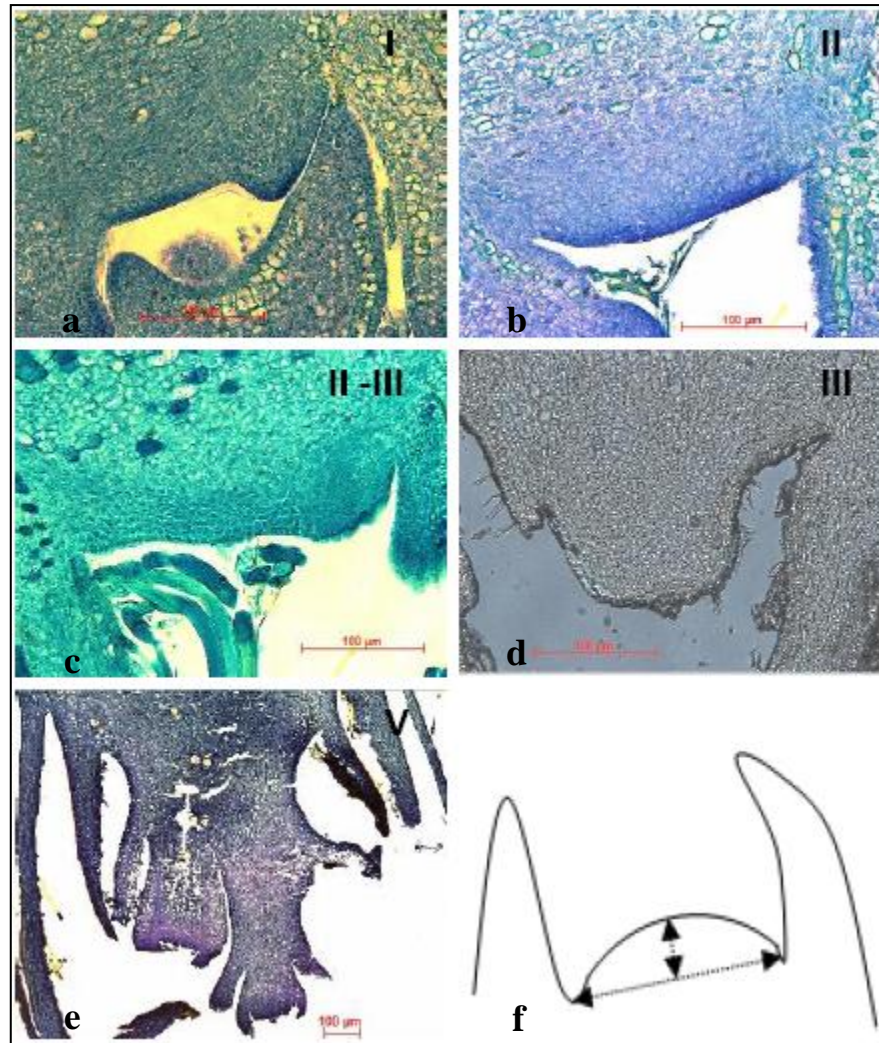
**Abbildung 23: Mutterbäume der Sorte 'Williams Christ' zur Vollblüte an a) senkrechten und b) waagrecht gebundenen Trieben (eingekreist) am 28. April 2009 in Wurzen (Fotos: A. Zschammer)**

---

### 3.2 Histologische Untersuchungen zur Blütendifferenzierung an ‘Williams Christ‘

Um den Zeitpunkt der Blütendifferenzierung zu ermitteln, sollten die Meristeme hinsichtlich ihrer morphologischen Veränderung von vegetativ zu generativ im Verlauf der Zeit betrachtet werden. Hierbei zeigte sich, dass eine so deutliche Einteilung der Meristeme in die bei HANKE (1981) genannten Stadien nicht immer möglich war. Ausgehend von der Einteilung der Stadien nach Hanke wurden die Meristeme in der vorliegenden Arbeit in die Stadien I, II, II – III, III und V eingeteilt. Das Stadium IV wie in Abbildung 3 nach HANKE (1981) gezeigt, konnte in den vorliegenden Knospenschnitten nicht nachgewiesen werden. Das Stadium I (Abbildung 24a) zeigt einen abgeflachten, vegetativen Apex. Stadium II zeigt eine leicht gewölbte Oberfläche (Abbildung 24b). Die Einteilung II – III (Abbildung 24c) wurde gewählt, da die in diese Gruppe eingeteilten Meristeme nicht eindeutig ein wie in Abbildung 24d reproduktives Pflockmeristem (Stadium III) zeigten, allerdings in ihrer Morphologie auch nicht mehr eindeutig eine „nur“ gewölbte Oberfläche wie in Stadium II aufwiesen. Abbildung 24e zeigt Stadium V mit einem reproduktiven Infloreszenzmeristem.

Die einzelnen Meristeme wurden unter dem Mikroskop vermessen wie in Abbildung 24f dargestellt. In der Mitte des Meristems wurde die Länge zwischen den Blattprimordien vermessen. Ausgehend von dieser Linie wurde senkrecht zur höchsten Stelle die Höhe gemessen. Die Meristeme in Stadium V wurden nicht vermessen.



**Abbildung 24:** Morphologische Entwicklungsstufen der Blütendifferenzierung an *P. communis* ‘Williams Christ’ und die Einteilung in verschiedene Stadien anhand histologischer Schnitte (a bis d: 100fach vergrößert; e: 25fach vergrößert). Der Maßstab ist jeweils mit 100  $\mu\text{m}$  angegeben. Vegetatives, abgeflachtes Meristem: Stadium I (a), vegetatives, gewölbtes Meristem: Stadium II (b), Zwischenstadium II – III (c), generatives Pflöckmeristem: Stadium III (d), Infloreszenzmeristem: Stadium V (e). Breiten- und Höhenmessung [ $\mu\text{m}$ ] des Meristems zwischen den Blattprimordien (f).

Tabelle 22 zeigt die unterschiedlichen Breiten- und Höhenwerte, die für die verschiedenen Meristemstadien an den Langstecklingen und am Baum gemessen wurden, ebenso wie die kleinsten und höchsten Breiten eines Stadiums. Insgesamt lässt sich schlussfolgern, je fortgeschrittener das Stadium umso breiter und höher war das Meristem. Das Stadium V wurde nicht vermessen. Sowohl bei den Langstecklingen als auch bei den Trieben am Baum zeigten die Meristeme in Stadium III eine etwas geringere Breite bzw. nicht so stark zunehmende Breite verglichen mit den anderen Stadien. Betrachtet man den jeweils kleinsten und

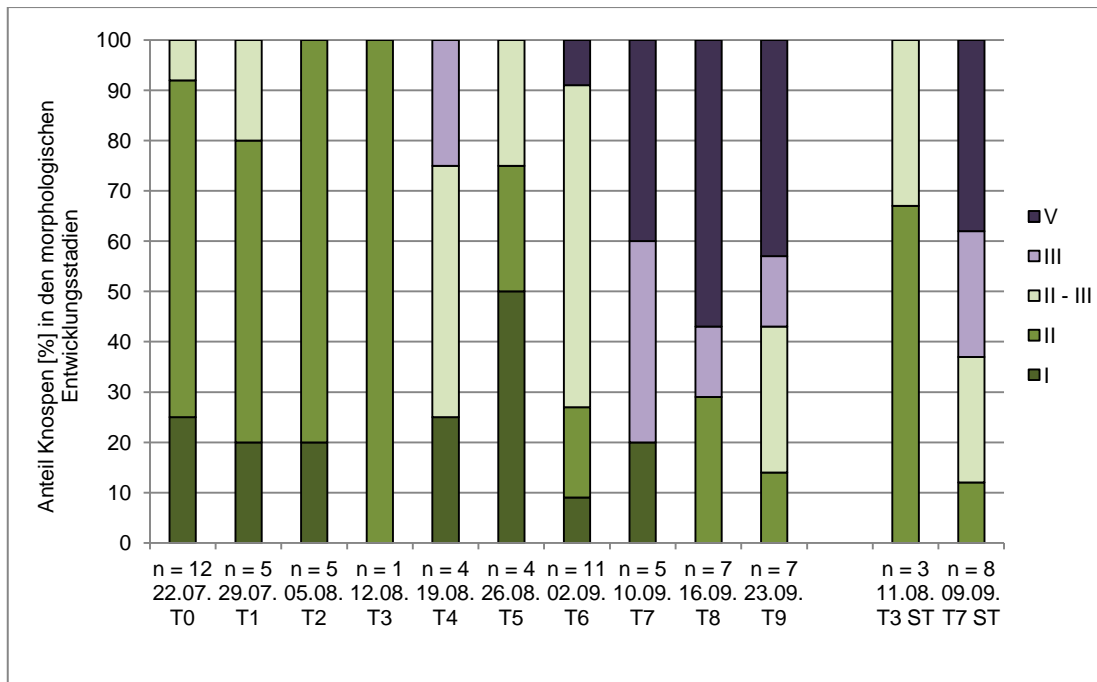
stärksten Breitenwert eines Stadiums miteinander, zeigten die Meristeme am Baum insgesamt breitere Meristeme (Tabelle 22). Meristeme in Stadium I wurden am Baum nicht gefunden.

**Tabelle 22: Gemittelte Breiten- und Höhenwerte [ $\mu\text{m}$ ] der Meristemstadien I bis III in Knospen von Langstecklingen (T0 bis T9) und senkrechten Trieben am Baum (11.08. und 09.09.) von ‘Williams Christ’ Wurzeln (2008). In Klammern angegeben finden sich die jeweils kleinste und höchste Breitenangabe eines Stadiums.**

	<b>Stadium Langstecklinge</b>			
	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>II - III</b>	<b>III</b>
	n = 10	n = 22	n = 13	n = 5
Breite [ $\mu\text{m}$ ]	132,0 (91/ 268)	195,4 (124/ 376)	246,7 (175/ 352)	247,8 (137/ 315)
Höhe [ $\mu\text{m}$ ]	7,2	20,2	43,4	76,2
<b>Stadium senkrechte Triebe am Baum</b>				
	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>II - III</b>	<b>III</b>
	n = 0	n = 3	n = 3	n = 2
Breite [ $\mu\text{m}$ ]		362,8 (181/ 683)	393,1 (263/ 597)	265,5 (177/ 353)
Höhe [ $\mu\text{m}$ ]		39,8	78,9	70,4

Zu Beginn des Versuches und bis drei Wochen danach (T3) befanden sich die Knospen der Langstecklinge im vegetativen Zustand (Abbildung 25). Vier Wochen nach Versuchsbeginn (T4) konnte zum ersten Mal ein eindeutiges Pflockmeristem und damit die Umstimmung zur reproduktiven Phase (Stadium III) in den Langstecklingen beobachtet werden. Sechs Wochen nach Versuchsbeginn (T6) zeigten sich zum ersten Mal in den Knospen der Langstecklinge Infloreszenzmeristeme (Abbildung 25). In der Entwicklung von Knospen senkrechter Triebe am Baum zeigten die Knospen am 11.08. (vergleichbar zu T3) noch kein eindeutiges generatives Stadium. Etwa vier Wochen später (vergleichbar T7) konnten Pflockmeristeme und bereits Infloreszenzmeristeme gefunden werden (Abbildung 25). In der Zeit zwischen diesen Terminen wurden keine Proben genommen.





**Abbildung 25: Prozentuale Verteilung der verschiedenen Stadien der Knospenentwicklung von T0 bis T9 an Langstecklingen sowie an zwei Terminen an senkrechten Trieben (ST) am Baum von *P. communis* 'Williams Christ' Wurzen (2008). Ausgewertet wurden die Knospen an den Positionen der Nodien 2 bis 7 sowie die apikale Knospe.**

### 3.3 Molekulargenetische Untersuchungen zur Blüteninduktion an *Pyrus communis* Sorten

Die RNA konnte bei 'Williams Christ' aus insgesamt 414 Knospen und bei 'Conference' aus 306 Knospen isoliert werden (2008). Die aus den Knospen isolierte RNA wurde photometrisch quantifiziert und mittels der Absorptionswerte bei 260/280 nm auf die Reinheit der RNA geprüft (der Wert lag für alle Proben bei etwa 2,0). Die gemessenen RNA-Gehalte lagen zwischen 1,0 und 308 ng/µl. Alle Proben wurden zusätzlich über eine PCR auf DNA-Kontamination überprüft, als Primer wurde hier ein Elongationsfaktor verwendet. Zur Kontrolle wurde jeweils eine Wasserprobe mit getestet. Als Positivkontrolle der PCR wurde jeweils eine Probe mit DNA aus *P. communis* 'Williams Christ' getestet. Es konnte keine Kontamination der Proben mit DNA festgestellt werden. Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese. Für die cDNA-Synthese wurden pro Template 0,2 µg Gesamt-RNA eingesetzt, dabei konnten für 'Williams Christ' 307 und bei 'Conference' 281 der isolierten Proben-RNA eingesetzt werden. Die Produkte der verwendeten Primer wurden sequenziert und die Übereinstimmung lag für *MdAP* 1 bei 95 %, für *PcTFL* 1-1 bei 93 %, für *PcAFL* 1-1 bei 87 % und für *MdSOC* 1 bei 72 % (Anhang A IV).

Die Auswertung der Genexpression erfolgte 2006 und 2007 visuell über die Agarosegele. Die Bandenstärke des Blütenrepressorgens *PcTFL* 1-1 sollte mit dem Blütenmeristemidentitätsgen *MdAP* 1 verglichen werden um Erkenntnisse über den jeweiligen Knospenzustand zu gewinnen. Zusätzlich wurden die Banden mit der Software der Geldokumentation ausgewertet. Da diese Gene als qualitative Marker bei *A. thaliana* genutzt werden können, wurde erwartet, dass jeweils ein Gen der beiden stärker exprimiert vorlag als das jeweils andere. Diese semi-quantitative Methode über den Vergleich der Bandenstärken, lieferte allerdings keine eindeutigen Beweise über eine erfolgte (oder nicht erfolgte) Blüteninduktion in den Knospen, da eine exakte Beurteilung der Expressionsstärke selten möglich war. Die Auswertung über die Software wurde zudem erschwert durch die schwankende Qualität der Gele. Eine einfache visuelle Auswertung der Gele insbesondere bei schwachen und gleichstarken Banden stellte hier eine große Fehlerquelle dar. Aus diesem Grund werden in der vorliegenden Arbeit nur die Ergebnisse aus der qRT-PCR beschrieben. Um die Ergebnisse der qRT-PCR bewerten und vergleichen zu können erfolgte eine rechnerische Auswertung der Daten (Kapitel 2.3.9) über eine Effizienz-korrigierte

relative Quantifizierung nach der  $\Delta\Delta$ -Ct-Methode (PFAFFL, 2004). Als technische Wiederholungen gelten die Testungen einer Knospen-RNA innerhalb eines qRT-PCR-Laufes (max. 2).

1. Jeder Wert wurde gegen den Mittelwert des jeweiligen Genes zu Versuchsbeginn (T0) berechnet.

Der Zeitpunkt T0 dient hier als Kontrolle. Eine Ausnahme bei dieser Berechnung bildete *MdAP 1*. Da zu Versuchsbeginn (T0) keine Daten dieses Gens in technischer Wiederholung aus einer Knospe vorlagen, wurden für die Berechnungen des Mittelwertes die Daten des Zeitpunktes herangezogen, die dem Versuchsstart am nächsten lagen und eine robuste Expression (Nachweis der Expression in zweifacher technischer Wiederholung einer Probe) von *MdAP 1* aufwiesen. Hier dient der Zeitpunkt T2 als Kontrolle. Damit nicht der Eindruck entsteht, dass zu Beginn der Versuche überhaupt keine *MdAP 1*-Expression in den Knospen stattfand, werden diese Daten in den Diagrammen trotzdem gezeigt, aber unter Vorbehalt betrachtet. Die Mittelwerte der Daten von *MdAP 1* zum Zeitpunkt T0 und T1 wurden jeweils aus den getesteten Knospen eines Termins (8 bzw. 10, s. auch Tabelle 23) gebildet.

2. Jeder Wert wurde gegen das Housekeeping-Gen *PcACTIN* normalisiert.

Auch hier wurde jeder Wert gegen den Mittelwert von *PcACTIN* zum Zeitpunkt T0 (auch für *MdAP 1*) berechnet. (*PcACTIN* wies stabile und vergleichbare Ct-Werte in den qRT-PCR Läufen auf. Eventuelle Schwankungen wurden durch die Berechnung mit den Mittelwerten ausgeglichen.)

Die Berechnungen wurden für jede Knospe und für jeden Probestern durchgeföhrt. Anschließend wurden diese Einzelwerte logarithmiert und daraus die Mittelwerte gebildet. Verwendet wurden nur die Daten einer Probe, die in zweifacher Wiederholung eines qRT-PCR-Laufes vorlagen.

Auf diese Weise konnte eine quantitative Expressionsrate der einzelnen Gene im zeitlichen Verlauf berechnet werden. Die Werte ermöglichen eine Betrachtung der Quantität der Transkripte innerhalb einer Knospe zu einem Zeitpunkt und zeigen Unterschiede in der Quantität von Zeitpunkt zu Zeitpunkt, bezogen auf die Kontrolle. Aufgrund der insgesamt hohen Probenzahl und der Gesamtheit der Kosten für eine Knospe von der Aufbereitung der RNA bis zur Auswertung der Expression wurden

Knospen von Stecklingen aller Termine von ‘Williams Christ‘ und nur Knospen ausgewählter Probetermine von ‘Conference‘ untersucht. Zusätzlich wurden an zwei Probeterminen die Knospen senkrechter Triebe sowie waagrecht gebundener Triebe von ‘Williams Christ‘ und an einem Probetermin die Knospen senkrechter Triebe von ‘Conference‘ untersucht. Um die Daten an den Terminen T0 und T1 genauer betrachten zu können, wurden zusätzlich die Knospen dieser Termine von ‘Williams Christ‘ aus 2007 sowie an T0 die Knospen der Langstecklinge von ‘Williams Christ‘ aus Karlsruhe untersucht.

Beachtet werden sollte, dass die Ergebnisse aus jeweils verschiedenen Knospen mehrerer Stecklinge (zu einem Probetermin) stammen. Die relative Genexpression wurde aus den Mittelwerten aller Knospen eines Zeitpunktes gebildet, und die Ergebnisse werden logarithmiert dargestellt, um einen generellen Überblick im zeitlichen Verlauf zu bekommen.

### 3.3.1 ‘Williams Christ‘

In Tabelle 23 ist die Anzahl Knospen von ‘Williams Christ‘ aufgeführt, die an den jeweiligen Probeterminen untersucht wurden sowie die Anzahl der Knospen, die davon zur Auswertung der einzelnen Gene gewertet werden konnten. Die unterschiedliche Anzahl erklärt sich zum einen durch nicht nachweisbare Expression (oder nur in einer Wiederholung) der einzelnen Gene oder durch Ausfall des Housekeeping-Gens in einzelnen Knospen. Die Tabelle zeigt deutlich, dass die Gene *MdSOC 1*, *PcTFL 1-1* und *PcAFL 1-1* erfolgreich und in hoher Probenzahl über die qRT-PCR nachgewiesen werden konnten, während *MdAP 1* in deutlich weniger Knospen nachgewiesen werden konnte (Tabelle 23). Zum Zeitpunkt T0 und T1 gelang es nicht, *MdAP 1*-Expression in zweifacher Wiederholung in den Einzelknospen nachzuweisen. Die Anzahl der Knospen, die für die Berechnung der Mittelwerte herangezogen wurde, sind in Klammern aufgeführt. Auffallend ist, dass die Gesamtzahl der getesteten Knospen aus dem Folienhaus ab T5 deutlich abnahm, obwohl zu jedem Termin (mit Ausnahme an T0) die gleiche Knospen Anzahl ( $\leq 28$ ) verwendet wurde. Das ist darauf zurückzuführen, dass es nicht gelang, ausreichend RNA aus den Proben zu isolieren um damit eine cDNA-Synthese durchführen zu können.

**Tabelle 23:** Gesamtzahl der in der qRT-PCR getesteten Knospen von T0 bis T8 für ‘Williams Christ’ (Langstecklinge, senkrechte (ST) und waagerechte (geb) Triebe am Baum, 2008) sowie die Anzahl der Knospen, die für die Auswertung der einzelnen Gene herangezogen werden konnten. Die Anzahl der Knospen, die für die Berechnung der Mittelwerte für *MdAP 1* an T0 und T1 herangezogen wurden, sind in Klammern aufgeführt und grau gekennzeichnet.

Termin		Gesamtzahl der in der qRT-PCR getesteten Knospen	Anzahl der Knospen, die zur Auswertung der einzelnen Gene gewertet werden konnten			
			<i>MdSOC 1</i>	<i>PcAFL 1-1</i>	<i>MdAP 1</i>	<i>PcTFL 1-1</i>
22.07.	T0	42	36	34	0 (8)	36
29.07.	T1	25	24	22	0 (10)	25
05.08.	T2	27	26	26	8	26
12.08.	T3	21	20	20	12	20
19.08.	T4	20	20	19	5	19
26.08.	T5	14	11	10	4	10
02.09.	T6	15	13	14	10	11
10.09.	T7	19	17	18	14	16
16.09.	T8	12	12	12	9	10
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>						
11.08.	T3 geb	20	20	20	12	19
12.08.	T3 ST	37	33	35	11	36
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>						
09.09.	T7 geb	12	12	11	12	12
10.09.	T7 ST	38	35	37	35	34

Betrachtet man den Verlauf der Expression aller Gene anhand der Mittelwerte (dargestellt in Abbildung 26) fällt auf, dass die Expression von *MdAP 1* zu Versuchsbeginn an niedriger in den Knospen vorlag, als die der anderen Gene. Die Expression von *MdAP 1* zu den Zeitpunkten T0 und T1 wird hier gestrichelt dargestellt, da diese Werte nicht in einer Wiederholung der getesteten Knospen abgesichert werden konnten. Hier wurde ein Mittelwert aus den vorhandenen Werten gebildet. Ab T2 war eine robuste relative Expressionsrate von *MdAP 1* festzustellen, die bis fünf Wochen (T5) nach Versuchsbeginn anstieg, zum Zeitpunkt T6 abnahm und dann wieder anstieg (T7) (Abbildung 26). Die Standardabweichung der Expression von *MdAP 1* war zu allen Probeterminen sehr stark. Zu keinem Zeitpunkt unterschieden sich die relativen Expressionsraten von *MdAP 1* signifikant voneinander (Tabelle 24).

Die Expressionsraten von *MdSOC 1* und *PcAFL 1-1* verliefen sehr ähnlich. *MdSOC 1* befand sich vom Versuchsbeginn T0 bis drei Wochen danach (T3) etwa auf einem Expressionslevel. Zum Zeitpunkt T4 folgte eine starke Zunahme bis zum

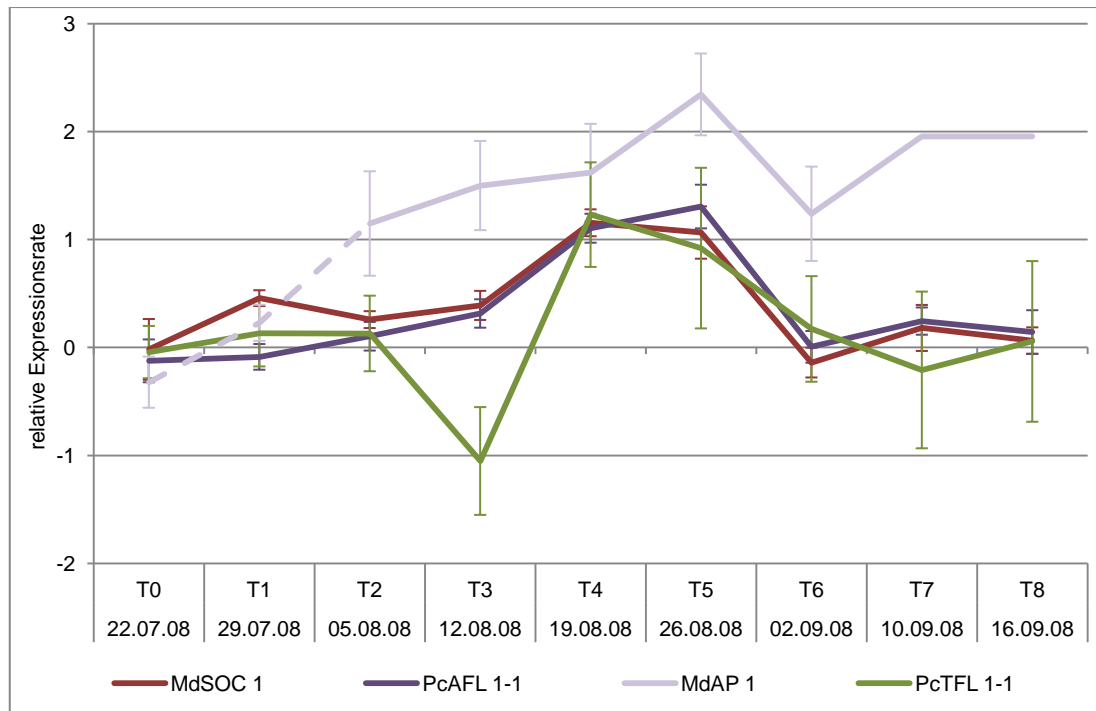
Zeitpunkt T5 und danach ein Abfall der Expressionsrate unter das Anfangsniveau an T6. Anschließend folgte wieder ein Anstieg an T7 und ein leichter Abfall zum Zeitpunkt T8 (Abbildung 26). Die Rate war an T4 und T5 signifikant höher als an den anderen Terminen (Tabelle 24).

Die Expression von *MdSOC* 1 zeigte an allen Terminen eine geringe Standardabweichung. Insgesamt betrachtet nahm die Rate von Beginn bis fünf Wochen nach Versuchsbeginn zu und danach wieder ab (Abbildung 26).

Die relative Expressionsrate von *PcAFL* 1-1 war von T0 bis T2 auf einem niedrigeren Niveau als *MdSOC* 1, verlief aber ab T3 auf demselben Level wie *MdSOC* 1 und zeigte dieselben Schwankungen wie *MdSOC* 1. Auch hier war die Standardabweichung an allen Terminen gering (Abbildung 26). Mit Ausnahme der Termine T4 und T5, an denen die Expressionsrate von *PcAFL* 1-1 signifikant höher war, gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Terminen (Tabelle 24).

Die Expressionsrate von *PcTFL* 1-1 stieg von T0 bis T2 leicht an, nahm zu T3 stark ab und zeigte dann einen starken Anstieg zu T4 und T5. Zum Zeitpunkt T7 sank die Expressionsrate unter das Anfangsniveau und stieg zum Zeitpunkt T8 wieder leicht an. Wie auch bei *MdAP* 1 ist die Standardabweichung an den einzelnen Terminen bei *PcTFL* 1-1 sehr stark (Abbildung 26). Der starke Abfall der Expressionsrate an T3 war signifikant zu den Terminen T0 bis T2, T4 und T5 (Tabelle 24).

Betrachtet man insgesamt die quantitativen Expressionsraten in Abbildung 26 so fällt auf, dass der Verlauf von *MdSOC* 1, *PcAFL* 1-1 und *MdAP* 1 mit Ausnahme an T3 in den Peaks relativ ähnlich verläuft, während *PcTFL* 1-1 einen doch deutlich anderen Verlauf hat. Insbesondere der Termin T3 ist auffallend. Aber auch die Termine T4, T5 und T7 zeigen entgegengesetzte Peaks – im Vergleich zu den blühpfördernden Genen. Besonders auffallend an diesen Terminen ist der entgegengesetzte Verlauf der Rate zu *MdAP* 1: steigt *MdAP* 1 an, fällt *PcTFL* 1-1 (T3, T5, T7); steigt *PcTFL* 1-1 an, fällt die Expressionsrate von *MdAP* 1 (T4).



**Abbildung 26: Relative Expressionsraten von *MdAP 1*, *MdSOC 1*, *PcAFL 1-1* und *PcTFL 1-1* in Knospen von Langstecklingen an ‘Williams Christ‘ Wurzeln (Folienhaus, 2008). Die Kurven zeigen die Mittelwerte der Expressionsdaten aus den Knospen eines Termins. Die Darstellung der Expression von *MdAP 1* an T0 und T1 ist gestrichelt dargestellt, da die Einzeldaten der Knospen nicht in technischer Wiederholung vorlagen. Die Pfeile geben die Standardabweichung der Werte an.**

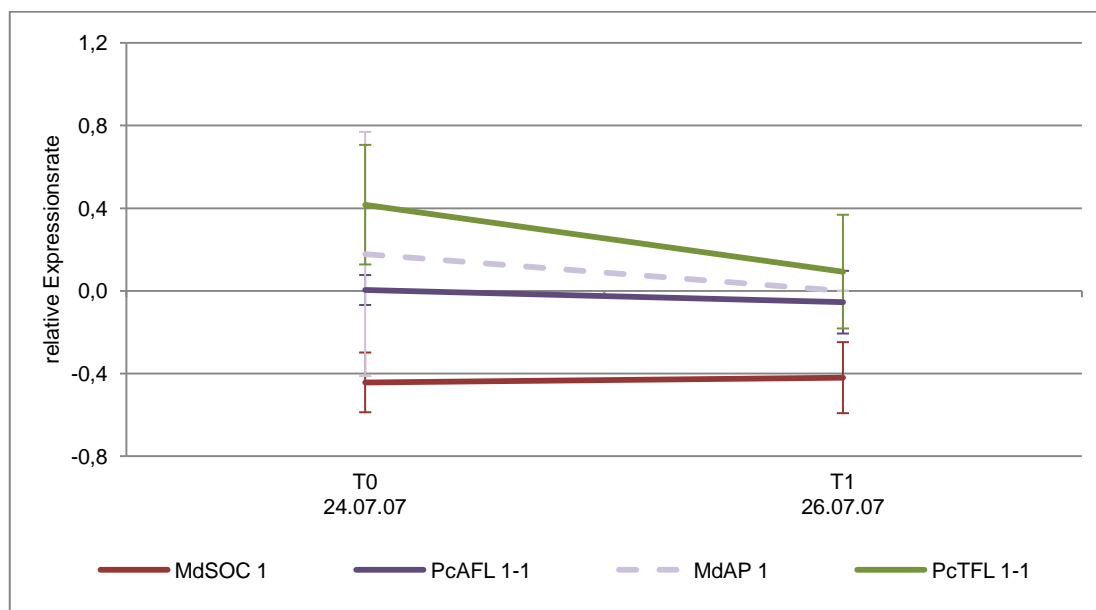
**Tabelle 24: Statistische Auswertung der Daten zu den relativen Expressionsdaten von *MdAP 1*, *MdSOC 1*, *PcAFL 1-1* und *PcTFL 1-1* in Knospen von Langstecklingen an ‘Williams Christ‘ Wurzeln (Folienhaus, 2008). Paarweise verglichen wurden die Mittelwerte zwischen den Zeitpunkten innerhalb eines Gens.**

	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<i>MdAP 1</i>	NE	NE	a	a	a	a	a	a	a
<i>MdSOC 1</i>	bd	a	ab	a	c	c	d	ad	ad
<i>PcAFL 1-1</i>	a	a	ab	b	c	c	ab	b	ab
<i>PcTFL 1-1</i>	a	a	a	b	c	ac	abc	ab	ab

\*Werte, die mit gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$ . NE: aufgrund fehlender Werte nicht ermittelt.

Da die quantitativen Expressionsraten 2008 gerade zu Beginn des Versuches sehr interessant waren und die Interpretation von *MdAP 1* sehr schwierig war, wurden die Zeitpunkte T0 und T1 der Langstecklinge von ‘Williams Christ‘ 2007 ebenfalls in einer qRT-PCR getestet. Die Knospenanzahl betrug  $n = 6$  an T0 und  $n = 4$  an T1. Auch hier war kein robuster Nachweis der *MdAP 1*-Expression möglich. Zum Zeitpunkt T0 konnte in zwei Knospen (ohne Wiederholung) *MdAP 1*-Expression

gefunden werden, an T1 war keine *MdAP 1*-Expression in den Knospen nachweisbar (Abbildung 27). Die Expressionsraten von *MdSOC 1* und *PcAFL 1-1* lagen unterhalb der Rate von *MdAP 1* und verblieben jeweils beide auf einem Level, während *PcTFL 1-1* von T0 zu T1 abnahm. Die Standardabweichungen sowohl von *PcTFL 1-1* als auch von *MdAP 1* waren hoch. Während die Expressionsraten 2007 vom Zeitpunkt T0 zu T1 bei allen Genen (außer *MdSOC 1*) abnahmen (Abbildung 27), stiegen die Raten 2008 von T0 zu T1 an (Abbildung 26). Hierbei ist allerdings zu beachten, dass es sich 2007 von T0 auf T1 um 2 Tage handelte, während 2008 der Zeitraum zwischen T0 und T1 7 Tage betrug.



**Abbildung 27: Relative Expressionsraten von *MdAP 1*, *MdSOC 1*, *PcAFL 1-1* und *PcTFL 1-1* in Knospen von Langstecklingen an ‘Williams Christ‘ Wurzeln (Folienhaus, 2007). Die Kurven zeigen die Mittelwerte der Expressionsdaten aus den Knospen eines Termins. Die Darstellung der Expression von *MdAP 1* an T0 zu T1 ist gestrichelt dargestellt, da die Einzeldaten der Knospen nicht in technischer Wiederholung vorlagen. Die Pfeile geben die Standardabweichung der Werte an.**

**Tabelle 25: Mittelwertangaben der relativen Expressionsraten von *MdSOC 1*, *PcAFL 1-1* und *PcTFL 1-1* in Knospen von Langstecklingen an ‘Williams Christ‘ Karlsruhe zum Zeitpunkt T0 (Folienhaus, 2008). *MdAP 1* konnte nicht nachgewiesen werden**

Datum	Zeitpunkt	Mittelwert (n=22)			
		<i>MdSOC 1</i>	<i>PcAFL 1-1</i>	<i>MdAP 1</i>	<i>PcTFL 1-1</i>
23.07.08	T0	0,02(±0,25)	0,03(±0,22)	0	0,01(±0,16)

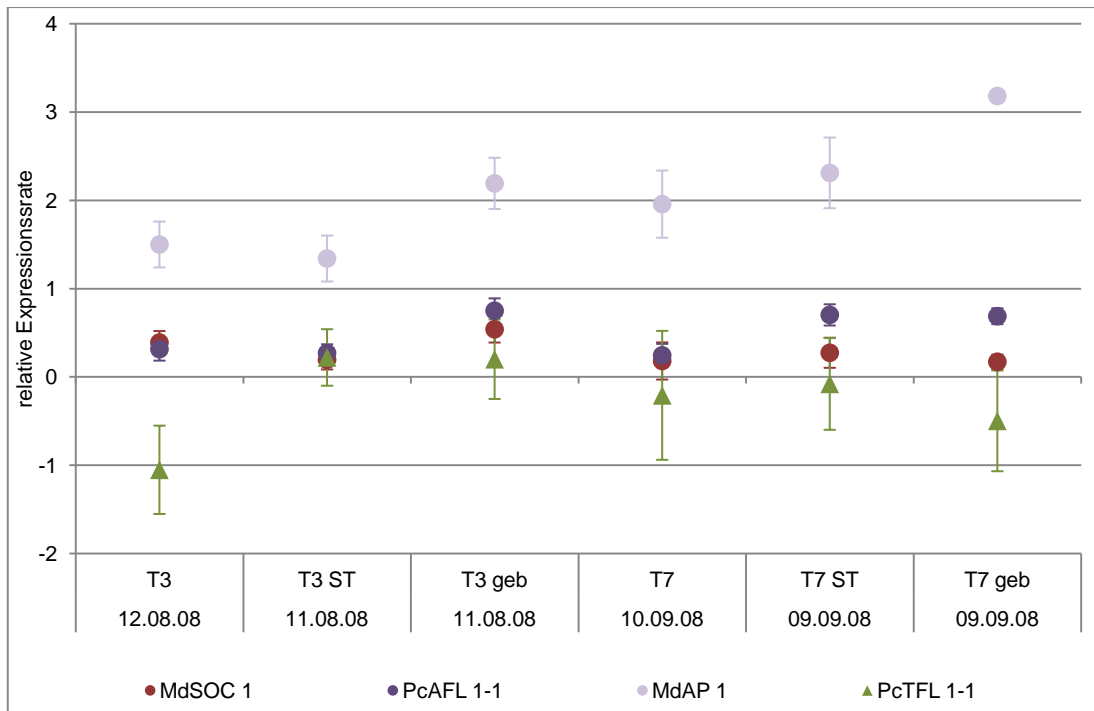
Die Knospen der Langstecklinge von ‘Williams Christ‘ Karlsruhe vom Zeitpunkt T0 wurden ebenfalls mittels qRT-PCR untersucht. Die Zahl der untersuchten Knospen



betrug  $n = 22$ . Zu diesem Zeitpunkt konnte in den Knospen keine *MdAP 1*-Expression nachgewiesen werden und die Expression von *MdSOC 1*, *PcAFL 1-1* und *PcTFL 1-1* befand sich etwa auf einem Level von 0,01 – 0,03 (Tabelle 25).

Um vergleichen zu können, wie sich das Expressionsverhalten der dargestellten Gene aus den Knospen am Steckling zeitgleich in Knospen am Baum verhält, wurden 2008 an zwei Zeitpunkten ebenfalls Knospen senkrechter Triebe (ST) aus dem oberen Kronenbereich geerntet sowie Knospen von waagrecht gebundenen Ästen (geb). Diese Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt. Verglichen werden hier die Expressionsraten 3 und 7 Wochen nach Versuchsbeginn (T3 und T7). Da zwischen den zu vergleichenden Zeitpunkten 4 Wochen liegen, sind die Ergebnisse nicht linear dargestellt. Um den Vergleich zu den Knospen der Stecklinge aus dem Folienhaus an T3 und T7 zu vereinfachen, werden diese Werte in Abbildung 28 noch einmal mit dargestellt. Die Anzahl der verwendeten Knospen ist in Tabelle 23 zu finden.

Die Expressionsrate von *MdAP 1* war zu beiden Terminen in allen Varianten höher als der Anteil der anderen Gene (Abbildung 28) und an beiden Terminen signifikant höher in den Knospen der gebundenen Äste (Tabelle 26). Zum Zeitpunkt T3 war die relative Expressionsrate von *MdSOC 1* und *PcAFL 1-1* niedriger in den Knospen der senkrechten Triebe, aber auffallend ist, dass die Expressionsrate beider Gene etwa gleich ist (Abbildung 28). *MdSOC 1* war signifikant niedriger in den Knospen der senkrechten Triebe und *PcAFL 1-1* war signifikant höher in den gebundenen Ästen (Tabelle 26). *PcTFL 1-1* wurde in den Varianten am Baum stärker exprimiert als in den Knospen der Stecklinge, befand sich aber bei den Varianten am Baum etwa auf einem Level (Abbildung 28); der Anteil von *PcTFL 1-1* war signifikant niedriger in den Knospen der Stecklinge (Tabelle 26).



**Abbildung 28: Relative Expressionsraten von *MdAP 1*, *MdSOC 1*, *PcAFL 1-1* und *PcTFL 1-1* in Knospen von Langstecklingen an ‘Williams Christ’ Wurzeln im Folienhaus, am Baum von senkrechten Trieben (ST) und waagrecht gebundenen Ästen (geb) an zwei Terminen (T3 und T7). Die Punkte zeigen die Mittelwerte der Expressionsdaten aus den Knospen eines Termins bezogen auf T0. Die Pfeile geben die Standardabweichung der Werte an.**

**Tabelle 26: Statistische Auswertung der Daten zu den relativen Expressionsdaten von *MdAP 1*, *MdSOC 1*, *PcAFL 1-1* und *PcTFL 1-1* in Knospen von Langstecklingen an ‘Williams Christ’ Wurzeln im Folienhaus (FH), am Baum von senkrechten Trieben (ST) und waagrecht gebundenen Ästen (geb) an zwei Terminen (T3 und T7). Paarweise verglichen wurden die Mittelwerte der Varianten innerhalb eines Gens.**

	T3			T7		
	FH	ST	geb	FH	ST	geb
<i>MdAP 1</i>	b	b	a	b	b	a
<i>MdSOC 1</i>	a	b	a	a	a	a
<i>PcAFL 1-1</i>	b	b	a	b	a	a
<i>PcTFL 1-1</i>	b	a	a	a	a	a

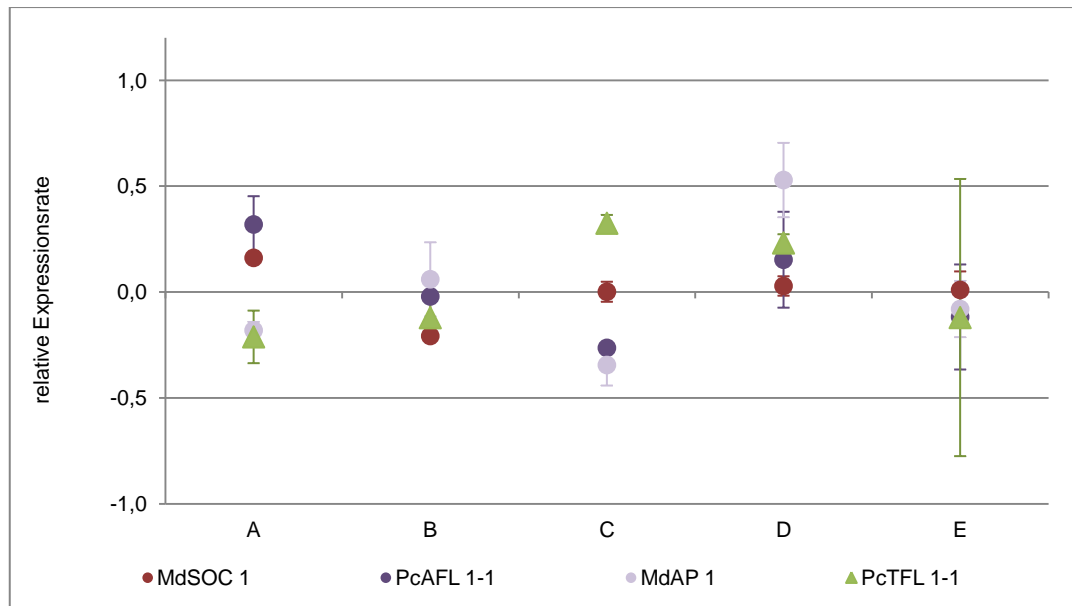
\*Werte, die mit gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$ .

Sieben Wochen nach Versuchsbeginn (T7) wurde *PcTFL 1-1* am schwächsten in den gebundenen Ästen exprimiert, aber ohne signifikante Unterschiede zwischen den Varianten (Tabelle 26). Der Anteil von *PcAFL 1-1* in den getesteten Knospen ist im Vergleich zu *MdSOC 1* an T7 deutlich stärker (Abbildung 28), wobei *MdSOC 1* keinen signifikanten Unterschied zwischen den Varianten zeigte und *PcAFL 1-1* in

den Stecklingsknospen signifikant geringer vorlag (Tabelle 26). Insgesamt betrachtet war die Standardabweichung bei *MdAP* 1 und *PcTFL* 1-1 höher als bei *PcAFL* 1-1 und *MdSOC* 1.

Im Vergleich der Zeitpunkte fällt auf, dass bei allen Varianten die Expressionsraten von *PcAFL* 1-1 und *MdSOC* 1 nicht so starken Schwankungen unterlag wie *MdAP* 1 und *PcTFL* 1-1. Die Expression von *MdAP* 1 stieg von T3 zu T7 in allen Varianten an während der Anteil von *PcTFL* 1-1 von T3 zu T7 in den Varianten am Baum abnahm (Abbildung 28).

Um aufzuzeigen, wann die Stecklinge zur Blüte induziert wurden, ist nicht nur der Verlauf der Genexpression interessant, sondern vor allem eine Interpretation der Gene in ihrer Gewichtung zueinander. Insbesondere das Verhältnis von *MdAP* 1 und *PcTFL* 1-1 zueinander könnte Aufschluss über die Blüteninduktion in den Knospen geben. Um das Verhältnis der Gene zueinander besser beurteilen zu können, sollten Daten eines definierten Knospenzustandes zu Hilfe genommen werden. In-vitro-Material von ‘Williams Christ‘ kam dafür nicht in Frage, da bei dem juvenilen Material keine *MdAP* 1-Expression nachgewiesen werden konnte. So wurden die Genexpressionsraten an fünf verschiedenen generativen Knospen von ‘Williams Christ‘ (deutlich erkennbar an ihrer Schwellung) im Winter 2009 untersucht. Die relative Genexpression dieser Knospen ist in Abbildung 29 dargestellt. In vier von fünf Knospen war die *MdAP* 1-Expression stärker als die von *PcTFL* 1-1. Deutlich erkennbar ist, dass trotz gleichem Zustand der Knospen keine einheitliche Expression der Gene in den Einzelknospen vorlag (Abbildung 29). Vergleicht man die einzelnen Blütengene mit dem Repressorgen, zeigt sich ein relativ stabiles Verhältnis im Vergleich der Knospen zueinander. Mit Ausnahme der Knospe C sind die Gene *MdAP* 1, *MdSOC* 1 und *PcAFL* 1-1 stärker als *PcTFL* 1-1 oder im Verhältnis 1:1 in den Knospen vorhanden (Tabelle 27).



**Abbildung 29:** Relative Genexpression fünf verschiedener Blütenknospen (A - E) von 'Williams Christ' geerntet von der Freifläche in Hannover/ Herrenhausen am 4.12.2009. Die Punkte zeigen die Mittelwerte der Expressionsdaten einer Knospe aus 2 technischen Wiederholungen an. Die Balken geben die Standardabweichung der Werte an.

**Tabelle 27:** Verhältniswerte der blühpfördernden Gene *MdAP 1*, *PcAFL 1-1* und *MdSOC 1* zum Repressorgen *PcTFL 1-1* in fünf verschiedenen Blütenknospen (A - E) geerntet von der Freifläche in Hannover/ Herrenhausen am 4.12.2009. Die Werte wurden gerundet.

Knospe	MdAP 1: PcTFL 1-1	PcAFL 1-1 : PcTFL 1-1	MdSOC 1 : PcTFL 1-1
A	1 : 1	3 : 1	2 : 1
B	2 : 1	1 : 1	1 : 1
C	0,2 : 1	0,3 : 1	1 : 1
D	2 : 1	1 : 1	1 : 1
E	1 : 1	1 : 1	1 : 1

Betrachtet man nun das Verhältnis von *MdAP 1* zu *PcTFL 1-1* bei den Langstecklingen von 'Williams Christ' Wurzeln 2008 im Folienhaus in Tabelle 28 fällt auf, dass dieses nicht so einheitlich war, wie das Verhältnis von *MdAP 1* zu *PcTFL 1-1* in den Blütenknospen (Tabelle 27). Die Verhältniswerte unterschieden sich zu allen Terminen deutlich voneinander. *MdAP 1* lag immer um ein Vielfaches höher in den Knospen vor als *PcTFL 1-1* (zwischen 3 bis 356-fach stärker). Insbesondere an T3 ist der Verhältniswert mit 356:1 sehr hoch. Betrachtet man dagegen die Verhältnisse der Blütengene *MdSOC 1* und *PcAFL 1-1* zu *PcTFL 1-1* haben diese deutlich mehr Ähnlichkeit zu den Werten der Blütenknospen in Tabelle 27. Das Verhältnis ist häufig ausgeglichen (1:1) mit Ausnahme an T3, hier ist ein

deutlicher Unterschied zu den anderen Werten zu beobachten (Tabelle 28). Die starken Abweichungen an T3 sind vermutlich auf das starke Absinken der relativen Expressionsrate von *PcTFL 1-1* zurückzuführen (Abbildung 26). Die Werte, dargestellt im Verhältnis der Gene zueinander, zeigten am Baum einen Unterschied zu den Verhältnissen im Folienhaus. Alle Blütengene zeigten in den gebundenen Trieben einen höheren Verhältniswert zu *PcTFL 1-1* als in den senkrechten Trieben und zum Zeitpunkt T7 auch einen höheren Wert im Vergleich zu den Langstecklingen (Tabelle 28). Die Zeitpunkte T0 und T1 lassen in ihren Verhältniswerten von *PcAFL 1-1* und *MdSOC 1* zu *PcTFL 1-1* keinen starken Unterschied zwischen den Jahren erkennen und auch nicht zwischen Karlsruhe und Wurzeln. Der Verhältniswert von *MdAP 1* zu *PcTFL 1-1* an T0 und T1 lässt keine eindeutige Aussage aufgrund der geringen Probenzahl zu, aber auch hier ähneln sich die Werte.

**Tabelle 28:** Verhältniswerte der Blütengene *MdAP 1*, *PcAFL 1-1* und *MdSOC 1* zum Repressorgen *PcTFL 1-1* gebildet aus den Mittelwerten der Expressionsraten an den Terminen 2007 und 2008 von Langstecklingen der Sorte 'Williams Christ'. Die Werte für *MdAP 1* an T0 (2007, 2008) und T1 (2008) konnten nicht in Wiederholung abgesichert werden und sind daher grau dargestellt. Die Werte stammen von Langstecklingen aus Wurzeln, mit Ausnahme des Zeitpunktes T0 K: hier werden die Daten der Langstecklinge aus Karlsruhe gezeigt. Die angegebenen Werte wurden gerundet.

Termin	<i>MdAP 1</i> : <i>PcTFL 1-1</i>	<i>PcAFL 1-1</i> : <i>PcTFL 1-1</i>	<i>MdSOC 1</i> : <i>PcTFL 1-1</i>
24.07.07 T0	1 : 1	0,4 : 1	0,1 : 1
26.07.07 T1	-	1 : 1	0,3 : 1
23.07.08 T0 K	-	1 : 1	1 : 1
22.07.08 T0	1 : 1	1 : 1	1 : 1
29.07.08 T1	1 : 1	1 : 1	2 : 1
05.08.08 T2	10 : 1	1 : 1	1 : 1
12.08.08 T3	356 : 1	23 : 1	28 : 1
19.08.08 T4	3 : 1	1 : 1	1 : 1
26.08.08 T5	27 : 1	2 : 1	1 : 1
02.09.08 T6	12 : 1	1 : 1	1 : 1
10.09.08 T7	146 : 1	3 : 1	2 : 1
16.09.08 T8	79 : 1	1 : 1	1 : 1
11.08.08 T3 ST	13 : 1	1 : 1	1 : 1
11.08.08 T3 geb	98 : 1	4 : 1	2 : 1
09.09.08 T7 ST	245 : 1	6 : 1	2 : 1
09.09.08 T7 geb	4764 : 1	15 : 1	5 : 1

Insgesamt lässt sich aus Tabelle 28 erkennen, dass sich in den Knospen sehr viel im Verhältnis zwischen *MdAP* 1 und *PcTFL* 1-1 im Versuchsverlauf (ab T2) ändert insbesondere, wenn man den Vergleich zu den Verhältniswerten in den Blütenknospen in Tabelle 27 berücksichtigt.

Die bisher gezeigten Werte sind Mittelwertberechnungen aus den beprobten Knospen eines Termins. Die Daten gaben insgesamt einen guten Überblick über die quantitative Expressionsrate der Gene, ließen aber keinen Rückschluss über die Einzelknospen am Steckling zu. Da die Quantität von *MdAP* 1 und *PcTFL* 1-1 zur Beurteilung der Blüteninduktion herangezogen werden kann, wird in Tabelle 29 dargestellt, welche der getesteten Knospen eine höhere *MdAP* 1-Expression und welche eine höhere *PcTFL* 1-1-Expression aufwiesen. Betrachtet werden die Knospen der Langstecklinge von ‘Williams Christ’ Wurzeln aus dem Folienhaus (2008). Dabei wird deutlich, dass zu Beginn des Versuches deutlich mehr Knospen eine höhere Expression von *PcTFL* 1-1 aufwiesen (T0 bis T2, Tabelle 29). Erst im Verlauf des Versuches (ab T3) nahm der Anteil der Knospen mit höherer *MdAP* 1-Expression zu. Ein Vergleich der Knospen am Baum zeigt, dass die Knospen mit *MdAP* 1-Expression an senkrechten Trieben (ST) von T3 zu T7 deutlich zunahm, während der Anteil der Knospen mit stärkerer *MdAP* 1-Expression an gebundenen Ästen schon zu T3 höher war als der Anteil der Knospen mit *PcTFL* 1-1-Expression (Tabelle 30).

Bei keinem der vier getesteten Gene konnten signifikante Unterschiede im Expressionsverhalten der einzelnen Knospenpositionen festgestellt werden.

**Tabelle 29: Quantitative Genexpression von *MdAP 1* und *PcTFL 1-1* in den Einzelknospen von ‘Williams Christ’ Wurzeln und deren Knospenposition an Langstecklingen im Folienhaus von T0 bis T8 (2008). Dargestellt ist die jeweils stärkere Expression eines Gens innerhalb einer Knospe (*MdAP 1* = lila; *PcTFL 1-1* = grün). Knospen für die keine Werte vorliegen sind mit einem X gekennzeichnet.**

Zeitpunkt	T0						T1			T2			T3			T4			T5			T6			T7			T8														
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4								
Steckling																																										
Apikal																																										
2																																										
3																																										
4																																										
5																																										
6																																										
7																																										

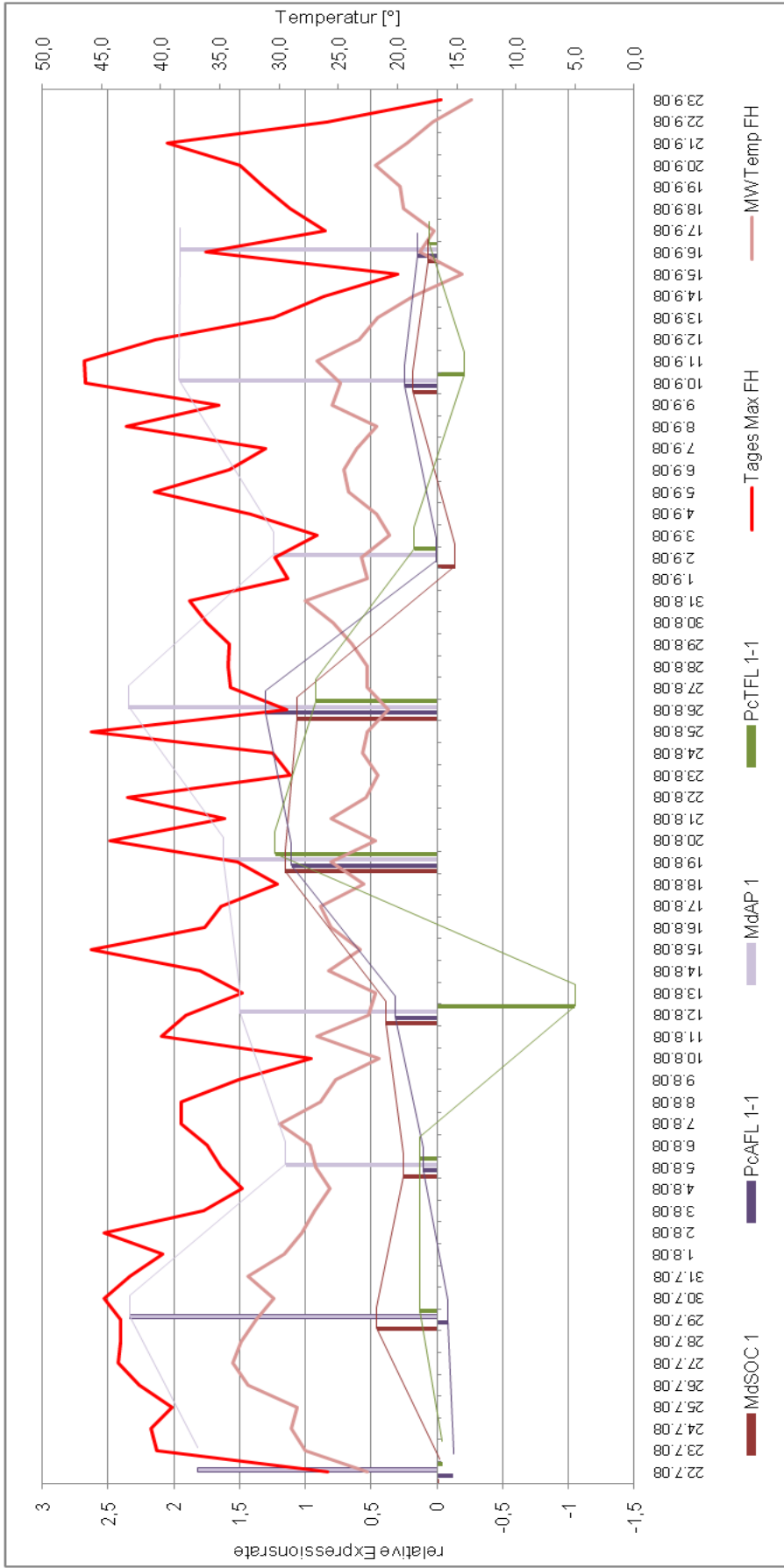
Zum Zeitpunkt T0 und T1 lag in wenigen Knospen *MdAP 1*-Expression vor, aber es gelang nicht, diese Werte in einer Wiederholung abzusichern. Diese Werte werden durch einen leeren Kasten mit lila Umrandung gezeigt. Erst ab T2 gelang es eine robuste *MdAP 1*-Expression nachzuweisen

**Tabelle 30: Quantitative Genexpression von *MdAP 1* und *PcTFL 1-1* in den Einzelknospen von ‘Williams Christ’ und deren Knospenposition an waagrecht gebundenen Ästen (geb) und senkrechten Trieben (ST) am Baum zu den Zeitpunkten T3 und T7 (2008). Dargestellt ist die jeweils stärkere Expression eines Gens innerhalb einer Knospe (*MdAP 1* = lila; *PcTFL 1-1* = grün). Knospen für die keine Werte vorliegen sind mit einem X gekennzeichnet.**

Zeitpunkt	T3 geb			T3 ST						T7 geb			T7 ST																								
	1	2	3	1	2	3	4	5	6	1	2	3	1	2	3	4	5	6																			
Steckling																																					
Apikal																																					
2																																					
3																																					
4																																					
5																																					
6																																					
7																																					

Eine mögliche Theorie der Blüteninduktion an den Langstecklingen war der Einfluss der zum Teil sehr hohen Temperaturen während der Kultur im Folienhaus. Die gemittelten Tagestemperaturen und die maximalen Temperaturhöchstwerte sind gemeinsam mit den relativen Genexpressionsraten in Abbildung 30 dargestellt. Betrachtet man den Verlauf der Gene *MdSOC 1*, *PcAFL 1-1* und *PcTFL 1-1* anhand der Trendlinie im Verhältnis zu den Temperaturen, lässt sich kein Zusammenhang zwischen Temperatur und Genexpression erkennen. Beobachtet man allerdings den Verlauf der Genexpressionsrate von *MdAP 1* so fällt auf, dass mit einem Anstieg der maximalen Temperaturwerte über 40 °C auch ein Anstieg in der relativen Expressionsrate von *MdAP 1* zu erkennen ist. Eine endgültige und klärende Aussage über das Verhalten der Genexpression im Zusammenhang mit der maximalen Tagestemperatur ließ sich aber aufgrund der Abstände zwischen den Probeterminen nicht treffen. Ein Zusammenhang der Genexpressionsraten mit der Sonneneinstrahlung ließ sich nicht erkennen (Anhang, Abbildung A 3).





**Abbildung 30:** Darstellung der relativen Genexpressionsraten von *MdAP 1*, *MdSOC 1*, *PcAFL 1-1* und *PcTFL 1-1* im Vergleich zur mittleren Tagestemperatur und den Tageshöchstwerten (°C) vom 22.07.08 bis 18.09.08 im Folienhaus an Langstecklingen von ‘Williams Christ’. Die Balken der Genexpressionsraten wurden mit einer Trendlinie versehen.

### 3.3.2 ‘Conference‘

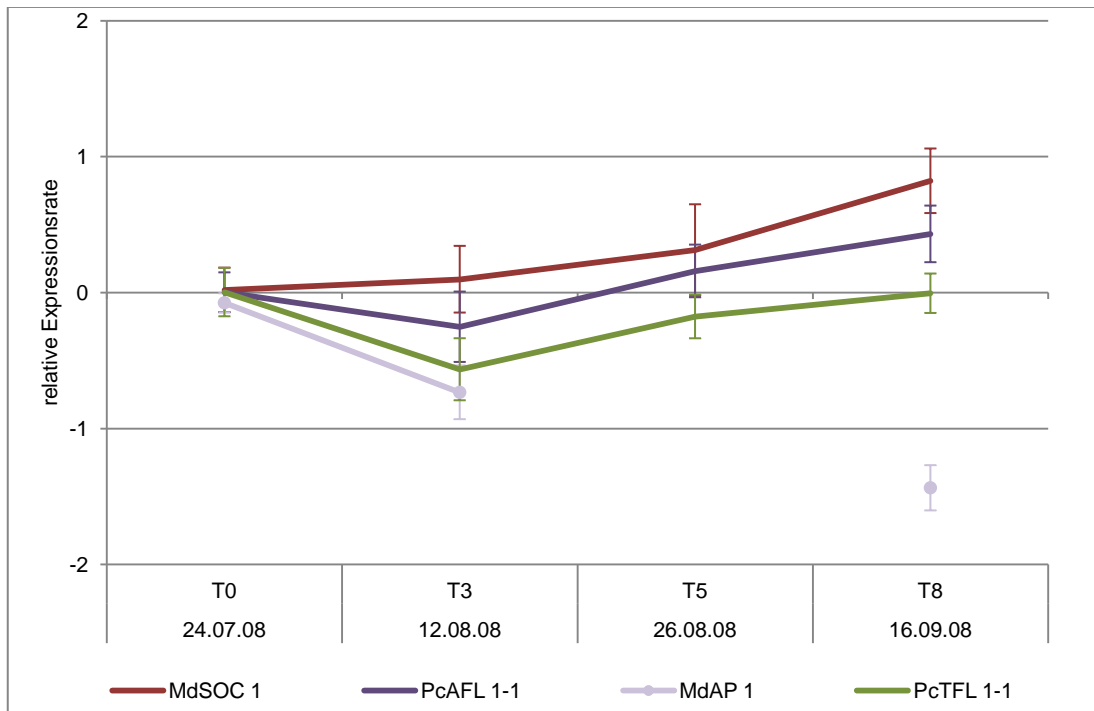
Die relativen Genexpressionsraten in den Knospen von ‘Conference‘ wurden im Abstand von 3 bzw. 2 Wochen untersucht. Die Gesamtzahl der getesteten Knospen und die Anzahl der Knospen, die für die Auswertung der qRT-PCR verwendet werden konnten, finden sich in Tabelle 31. Wie bei ‘Williams Christ‘ wurde hier aus  $\leq 28$  Knospen pro Termin RNA isoliert und daraus cDNA synthetisiert. Mit Ausnahme von T5 waren Isolation und Synthese weitestgehend erfolgreich. An T5 gelang es nur aus etwa der Hälfte der Knospen, ausreichend RNA für die cDNA-Synthese zu isolieren (Tabelle 31).

**Tabelle 31: Gesamtzahl der in der qRT-PCR getesteten Knospen an T0, T3, T5 und T8 für ‘Conference‘ Langstecklinge und senkrechte Triebe (ST) an T7 am Baum (2008) sowie die Anzahl der Knospen die für die Auswertung der einzelnen Gene herangezogen werden konnten.**

Termin		Gesamtzahl der in der qRT-PCR getesteten Knospen	Anzahl der Knospen, die zur Auswertung der einzelnen Gene gewertet werden konnten			
			<i>MdSOC</i> 1	<i>PcAFL</i> 1-1	<i>MdAP</i> 1	<i>PcTFL</i> 1-1
24.07.	T0	27	26	25	6	26
12.08.	T3	27	26	27	3	26
26.08.	T5	13	12	13	0	13
16.09.	T8	21	21	21	3	21
10.09.	T7 ST	28	-	-	24	27

Die Expressionsraten der getesteten Gene in den Knospen von ‘Conference‘ sind in Abbildung 31 dargestellt.

Die relative Expressionsrate von *MdAP* 1 lag immer unterhalb der Expressionsrate der anderen Gene und nahm zum Zeitpunkt T8 stark ab. An T5 konnte keine *MdAP* 1-Expression nachgewiesen werden. Die Raten von *MdSOC* 1, *PcAFL* 1-1 und *PcTFL* 1-1 stiegen (nach einem leichten Abfall an T3) bis zum Versuchsende an, wobei *PcTFL* 1-1 vom Versuchsbeginn bis zum Versuchsende immer unterhalb der Expressionsraten von *MdSOC* 1 und *PcAFL* 1-1 lag. Wie auch bei ‘Williams Christ‘ ist der Verlauf der Expression dieser beiden Genen etwa gleich, *MdSOC* 1 wurde aber stärker in den Knospen exprimiert als *PcAFL* 1-1. Die Standardabweichungen sind bei allen Genen und zu allen Terminen etwa gleich. Die Beobachtung, dass bei Absinken der *MdAP* 1-Expression gleichzeitig die *PcTFL* 1-1-Expression stieg, konnte hier zum Zeitpunkt T8 gemacht werden.



**Abbildung 31: Relative Expressionsraten von *MdAP 1*, *MdSOC 1*, *PcAFL 1-1* und *PcTFL 1-1* in Knospen von Langstecklingen an ‘Conference’ aus dem Folienhaus (T0, T3, T5 und T8, 2008). Die Kurven zeigen die Mittelwerte der Expressionsraten aus den Knospen eines Termins. Die Balken geben die Standardabweichung der Werte an.**

Die Untersuchung von ‘Conference’-Knospen am Baum wurde hier zum Zeitpunkt T7 an senkrechten Trieben (ST) durchgeführt und ergab eine Expressionsrate von  $-0,316 (\pm 0,15)$  für *MdAP 1* und  $-0,615 (\pm 0,27)$  für *PcTFL 1-1*. Hier zeigte sich, dass die Expression von *MdAP 1* in den Knospen am Baum stärker war als die Expression von *PcTFL 1-1*. Die Standardabweichung der Werte von *PcTFL 1-1* war sehr hoch und stärker als die der Werte von *MdAP 1*.

Bildet man für ‘Conference’ die Verhältniswerte zwischen den Blütengen und dem Repressorgen (Tabelle 32), zeigen sich bei *MdSOC 1* und *PcAFL 1-1* steigende Verhältniswerte von Termin zu Termin, während sich *MdAP 1* zu *PcTFL 1-1* gleich oder schwächer verhält. Nur in den Knospen am Baum ist *MdAP 1* stärker im Verhältnis zu *PcTFL 1-1* (Tabelle 32).

**Tabelle 32: Verhältniswerte der Blütengene *MdAP 1*, *PcAFL 1-1* und *MdSOC 1* zum Repressorgen *PcTFL 1-1* gebildet aus den Mittelwerten der Expressionsraten an den Terminen 2008 von Langstecklingen der Sorte ‘Conference’. Die angegebenen Werte wurden gerundet.**

		<i>MdAP 1</i> : <i>PcTFL 1-1</i>	<i>PcAFL 1-1</i> : <i>PcTFL 1-1</i>	<i>MdSOC 1</i> : <i>PcTFL 1-1</i>
24.07.08	T0	1 : 1	1 : 1	1 : 1
12.08.08	T3	1 : 1	2 : 1	5 : 1
26.08.08	T5	0	2 : 1	3 : 1
16.09.08	T8	0,03 : 1	3 : 1	7 : 1
10.09.08	T7 ST	2 : 1	-	-

Die Betrachtung der Einzelknospen von ‘Conference’ hinsichtlich der stärkeren *MdAP 1*- oder *PcTFL 1-1*-Expression in Tabelle 33 zeigt deutlich, dass nur sehr wenige Knospen eine stärkere *MdAP 1*-Expression im Vergleich zu *PcTFL 1-1* hatten und nur die getesteten Knospen am Baum zeigten stärkere *MdAP 1*-Expression.

**Tabelle 33: Quantitative Genexpression von *MdAP 1* und *PcTFL 1-1* in den Einzelknospen von ‘Conference’ und deren Knospenposition an Langstecklingen im Folienhaus (an T0, T3, T5 und T8) und an senkrechten Trieben (ST) am Baum zum Zeitpunkt T7 (2008). Dargestellt ist die jeweils stärkere Expression eines Gens innerhalb einer Knospe (*MdAP 1* = lila; *PcTFL 1-1* = grün). Knospen für die keine Werte vorliegen sind mit einem X gekennzeichnet.**

Zeitpunkt	T0				T3				T5				T8				T7 ST					
	Steckling	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
Position Knospe	A	X	X		X				X						X							
	2	X							X	X		X										
	3						X			X	X			X								
	4										X	X	X	X	X		X					
	5	X									X	X			X							
	6										X	X			X							
	7								X		X	X	X		X							

Betrachtet man den Verlauf der Expressionsraten von ‘Conference’ (Abbildung 31) im Vergleich zu den Expressionsraten von ‘Williams Christ’ (Abbildung 26) so fällt deutlich der Unterschied in der Expression von *MdAP 1* auf, der bei ‘Williams Christ’ zu allen Zeitpunkten höher war als bei ‘Conference’.

Vergleicht man die Verhältniswerte der Blütengene zum Repressorgen, fallen bei ‘Williams Christ’ die Schwankungen in den Werten von *MdAP 1* zu *PcTFL 1-1* auf, während dieses Verhältnis bei ‘Conference’ eher ausgeglichen schien. Im Gegensatz dazu, war das Verhältnis von *MdSOC 1* zu *PcTFL 1-1* bei ‘Conference’ ansteigend

während das Verhältnis bei 'Williams Christ' ausgeglichener schien (Tabelle 28 und Tabelle 32).

Bei der Betrachtung der einzelnen Knospen hinsichtlich ihrer Expression von *MdAP 1* und *PcTFL 1-1* gab es bei 'Conference' zu allen Zeitpunkten weniger Knospen mit einer stärkeren *MdAP 1*-Expression als bei 'Williams Christ'. Die Knospen der senkrechten Triebe am Baum zum Zeitpunkt T7 zeigten allerdings ähnliche Ergebnisse in der Anzahl der Knospen mit stärkerer *MdAP 1*-Expression bei 'Conference' und 'Williams Christ' (Tabelle 29, Tabelle 30 und Tabelle 33).

Ein statistischer Vergleich der Termine innerhalb eines Gens fand bei 'Conference' aufgrund der Zeitspanne zwischen zwei Zeitpunkten nicht statt.

---

## 4. Diskussion

### 4.1 Bewurzelung und Blütenbildung von *Pyrus communis* Sorten

#### 4.1.1 Bewurzelung

Die Bewurzelung der Stecklinge in den vorliegenden Untersuchungen zeigte von Jahr zu Jahr starke Abweichungen in den Ergebnissen. Zur besseren Übersicht sind die Bewurzelungsergebnisse (auch anderer Projekte) in Tabelle 34 zusammengefasst. Die Sorte 'Williams Christ' zeigte 2005 sowohl für die Lang- als auch für die Kurzstecklinge eine bessere Bewurzelung als 2006. Die Langstecklinge wiesen 82 % im Jahr 2005 und 2006 dagegen nur 26 % bewurzelte Stecklinge auf. Die Bewurzelung der Kurzstecklinge betrug 68 % (2005) und 41 % (2006). Damit war die Bewurzelung der Kurzstecklinge 2006 besser als die der Langstecklinge. Diese Werte sind allerdings nur bedingt vergleichbar, da zwischen 2005 und 2006 sowohl eine Änderung der Mutterpflanzenquelle als auch der Bonitur stattfand. Die Bonitur der Bewurzelung wurde 2005 als Wurzelbonitur (Abbildung 7) durchgeführt. Um das Verschulen der Stecklinge zu ermöglichen und um eine praxisnähere Beurteilung anzuwenden wurde ab dem folgenden Jahr eine Ballenbonitur (Tabelle 5) durchgeführt. Die durchschnittliche Wurzellänge der 'Williams Christ' Stecklinge von 2005 lag zwischen 10 und 12 cm (Tabelle 20). Die Ballenbonitur von 2006 (siehe 'Williams Christ', Abbildung 11) ergab für beide Varianten eine Bewurzelung mit wenig sichtbaren Wurzeln (Note 2). Im Vergleich zeigten die Stecklinge der 38-jährigen Mutterpflanzen (2005) insgesamt eine bessere Bewurzelung als die der 14-jährigen Mutterpflanzen (2006). Im Jahr 2008 zeigte sich an den Langstecklingen von 'Williams Christ' (beide Mutterpflanzenalter nun im direkten Vergleich innerhalb einer Bewurzelungskultur) eine Bewurzelung von 55 % (Wurzen) und 38 % (Karlsruhe). Die Langstecklinge von 'Conference' bewurzelten 2008 mit 6 % (Tabelle 34). Die Bewurzelung der Langstecklinge 2007 betrug 15 % für 'Williams Christ' und 27 % für 'Conference', und damit zeigten diese Ergebnisse die schlechteste Bewurzelung verglichen mit den Vorjahren.

In Tabelle 34 sind ebenfalls Ergebnisse in der Bewurzelung an Kurz- und Langstecklingen von 'Williams Christ' und 'Conference' vergangener Jahre aufgeführt. Die dargestellten Ergebnisse stammen aus Untersuchungen, die in der Abteilung Baumschule an der Leibniz Universität Hannover am Standort Ruthe durchgeführt wurden.

Das hervorragende Ergebnis von einer 80 %igen Bewurzelung an Langstecklingen von ‘Williams Christ‘ (SPETHMANN, 2002) konnte nur 2005 wiederholt werden (NGUYEN (2006) und eigene Untersuchungen). Die Annahme vorangegangener Experimente, dass Langstecklinge alter Mutterpflanzen besser bewurzeln als deren Kurzstecklinge (MEIER, 2004; NGUYEN, 2006) konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls gezeigt werden. In Übereinstimmung mit MEIER (2004) konnte gezeigt werden, dass die Langstecklinge jüngerer Mutterpflanzen schlechter bewurzeln als deren Kurzstecklinge. Vergleichend zu NGUYEN (2006) konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls gezeigt werden, dass die Langstecklinge jüngerer Mutterpflanzen besser bewurzeln als die Langstecklinge älterer Mutterpflanzen.

**Tabelle 34: Bewurzelungserfolg von *P. communis* ‘Williams Christ‘ und ‘Conference‘ an Kurz- und Langstecklingen eigener und zitierter Untersuchungen zum Vergleich.**

	Mutterpflanze*	‘Williams Christ‘				‘Conference‘
		Jung		Alt		
	Stecklingsform	Kurz	Lang	Kurz	Lang	Lang
Eigene Untersuchungen	2005	-	-	68 %	82 %	-
	2006	41 %	26 %	-	-	-
	2007	-	15 %	-	-	27 %
	2008	-	55 %	-	38 %	6 %
Zitierte Arbeiten	SPETHMANN (2002)	-	-	-	80 %	-
	SPETHMANN (2003)				57 %	-
	MEIER (2004)	71 %	33 %	54 %	67 %	-
	MBABU u. SPETHMANN (2005)	-	-	-	50 %	30 %
	NGUYEN (2006)	>70 %	>80 %	40 %	>60 %	-

\* Der Mutterpflanzenstatus ‘Alt‘ bei ‘Williams Christ‘ bezieht sich auf Bäume derselben Erwerbsanlage (Grünwettersbach/ Karlsruhe) von 35 bis 41 Jahre (2002 – 2008); ‘Jung‘ bezieht sich auf 10-jährige Bäume (MEIER, 2004), 15-jährige (NGUYEN, 2006) bzw. 14 – 16 Jahre alte Bäume (eigene Untersuchungen). Die Mutterbäume von ‘Conference‘ waren 19 – 20 Jahre alt (eigene Untersuchungen) und unbekannter Herkunft bei MBABU und SPETHMANN (2005)

Die Ergebnisse der Bewurzelungsqualität in der Ballenbonitur (Kapitel 3.1) zeigten für ‘Williams Christ‘ überwiegend eine Bewurzelung, mit wenigen sichtbaren Wurzeln (siehe auch MEIER, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden die Stecklinge vor der Bonitur bereits überwintert, und es ist anzunehmen, dass eine Bewurzelung dieser Qualität zum Überleben der Pflanzen ausreichend ist. Da sich

---

diese Beobachtung in jedem Jahr wiederholte ist anzunehmen, dass der Ballen bei ‘Williams Christ‘ erst mit der Zeit stärker durchwurzelt. Das unterschiedliche Mutterpflanzenalter scheint für die Bewurzelungsqualität von ‘Williams Christ‘ keine Rolle zu spielen. Die Qualität der Ballenbonitur von ‘Conference‘ und ‘Vereins Dechant‘ war nach dem verwendeten Notensystem 2007 und 2008 etwas besser als bei ‘Williams Christ‘.

Tabelle 34 zeigt deutlich wie variabel - unabhängig von der Stecklingsform und dem Mutterpflanzenalter - der Bewurzelungserfolg von Jahr zu Jahr und auch innerhalb eines Versuchsjahres sein kann. Die Bewurzelungsergebnisse der Stecklinge von ‘Williams Christ‘ bei NGUYEN (2006) und der eigenen Untersuchungen 2005 wurden im selben Zeitraum ermittelt. Alle Stecklinge dieser beiden Versuche wurden zur selben Zeit geerntet, gleich behandelt und im gleichen Substrat gesteckt. Der einzige Unterschied war hier nur im Standort der Stecklinge innerhalb des Folienhauses zu finden. Diese Ergebnisse machen klar, dass der Bewurzelungserfolg nicht nur von einem funktionierenden Vermehrungssystem abhängt, sondern dass vielmehr eine Fülle von Faktoren die Bewurzelung beeinflusste.

Ein Einfluss der Stecklingsposition auf die Bewurzelung der Langstecklinge ist im vorliegenden Fall vermutlich vernachlässigbar, da es sich bei allen Stecklingen um senkrechte Triebe aus dem oberen Kronenbereich handelte. Ebenso war die Behandlung der Stecklinge in jedem Jahr gleich. Da es sich bei dem Vermehrungssystem bzw. der Wuchsstoffbehandlung um ein bewährtes System handelt (Kapitel 2.1.2) ist ein diesbezüglicher Einfluss wohl auch vernachlässigbar. TWORKOSKI und TAKEDA (2007) beschreiben die Bewurzelung von Pfirsich-Stecklingen in Abhängigkeit von der Gabe der Auxinkonzentration, und der Beschaffenheit des Stecklings (hardwood oder semi-hardwood) und auch des endogenen Auxin- und Cytokiningehaltes. Sie konnten in Pfirsichstecklingen eine Abnahme des endogenen Auxingehaltes 102 Tage nach Blühbeginn feststellen. Da die Erntetermine der vorliegenden Untersuchungen nicht in Zusammenhang mit der Vollblüte standen, sondern ihren Ursprung in den Erfahrungswerten einer guten Bewurzelung bei Ernte um den 20. Juli haben, können die endogenen Auxingehalte in den unterschiedlichen Ergebnissen natürlich eine Rolle spielen. Vorausgesetzt der Auxingehalt bei Birnen verändert sich ebenfalls nach der Vollblüte. Auch das



vorherrschende Klima insbesondere während der ersten Tage nach der Ernte spielt eine Rolle. Nach mündlicher Aussage durch W. Huhn hat sich durch die Erfahrung vieler Jahre gezeigt, dass starke Hitze während der ersten Tage im Fog die Wurzelbildung an Stecklingen begünstigt. Nach HARTMANN et al. (2001) erfolgt die Wurzelinitiation während der ersten Tage nach dem Stecken. EREZ und YABLOWITZ (2003) beschreiben eine Temperatur von 25 °C im Bewurzelungsmedium nachteilig für Auxin-behandelte Pfirsichstecklinge, HOWARD (1986) beschreibt eine Substrattemperatur zur Bewurzelung von Obstbaumstecklingen als optimal zwischen 20 und 30 °C und ROCHA CORREA und FETT-NERO (2004) geben für *Eucalyptus* Stecklinge eine optimale Bewurzelungstemperatur von tagsüber 30 °C an.

Die Temperaturerfassung 2007 konnte aufgrund technischer Probleme der Messfühler in der hohen Luftfeuchtigkeit in den ersten Tagen nicht aufgezeichnet werden, aber die Lufttemperaturen im Folienhaus lagen zwischen 20 und 25 °C (notierte Werte). Im Jahr 2008 lagen die Temperaturen der ersten Tage deutlich höher mit 25 bis 35 °C (Abbildungen A1 und A2 im Anhang) und die Bewurzelung 2008 war deutlich besser als 2007. Die günstigen Temperaturen während der ersten Tage der Wurzelinitiierung könnten also entscheidend für den Bewurzelungserfolg gewesen sein.

Der größte Einfluss geht von den Mutterpflanzen aus, so wird die Bewurzelung von Stecklingen beeinflusst von der Vitalität der Reiser, dem Ernährungs- und Entwicklungszustand der Mutterpflanze und dem Einfluss der Photoperiode in den Wochen vor der Stecklingsernte (SMITH und WAREING, 1972). Vermutlich ist dies genau der Aspekt, der für die unterschiedlichen Ergebnisse in der Bewurzelung der Stecklinge verantwortlich war. Die Vegetationszeit vor der Ernte der Stecklinge ist vermutlich ausschlaggebend für deren Reaktion während der Bewurzelung.

Ein Aspekt den man nicht vernachlässigen darf, über den aber wenig bekannt ist, ist der Transport der Stecklinge. Das Stecken sollte immer zeitnah nach der Ernte erfolgen (SPETHMANN, 2000), aber insbesondere die Stecklinge von 'Williams Christ' mussten mehrere Stunden transportiert werden. Es wurde versucht, die Stecklinge während des Transportes stets feucht und kühl zu halten (über nasse Laken, Klimaanlage und mit Eis gefüllte Eimer im Innenraum des VW-Busses) um eine Überhitzung während des Transportes im Hochsommer zu vermeiden. Dennoch waren die Stecklinge neben den Temperaturschwankungen auch anderen

Stressbedingungen ausgesetzt. Dazu gehören natürlich in erster Linie der Schnitt der Stecklinge sowie die Lagerung während des Transportes und auch das anschließende Stecken unter Folienhaus Bedingungen (feuchte Wärme und ständiger Nebel).

Ebenfalls wichtig ist natürlich das Klima, das während der Bewurzelung auf die Stecklinge einwirkt. Zwar konnte hier über das Fogsystem in jedem Jahr eine Versorgung mit 100%iger Luftfeuchtigkeit (und somit ausreichend Wasser) sicher gestellt werden, aber die Temperaturen im Folienhaus während der Bewurzelung waren natürlich wetterabhängig. ZALESNY et al. (2005) haben bei Pappelstecklingen die Temperaturen im Substrat untersucht und herausgefunden, dass bei einer Temperatur die 10 °C nicht unterschreitet, für die Wurzelinitiierung höhere Temperaturen (14 °C) nötig sind, als für das folgende Wurzelwachstum. So hindern hohe Substrattemperaturen bei Pappel die Wurzeln eher am Wachstum.

Vergleicht man die Bewurzelung der Stecklinge aus dem Folienhaus mit der der Stecklinge aus kontrollierten Temperaturbedingungen zeigt sich, dass die Bewurzelung im Folienhaus nur für 'Williams Christ' Wurzeln besser war. Die Stecklinge von 'Williams Christ' Karlsruhe und 'Conference' bewurzelten unter kontrollierten Temperaturbedingungen von 28 °C besser. Betrachtet man die Bewurzelungsqualität der Sorten in der Klimakammer, zeigt sich aber das gleiche Ergebnis wie bei der Bewurzelung der Stecklinge im Folienhaus (Abbildung 16 und Abbildung 17). Insgesamt wird deutlich, dass für eine Bewurzelung der Birnenstecklinge eine Temperatur mit tagsüber 28 °C durchaus ausreichend ist. Ebenso deutlich wird hier aber auch die unterschiedliche Reaktion der Sorten 'Williams Christ' (Wurzeln) und 'Conference' sowie das unterschiedliche Mutterpflanzenalter der Bäume von 'Williams Christ' aus Wurzeln und Karlsruhe. Hier könnte eine Erklärung für die unterschiedliche Bewurzelung der Langstecklinge junger und alter Mutterpflanzen zu finden sein: Langstecklinge alter Mutterpflanzen benötigen geringere Temperaturen als Langstecklinge jüngerer Mutterpflanzen. Eine Erklärung könnte hier aber natürlich auch „nur“ in den unterschiedlichen Standorten und damit den unterschiedlichen klimatischen Einflüssen vor der Ernte der Stecklinge zu finden sein.

### 4.1.2 Blütenbildung

Neben der Bewurzelung der Stecklinge konnte in jedem Jahr auch eine Blütenbildung im folgenden Frühjahr beobachtet werden. De facto handelte es sich bei den geernteten Stecklingen von ‘Williams Christ’, ‘Conference’ und ‘Vereins Dechant’ um senkrechte Triebe aus dem oberen Kronenbereich und damit nach Literaturangaben um (vorerst) nicht blühende Reiser. Es ist davon auszugehen, dass am Baum selber zum Zeitpunkt der Stecklingsernte an den tragenden Ästen bereits eine Induktion der Blüte stattfand (FEUCHT, 1982; HILKENBÄUMER, 1964; HANKE 1981; HANKE et al., 2007).

Die Blütenbildung in den vorliegenden Untersuchungen wurde verstärkt an den Langstecklingen von ‘Williams Christ’ festgestellt. Es war zu beobachten, dass die Stecklinge der jüngeren Mutterpflanzen (Wurzen) stärkere Blütenbildung zeigten als die der älteren Mutterbäume (Karlsruhe). Die Sorte ‘Conference’ zeigte im Vergleich eine wesentlich geringere Blütenbildung (obwohl sie nach FEUCHT (1982) und HILKENBÄUMER (1964) als blühwillig gilt) und an ‘Vereins Dechant’ fanden sich gar keine Blüten (Tabelle 21).

Die Blütenbildung an den Langstecklingen von ‘Williams Christ’ betrug 11 % (2005) und 18 % (2006) und war in beiden Jahren höher als die Blütenbildung an den Kurzstecklingen (8 % im Jahr 2005 und 11 % im Jahr 2006), (Tabelle 21). Die höhere Blütenbildung an Langstecklingen im Vergleich zu Kurzstecklingen von ‘Williams Christ’ wurde auch bei MEIER (2004) und MBABU UND SPETHMANN (2006) beobachtet. NGUYEN (2006) hat diese Beobachtung an Langstecklingen junger Mutterpflanzen ebenfalls beobachtet nicht jedoch an Langstecklingen alter Mutterpflanzen. Da auch in der vorliegenden Arbeit in den Jahren 2005 und 2006 eine höhere Blütenbildung an Langstecklingen von ‘Williams Christ’ gezeigt werden konnte, wurde in folgenden Versuchen auf die Verwendung von Kurzstecklingen verzichtet. Im Hinblick auf die bis dahin erzielten Ergebnisse wurden 2007 und 2008 Versuche in größerer Stückzahl der Langstecklinge mit den Sorten ‘Conference’ und ‘Williams Christ’ durchgeführt.

Die Sorte ‘Williams Christ’ Wurzen zeigte 2007 die höchste Blütenbildung mit 80 %, während die Blütenbildung bei ‘Conference’ 3 % betrug. Im Jahr 2008 betrug die Blütenbildung von ‘Williams Christ’ Wurzen 28 % und war deutlich höher als die Blütenbildung von ‘Williams Christ’ Karlsruhe (15 %) und ‘Conference’ (3 %).

Die Blütenbildung von ‘Conference‘ sowie ‘Williams Christ‘ Karlsruhe unter kontrollierten Temperaturbedingungen betrug ebenfalls 3 % und die von ‘Williams Christ‘ Wurzeln betrug 11 %.

KLEINSCHMITT et al. (1980) beschreiben die Blüteninduktion an Fichte und Douglasie unter Hitzestressbedingungen. Es wurden 12- bis 15-Jahre alte Bäume aus dem Freiland mit dem Bagger ausgehoben, in Container gesetzt und in ein Folienhaus mit z.T. über 35 °C gebracht. Im darauffolgenden Jahr bildeten beide Sorten männliche und weibliche Blütenknospen, während die Kontrollbäume im Freiland gar keine Blüten (Douglasie) oder bedeutend weniger Blüten (Fichte) ausbildeten. Diese Ergebnisse wurden auf den Hitze- und Trockenstress der Bäume im Folienhaus zurückgeführt. Die Pfropfreiser stammten ursprünglich aus den Kronen von alten Bäumen und waren aufgrund des Alters vermutlich bereits in einem reproduktiven Stadium.

Um die Theorie der Blüteninduktion durch Hitze mit eindeutig juvenilem Material zu testen, wurden mit Beginn der Vermehrungsphase im Sommer 2007 etwa 50 getopfte, einjährige Apfelsämlinge mit in das Folienhaus gestellt um einen möglichen Einfluss der Temperatur (auch in Verbindung mit der hohen Feuchtigkeit) auf die Blüteninduktion zu testen. Die Sämlinge wurden freundlicherweise durch A. Peil vom JKI Pillnitz zur Verfügung gestellt. Wie einleitend erwähnt, befinden sich Apfelsämlinge zwischen dem 77. und dem 122. Nodium in der Transitionsphase (HANKE et al., 2007) und im Durchschnitt hatten die hier getesteten Sämlinge etwa 30 Nodien. Keiner dieser vegetativen Sämlinge bildete im nächsten Frühjahr eine Blüte aus (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Bedingungen in der Klimakammer (mit einer hohen relativen Luftfeuchtigkeit durch den Fog, Langtagbedingungen und eine konstante Temperatur von 28 °C) offenbar ausreichend für eine Blütenbildung an den Langstecklingen waren und nicht wie anfangs vermutet, diese durch die hohen Temperaturen von z.T. >40 °C im Folienhaus verursacht wurden. Dies wird unterstützt, durch die ausgebliebene Blütenbildung an den Apfelsämlingen. Vergleichend zu KLEINSCHMITT et al. (1980) wird vermutet, dass es sich bei den Birnenstecklingen der vorliegenden Untersuchungen um bereits adultes Material handelte.

---

Die Blütenbildung in der Klimakammer war 2008 insgesamt niedriger als unter den Bedingungen im Folienhaus (Tabelle 21). Die mittleren Tagestemperaturen im Folienhaus lagen im Zeitraum Juli bis September 2008 etwa zwischen 15 bis 34 °C. WERTHEIM (2001) gibt als optimale Wärmeverhältnisse für die Blüteninduktion bei Birne 20 °C an. Das könnte bedeuten, dass eine konstante Temperatur von 28 °C möglicherweise zu hoch für die Blüteninduktion war. Vergleicht man die Temperaturen mit dem Jahr 2007 (mit einer Blütenbildung von 80 %) so lagen die mittleren Tagestemperaturen von Juli bis August hier zwischen 20 und 31 °C und bildeten damit nicht so einen großen Temperaturbereich wie 2008 (die Angaben zur Aufzeichnung der Temperaturen finden sich detailliert im Anhang).

Obstbäume und besonders Birnenbäume sind in ihrem Ertragsverhalten an die jeweiligen Lichtverhältnisse angepasst und die Blüteninduktion bei Birne ist an günstige Wärme- und Lichtverhältnisse gebunden (FEUCHT, 1982). Nach WERTHEIM et al. (2001) reguliert die Temperatur die Dormanz und die Blütezeit, was im Wesentlichen Auswirkungen auf die Vegetationszeit hat.

Von den blühenden Stecklingen in den vorliegenden Untersuchungen waren in jedem Jahr auch Stecklinge unbewurzelt. Hier fielen 2007 insbesondere die Stecklinge der Sorte 'Williams Christ' Wurzen auf. Die Blütenbildung lag insgesamt bei 80 % und 66 % der Stecklinge waren unbewurzelt (Abbildung 20). Da es in jedem Jahr und unabhängig von der Gattung oder Sorte zu unbewurzelten aber dennoch blühenden Stecklingen kam, ist davon auszugehen, dass bei hinreichender Versorgung der Reiser (die offensichtlich im Fog gegeben war) eine einmal induzierte Blütenbildung irreversibel war und auch keine Bewurzelung voraussetzte. In den Jahren 2005 und 2007 fiel bei 'Williams Christ' auf, dass die Langstecklinge entweder gut bewurzelten (2005 mit 82 %, Blüte 11 %) oder viele Blüten bildeten (2007 mit 80 %, Bewurzelung 15 %). Im Hinblick auf die Ergebnisse der Blütenbildung an den Langstecklingen in den Jahren 2006 (18 %) und 2008 (28 % und 15 %) ist die Ursache hier vermutlich in einer Ausnahmesituation 2007 zu finden. Dieses Jahr gilt allgemein als schlechtes Bewurzelungsjahr. Schaut man sich die Ergebnisse der Bewurzelung und der Blütenbildung über alle Jahre an, entsteht der Eindruck, dass sich die Blütenbildung der Langstecklinge in einem relativ konstanten Bereich bewegt (für 'Williams Christ' zwischen 11 und 28 %, für 'Conference' 3 %),

während die Ergebnisse in der Bewurzelung von Jahr zu Jahr stark schwankend waren.

Vergleicht man 2008 die Ergebnisse in der Blütenbildung an den Langstecklingen mit der Blüte der Triebe am Baum wird deutlich, dass die Sorte 'Williams Christ' stark an den senkrechten Trieben blühte, während die Sorte 'Conference' nur wenige Blüten an den senkrechten Trieben aufwies (Abbildung 22 und Abbildung 23). Diese Beobachtung deckt sich mit der Blütenbildung im Folienhaus und lässt vermuten, dass es sich bei den geernteten Stecklingen um adultes Material handelte, was sich dann auch in den schwankenden Bewurzelungsergebnissen äußerte. Nach SPETHMANN (2000) sind vegetative Stecklinge am besten geeignet, da Blütenknospen am Steckling den Bewurzelungserfolg reduzieren.

Auch in den Vorjahren zeigten viele senkrechte Triebe am Baum vom 'Williams Christ' Wurzeln eine starke Blütenbildung und gegenüberstellend zur Blüte an den Stecklingen aus dem Folienhaus stellt sich hier die Frage, warum dann nicht mehr Stecklinge von 'Williams Christ' nach der Bewurzelung Blüten zeigten? Vergleichend zu den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen, insbesondere im Jahr 2007, entsteht hier der Eindruck, dass die Blütenbildung der Stecklinge deutlich höher wäre, wenn sie ihre Kraft oder Reserven nicht in die Bewurzelung investieren müssten. Das erklärt möglicherweise, warum in jeder Saison auch unbewurzelte, blühende Stecklinge zu bonitieren waren.

Wie bei der Bewurzelung muss auch hier der Einfluss der Mutterpflanze in Betracht gezogen werden. Vergleicht man die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen mit SPETHMANN, 2002 und MEIER, 2004 so lässt sich keine eindeutige Aussage darüber treffen, ob nun die Langstecklinge älterer oder jüngerer Mutterpflanzen eine bessere Blütenbildung zeigten. In der vorliegenden Arbeit war jedoch die Blütenbildung an den Stecklingen jüngerer Mutterpflanzen höher als an den Langstecklingen älterer Mutterpflanzen. Die einwirkenden Parameter auf die Mutterbäume während der Vegetation vor der Stecklingsernte sind natürlich dieselben wie für den Bewurzelungserfolg beschrieben (Kapitel 4.1.1). COSTES et al. (2004) geben an, dass wenig Fruchtbehang im Folgejahr das Wachstum des Baumes erhöht und es zu einem Ungleichgewicht zwischen vegetativem Wachstum und Fruchtbehang kommt (daraus resultierend dann auch ein unregelmäßiger Ertrag).

FEUCHT (1982) beschreibt die einzelnen (waagrecht und senkrecht) Triebe eines Baumes als individuell -z.B. in ihrer Nährstoffversorgung- und somit nicht miteinander vergleichbar. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden nicht nur verschiedene Triebe eines Baumes sondern mehrerer Bäume geerntet, so dass sich dieser Faktor auch ungleich erhöhte.

Vertikale Triebe aus der oberen Krone - wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden - entstehen bei der natürlichen Kronenentwicklung und dienen der Stammverlängerung. Dieses Wachstum wird bei Kernobst oft erst nach 20 Jahren eingestellt und bei manchen Sorten auch im hohen Alter nicht (HILKENBÄUMER, 1964). Die Triebe unterliegen also erst mal nur dem Wachstum, und erst wenn sich diese Triebe neigen, werden sie auch Blüten und Früchte bilden (HILKENBÄUMER, 1964). COSTES et al. (2004) geben an, dass die apikale Dominanz bei jungen Birnen sehr stark während des monopodialen Wachstums ist. Vertikal wachsende Triebe aus dem oberen Kronenbereich können eine beachtliche Länge erreichen und aufgrund der ausgeprägten Apikaldominanz der Terminalknospe werden keine Seitentriebe gebildet (FRIEDRICH et al., 1978). Die Triebspitzen hemmen die Blütenbildung in den benachbarten Knospen. Die Ursache für diese Hemmung wird durch einen starken Auxinstrom und den Transport von Abscisinsäure jeweils von der Spitze in Richtung Stamm hervorgerufen. Sind die Triebspitzen allerdings geschwächt, können die Seitenknospen zur Blüte angeregt werden (FEUCHT, 1982).

COSTES et al. (2004) beschreiben an jungen veredelten Birnen eine Zunahme der sylleptischen Äste (Seitentriebe) bei gleichzeitiger Abnahme der apikalen Dominanz. Die apikale Dominanz „stoppt“ nach einer starken Wachstumsphase, und es entstehen Seitenäste (gefiederter Wuchs). Mit Zunahme der Bildung von Seitenästen wurde ein Anstieg der Blütenzahl beobachtet. Mit der Entwicklung der Seitenästen wird eine Zunahme der aktiven Meristeme innerhalb eines Baumes vermutet, und das erhöht die Konkurrenz zwischen den Meristemen um Kohlenhydrate und Nährstoffe. Die dann wieder folgende Abnahme in der Bildung von Seitenästen ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Nummer der aktiven Meristeme ihr Maximum erreicht hat. Es werden holzige Strukturen aufrecht erhalten und die verschiedenen Achsen am Baum konkurrieren. Eine andere Vermutung ist, dass der Wechsel zwischen apikalem und lateralem Wachstum durch eine Änderung in der

Konzentrationen zwischen Kohlenhydraten und Phytohormonen oder zwischen Phytohormonen in den Schossen hervorgerufen wird (COSTES et al., 2004).

Obstbäume brauchen zur Regulierung der Blüteninduktion aufgrund ihrer Größe und der Distanzen zwischen verschiedenen Wirkorten sogenannte ‘longdistance signals‘ (LDS) und für diese Signale sind die Pflanzenhormone die wahrscheinlichsten Kandidaten. So sind manche Gibberelline und Auxin als Inhibitoren und Cytokinine als Förderer in die Blüteninduktion involviert und stehen in Interaktion zueinander (BANGERTH, 2009). Versuche haben gezeigt, dass in der Auxin-Cytokinin Interaktion mit schwächerem Cytokininstrom eine Blütenknospenbildung unterdrückt wird. Entfernt man die Sprossspitze der Pflanze, wird der Auxinstrom schwächer während der Cytokininstrom zunimmt und Blütenknospenbildung induziert wird (BANGERTH, 2008).

Ein hoher Auxingehalt hemmt die Blütenbildung und das Herunterbinden senkrecht gewachsener Triebe bewirkt eine Veränderung im Hormonhaushalt und die Blütenbildung wird angeregt (SCHUMACHER, 1989; SANYAL und BANGERTH, 1998; WERTHEIM et al., 2001). Für die vorliegenden Untersuchungen ist anzunehmen, dass durch den Schnitt der Stecklinge bei der Ernte, der Hormonhaushalt im senkrechten Trieb aus dem Gleichgewicht geriet. Hier lässt sich vielleicht eine Erklärung für die unterschiedliche Blütenbildung an den Stecklingen im Vergleich zu den Trieben am Baum von ‘Williams Christ‘ finden. Die Triebe am Baum wurden in ihrer Entwicklung nicht gestört, während die Stecklinge sowohl durch den Schnitt, als auch durch den Transport und die Kultur im Fogsystem gestresst wurden und somit eine Veränderung im Hormonhaushalt stattfand.

COSTES et al. (2004) vermuten, dass die Beziehung zwischen vegetativem Wachstum und Blütenbildung bei Birnen nicht nur ein Antagonismus verschiedener Hormongehalte ist, sondern es sich vielmehr um ineinandergreifende Prozesse handelt. Was insgesamt erklärt, warum bestimmte immer gleiche Voraussetzungen wie gleicher Stammdurchmesser, die Anzahl der Seitenäste, etc. nicht ausreichen um den Schalter zur Blütenbildung einfach umzulegen (COSTES et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wird diesbezüglich auch deutlich, dass die Sorte bei der Blüteninduktion von Birne eine große Rolle spielt.



Im Gegensatz zu *A. thaliana* oder anderen 1- und 2-jährigen Pflanzen ist die Blüte an Bäumen kein einmaliger Vorgang, sondern wird nach Erreichen der reproduktiven Phase von Jahr zu Jahr wiederholt. Der Baum muss „haushalten“, und er ist in der Lage die Blüteninduktion seiner Knospen zu regulieren, während krautige Pflanzen aufgrund ihrer geringeren Lebenszeit möglichst alle Meristeme zur Blüte induzieren (GOLDSCHMIDT und SAMACH, 2004; BANGERTH, 2009). So konnte an adulten subtropischen Bäumen gezeigt werden, dass ganze Äste vegetativ blieben und erst nach einem starken exogenen Stimulus (niedrige Temperatur) die Blüte induziert wurde. An *Citrus* wurde gezeigt, dass nur die außen liegenden Knospen durch einen Stimulus zum Blühen kamen, während die inneren (obwohl am älteren Holz) nicht empfänglich waren. Wurden die Bäume zurückgeschnitten, wurden auch einige innenliegende Knospen zur Blüte umgestimmt (BANGERTH, 2009). Mango erhält einen erheblichen Anteil der Knospen im vegetativen Zustand auch wenn genügend Blühstimulus vorliegt (BANGERTH, 2009).

Vieles ist bei der Blüteninduktion an perennierenden Pflanzen unbekannt und spekulativ. Man kann natürlich anhand der Vorgänge in krautigen Pflanzen Vermutungen für den Hormonhaushalt von Bäumen treffen, aber man sollte daraus nicht automatisch dieselben Annahmen ableiten (BANGERTH, 2008 und 2009).

## 4.2 Blütendifferenzierung und Blüteninduktion von *Pyrus communis* Sorten

### 4.2.1 Blütendifferenzierung

Bei *P. communis* 'Williams Christ' sollten neben den Genexpressionsanalysen zur Blüteninduktion 2008 die histologischen Untersuchungen zur Blütendifferenzierung zur Eingrenzung zeitlicher Abfolgen herangezogen werden. Dabei war der Zeitpunkt der ersten morphologischen Veränderungen in den Knospen an den Langstecklingen hier von besonderem Interesse. Die Ernte der Knospen bezog sich wie bei den Untersuchungen zur Genexpression auf die apikale Knospe sowie die Positionen zwei bis sieben am Steckling. Vergleichend wurde auf mikroskopische Aufnahmen an Apfel zurückgegriffen, da keine histologischen Untersuchungen an Birne vorlagen. Hierbei kam es zu Abweichungen in der Beurteilung der Entwicklungsstadien des Meristems, da es offensichtlich trotz der nahen familiären Verwandtschaft von Apfel und Birne Abweichungen in der Morphologie der beginnenden Blütendifferenzierung gibt. CARRERA (1982) beschreibt die Blütendifferenzierung bei Birne von Mitte Juni bis Ende Juli, abhängig von der Sorte, dem Standort und dem jahreszeitlichen Verlauf. Der Zeitpunkt variiert zudem mit der Position des Holzes, so differenzieren Knospen an schwach wachsenden Ästen eher Blüten aus, als an stark wachsenden Ästen. Die erste morphologische Veränderung ist die Verbreiterung des Apex verbunden mit der Bildung einer konvexen Form. Dann folgte eine Verlängerung des Apex in eine zylindrische Form. Nach FEUCHT (1982) und FOSTER et al. (2003) erfolgt die Blütendifferenzierung unmittelbar nach der Blüteninduktion und ist 2 bis 3 Wochen später morphologisch erkennbar. Ausgehend von diesen Angaben wurde erwartet, bei einer bereits induzierten Blütenbildung zum Erntezeitpunkt der Langstecklinge, Knospen mit einer morphologischen Veränderung bereits zum Erntetermin oder wenig später zu finden. Die getesteten Knospen befanden sich zu Versuchsbeginn morphologisch noch in den Stadien I und II, die hier als vegetativ beurteilt wurden. Allerdings konnte ebenfalls eine Verbreiterung des Apex beobachtet werden und eine leichte Wölbung der Oberfläche (konvexe Form) in Stadium II. Eine morphologisch eindeutige Differenzierung in das generative Pflockmeristem oder zylindrische Form (Stadium III) konnte zum ersten Mal am 19. August (T4) nachgewiesen werden (Abbildung 25). Damit hätte rechnerisch der Termin der

Blüteninduktion an den Langstecklingen 2008 (Wurzeln) zwischen dem 29. Juli und dem 05. August gelegen. FOSTER et al. (2003) haben axillare Meristeme an Kurztrieben von Apfel gemessen, die entweder in eine Infloreszenz übergehen (95 %) oder vegetativ bleiben (5 %) und geben an, dass vegetative Meristeme eine Breite  $\leq 130 \mu\text{m}$  haben und Meristeme, die sich floral entwickeln eine Breite  $> 130 \mu\text{m}$  haben. HANKE (1981) gibt für den flachen vegetativen Apex eine Breite  $< 120 \mu\text{m}$  und für den verbreiterten Apex ebenfalls  $> 130 \mu\text{m}$ . In der vorliegenden Arbeit wurden an den Langstecklingen Meristeme  $\leq 130 \mu\text{m}$  in den Stadien I und II gefunden, genauso wie Meristembreiten  $> 130 \mu\text{m}$ . Erst ab Stadium II – III waren alle Meristeme  $> 130 \mu\text{m}$ . In den Knospen senkrechter Triebe am Baum waren die Meristeme in allen Stadien  $> 130 \mu\text{m}$  (Tabelle 22). Eine solch klare Einteilung über die Meristembreite konnte hier also im Zusammenhang mit der Morphologie des Meristems nicht festgestellt werden (Tabelle 22). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass eine Verbreiterung des Apex von Stadium zu Stadium stattfand und ab Stadium III nahm die Verbreiterung des Apex ab und im Verhältnis wurde der Apex länger.

Bei HANKE (1981) und FOSTER et al. (2003) handelte es sich um Knospen von Fruchtrieben, die mit großer Sicherheit geblüht hätten, während dieses bei den Knospen der Langstecklinge von ‘Williams Christ’ nicht vorhergesagt werden konnte. Zudem ist bei Apfel der Blütenbeginn durch eine zeitliche Abfolge klar geregelt: erst terminale, dann laterale Blüten (ESUMI et al., 2005). Für Birnen müsste also erst einmal genau geklärt werden, wie die morphologische Entwicklung der generativen Knospen am Baum erfolgt. Nach ESUMI et al. (2005) ist diese Reihenfolge nicht festgelegt, während CORTES et al. (2004) die Reihenfolge genau wie bei Apfel beschreiben. In den vorliegenden Ergebnissen konnte beobachtet werden, dass die Meristeme in den senkrechten Trieben am Baum etwas breiter waren als die im gleichen Stadium an den Langstecklingen. Das kann daran liegen, dass diese durch den Schnitt der Stecklinge, in der Entwicklung dann etwas zurücklagen. Es müsste aber grundsätzlich und in größerer Zahl untersucht werden, wie sich die Knospen am Baum (an senkrechten Trieben und an Fruchtrieben) morphologisch entwickeln und ob es (zeitliche) Unterschiede in der Entwicklung von Knospen an einem Baum gibt.

#### 4.2.2 Blüteninduktion

HÄTTASCH et al. (2008) geben an, dass in Apfelknospen ein bis zwei Wochen nach der Zunahme der Transkription von *MdFT* und *AFL* 1 und 2 eine morphologische Veränderung (Verbreiterung des Apex) zu beobachten war. Die eindeutige Verbreiterung des Apex konnte in den Knospen der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden, aber die eindeutige Umstimmung eines Meristems in das generative Pflockmeristem konnte zum ersten Mal am 19.08. nachgewiesen werden.

Vergleichend zu HÄTTASCH et al. (2008) zeigt der Verlauf von *PcAFL* 1-1 in der vorliegenden Arbeit einen Anstieg in der Expressionsrate genau in der Zeit zwischen dem 29. Juli und 05. August, der bis zum 26. August anhält (Abbildung 26).

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Umstimmung in ein eindeutig reproduktives Meristem etwa 2 - 3 Wochen nach dem Anstieg der Expressionsrate von *PcAFL* 1-1 und 4 Wochen nach dem Schnitt der Stecklinge erfolgte.

Da die Verbreiterung des Apex als erste morphologische Änderung nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte und es (aufgrund der relativ geringen Probenanzahl in den histologischen Untersuchungen) auch nicht ausgeschlossen werden kann, dass es bereits vor dem 19.08. generative Meristeme gab, kann hier nicht die Schlussfolgerung gezogen werden, dass eine Blüteninduktion ausschließlich nach dem Schnitt der Stecklinge erfolgte.

In der vorliegenden Arbeit wurde *FT* in den Blättern der Stecklinge nicht untersucht, aber YOO et al. (2005) haben an *Arabidopsis*-Mutanten gezeigt, dass *FT* zeitlich ein wenig eher aktiviert wird als *SOC* 1 und Veränderungen in der *FT*-Expression auch Veränderungen in der Expression von *SOC* 1 und/oder *AP* 1 bedingen (FLACHOWSKY et al., 2009). Hingegen hat *SOC* 1 keinen Einfluss auf *FT* (YOO et al., 2005). Die Expression von *SOC* 1 findet hauptsächlich im Blatt und im Sprossapex statt. Sie steigt im Zeitverlauf an und hat einen starken Anstieg im reproduktiven Apex. Im frühen Stadium des Übergangs von vegetativ zu generativ ist *SOC* 1 nicht im Meristem nachweisbar (da es von *AP* 1 unterdrückt wird), wird dann aber im älteren Blütenmeristem wieder exprimiert (PARCY, 2005 und TURCK et al., 2008). In *A. thaliana* erfolgt die Induktion von *FT* und *SOC* 1 schnell (innerhalb weniger Stunden) und direkt, während die Induktion von *LFY* einen Tag benötigt - vermutlich weil die Induktion indirekt stattfindet (PARCY, 2005). In der vorliegenden Arbeit war von Beginn an eine *MdSOC* 1-Expression in den Knospen nachweisbar. Sie stieg

---

innerhalb von einer Woche signifikant an und stieg weiter an bis zum 26. August, auch *PcAFL 1-1* wurde von Versuchsbeginn an exprimiert, mit einem Anstieg ab T2 (Abbildung 26). Nach HEMPEL et al. (2000) beeinflusst *LFY* bei *A. thaliana* die Bildung von *AP 1*. Die Expression von *AP 1* findet erst nach mehrstündiger Aktivität von *LFY* statt und in *lfy* Mutanten ist *AP 1*-Expression verzögert und schwächer während ektopische Expression von *LFY* auch ektopische Expression von *AP 1* verursacht. Das lässt vermuten, dass *AP 1* durch *LFY* reguliert wird (HEMPEL et al., 2000). Die Induktion von *AP 1* findet allerdings auch unabhängig von *LFY* statt (HEMPEL et al., 2000; PARCY, 2005). Vermutlich ist *FT* in der Lage *LFY* zu induzieren und möglicherweise kann *LFY* von *SOC 1* beeinflusst werden (PARCY, 2005; JUNG und MÜLLER, 2009). Das könnte erklären, warum der Nachweis von *MdAP 1* zu Beginn der Versuche nicht stabil war (siehe auch die Ergebnisse 2007 (Abbildung 27) und Karlsruhe 2008 (Tabelle 25)), da die *MdAP 1*-Expression dann von *PcAFL 1-1* erst reguliert wurde (Abbildung 26). Geht man davon aus, dass die Stecklinge aufgrund des Mutterpflanzenalters beim Erntetermin bereits in der reproduktiven Phase und die Knospen per se bereits zur Blüte induziert waren, aber durch einen Inhibitor gehemmt werden (GOLDSCHMIDT und SAMACH, 2004), ist erklärbar, warum *MdSOC 1*, *PcAFL 1-1* und *MdAP 1* von Versuchsbeginn nachweisbar waren.

LIU et al. (2007) konnten in *A. thaliana* nachweisen, dass *AP 1* die Expression von *SOC 1* unterdrückt. Das könnte der Grund sein, warum in der vorliegenden Arbeit die Expression von *MdSOC 1* nach dem 26. August wieder sank.

Vermutlich hindert *TFL 1* die Verbindung zwischen *AP 1* und *LFY* und andererseits können sowohl *AP 1* als auch *LFY* die Expression von *TFL 1* unterdrücken (HEMPEL et al., 2000). An Apfelknospen konnte gezeigt werden, dass die Expression von *MdTFL 1* bevorzugt in vegetativen Geweben stattfindet. Die Expression ist stark im frühen Juli etwa 2 Wochen bevor die Blütenknospenbildung induziert wird. Danach erfolgt eine Abnahme der Expression bis zum späten Juli. Das bedeutet, dass *MdTFL 1* am Baum vom späten Juni bis zum frühen Juli in die Induktion der Blütenregulation involviert ist (KOTODA und WADA, 2005; HÄTTASCH et al., 2008). KOTODA et al. (2003) geben an, dass die Transkription von *TFL* direkt vor der Blüteninduktion reduziert wird und HÄTTASCH et al. (2008) vermuten in der reduzierten Expression von *MdTFL 1-1* und *1-2* in eigenen Versuchen an Apfel eine

gleichzeitige Zunahme blühfördernder Gene. In der vorliegenden Arbeit konnte ein drastisches, signifikantes Absinken der Expression von *MdTFL* 1-1 am 12. August beobachtet werden (Abbildung 26). Gleichzeitig stieg die Expression von *MdAP* 1, *MdSOC* 1 und *PcAFL* 1-1 an. Das könnte bedeuten, dass zu diesem Zeitpunkt tatsächlich die Blüteninduktion in den Knospen stattfand. Die histologischen Untersuchungen zeigten die ersten eindeutig generativen Knospen - mit Pflockmeristem - am 19. August. Damit wäre der zeitliche Rahmen von der Induktion zu den ersten morphologischen Veränderungen (Verbreiterung des Apex) und Bildung des Pflockmeristems auf weniger als eine Woche reduziert. Das scheint unwahrscheinlich wenn man die Angaben mit Literaturwerten (die 2-3 Wochen für diesen Zeitraum angeben) vergleicht.

Es konnten keine antagonistischen oder synergistischen Effekte in der Expression zwischen *MdSOC* 1 und *PcTFL* 1-1 gefunden werden, diese Beobachtung wurde auch bei JUNG und MÜLLER (2009) und HÄTTASCH et al. (2008) gemacht.

Da sowohl *AP* 1 als auch *TFL* 1 weitere Aufgaben in der Blütenbildung haben, könnten die Expressionsraten dieser beiden Gene in den vorliegenden Untersuchungen auch in anderer Weise interpretiert werden. So ist *AP* 1 zusätzlich ein Blütenorgan-Identitäts-Gen und *TFL* 1 ein Infloreszenzmeristem-Identitäts-Gen (HEB, 1999; HANKE et al., 2007; HÄTTASCH et al., 2008). HÄTTASCH et al. (2008) beobachteten einen Anstieg der *TFL*-Expression nach der Blüteninduktion und interpretieren dies als den Zeitpunkt, der den Beginn der Infloreszenzbildung markiert. Es könnte sein, dass der Anstieg der *MdAP* 1-Expression in den vorliegenden Untersuchungen mit der Anlage der Blütenorgane zusammenhängt und der signifikante Anstieg der *PcTFL* 1-1-Expression am 19. August - also eine Woche nach dem Absinken (Abbildung 26) könnte mit der Entwicklung der Infloreszenz der Knospen zusammenhängen.

Bei FOSTER et al. (2003) und HÄTTASCH et al (2008) wurden generative Knospen untersucht, während in der vorliegenden Arbeit vermutlich sowohl generative als auch vegetative Knospen untersucht wurden. Es ist möglich, dass sich die unterschiedlichen Entwicklungszustände in den hier untersuchten Knospen „überlappten“. Es wurden jeweils Mittelwerte aus den Expressionsraten der Knospen eines Termins gebildet, und es ist sehr wahrscheinlich, dass einige Knospen vegetativ

und andere generativ waren. Es ist ebenfalls möglich, dass einzelne Knospen erst während der Kultur im Folienhaus zur Blüte umgestimmt wurden.

Betrachtet man die *MdAP 1*-Expression der Gene am Baum im Vergleich zu den Langstecklingen sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den senkrechten Trieben und den Stecklingen zu erkennen, wohl aber zu den waagrecht gebundenen Ästen. *PcTFL 1-1* zeigt nur am 11. August einen signifikanten Unterschied zu den Varianten am Baum und am 09. September nicht mehr (Abbildung 28). Aber hier reichen zwei Termine nicht aus um den Verlauf der Expression am Baum mit dem der Stecklinge wirklich vergleichen zu können.

Die Blütenbildung an den Langstecklingen von ‘Williams Christ‘ 2008 war mit 28 % höher als in den anderen Jahren (mit Ausnahme von 2007). Schaut man sich die Blüte der Mutterbäume im Frühjahr 2009 am Baum an, zeigt sich eine starke Blütenbildung an den senkrechten Trieben und weniger an den gebundenen Ästen (Abbildung 23). Der Unterschied der Genexpression von *MdAP 1* zwischen den gebundenen Ästen und den senkrechten Trieben kann in den vorliegenden Untersuchungen somit nicht auf eine Erhöhung der Blütenbildung zurückzuführen sein. Eine mögliche Erklärung für die schwächere Blütenbildung an den gebundenen Ästen ist aber möglicherweise darin zu finden, dass es in Wurzeln im Herbst 2008 starken Hagel gab und im Frühjahr 2009 nochmals einen Kälteeinbruch mit starkem Frost. Beides verursachte nach Aussagen der Mitarbeiter, starke Schäden an den Knospen – gerade in den unteren Bereichen der Bäume.

Bezüglich der Genexpression in gebundenen Ästen konnten keine Literaturangaben gefunden werden, aber in vielen Arbeiten konnte eine Steigerung der Blütenbildung durch mechanisch induzierten Stress nachgewiesen werden. So ist nach SANYAL und BANGERTH (1998) Ethylen ein wichtiger Regulator der Blütenknospenbildung. Im Versuch an Apfel wurde mechanisch induzierter Stress durch Binden der Äste erreicht. Horizontale Äste wurden hoch und vertikale Äste herunter gebunden. Das Ergebnis war eine Zunahme in der Ethylenproduktion -wobei das Herunterbinden der vertikalen Äste einen stärkeren Effekt hatte als das Hochbinden der horizontalen Äste- und eine 2 bis 2,5fache Abnahme des polaren Auxintransports sowie eine 3fache Abnahme des Cytokiningehaltes zur Folge hatte. Insgesamt kam es zu einer Erhöhung der Blütenknospenbildung. ITO et al. (2004) beobachteten in einem Versuch drei Tage nach dem Waagrecht Binden von Zweigen bei der Japanischen

Birne, dass die Anteile an Saccharose und Sorbitol in den Seitenknospen von Trieben sanken, sich aber nach sieben Tagen nicht mehr von den ungebundenen Ästen unterschieden. Die Blütenproduktion wurde erhöht. Apikale Dominanz wurde behindert und dadurch die Blütenentwicklung in den Seitenknospen erhöht. Die Blütenentwicklung fand an horizontalen Trieben eher statt als an vertikalen Trieben. Hier wurde beobachtet, dass durch das waagerechte Binden der Äste der Auxintransport im Spross gesenkt wurde, während die Cytokinin-Konzentration in den Seitenknospen stieg.

Die Expressionsraten in den Knospen von ‘Conference‘ zeigten im Vergleich zu den Knospen von ‘Williams Christ‘ einen deutlichen Unterschied. Zwar wurden hier nicht so viele Termine untersucht, vergleicht man aber die dargestellten Termine mit denen von ‘Williams Christ‘, fällt auf, dass der Anstieg von *MdSOC 1* und *PcAFL 1-1* schwächer verläuft und *PcTFL 1-1* zu allen Zeitpunkten stärker exprimiert wurde als *MdAP 1* (Abbildung 31). Im Hinblick auf das Ergebnis der geringen Blütenbildung mit 3 % an den Stecklingen im Folienhaus (Abbildung 20) und auf der Freifläche am Baum (Abbildung 22) bestätigt sich hier die Annahme, dass (Obst-) Gehölze, wenn sie die juvenile Phase abgeschlossen haben, in allen Knospen Blütengene „bereit“ halten und diese auch nachweisbar sind, aber die Knospen dennoch in ihrer Blütenbildung gehemmt werden.

In den Knospen der Stecklinge lag *PcTFL 1-1* stärker exprimiert vor als *MdAP 1* nicht aber in den Knospen der senkrechten Triebe am Baum. Neben *TFL* wirken auch andere Repressoren wie z.B. *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. *FLC* unterdrückt in *A. thaliana* die Intergratoren *FT*, *LFY*, *CO* und *SOC 1* und ist im Blatt und im Apikalmeristem nachweisbar (HANKE et al., 2007; ALEXANDRE und HENNIG, 2008; JUNG und MÜLLER, 2009).

Eine Ursache der Blüteninduktion an den Langstecklingen wurde zu Beginn der Arbeit in den hohen Temperaturen, die während der Kultur im Folienhaus vorkamen, vermutet und es wurde eine Zunahme von *MdAP 1* gleichzeitig mit einem Anstieg der Temperatur beobachtet. Um hier eine klärende Aussage treffen zu können, müssten mehr Probenahmen um einen Temperaturanstieg herum gemacht werden. Da aber unter kontrollierten Temperaturbedingungen bei 28 °C ebenfalls Blütenbildung beobachtet wurde, sind die hohen Temperaturen vermutlich kein Blüteninduktor. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass die Blütenbildung an



---

‘Conference‘ unter kontrollierten Bedingungen und im Folienhaus je 3 % betrug. Wie bereits in Kapitel 4.1.2 erwähnt kann sich eine zu hohe Temperatur möglicherweise eher hemmend auf die Blütenbildung auswirken FERGUSON et al. (1994) haben festgestellt, dass die Proteinsynthese in Zellen von Birnenfrüchten bei einer Temperatur von 25 °C (6h) sinkt und weiter sinkt bei ansteigenden Temperaturen und vermuten, dass Hitzeschockproteine dafür verantwortlich sind. Temperaturen zwischen 39 und 42 °C scheinen kritisch für Birnenzellen zu sein und die Mortalitätsrate steigt signifikant bei 45 °C. Diese Werte zeigen, dass sich steigende Temperaturen bei Birnen wahrscheinlich eher nachteilig auswirken.

Ein Versuch mit jungen In-vitro Sprossen von ‘Williams Christ‘ (unveröffentlichte Daten, 2009) die 0h, 2h, 3,5h und 20h einer Temperatur im Klimaschrank von 35 °C ausgesetzt wurden (Lichtbedingungen wie im Kulturraum) zeigten keine *MdAP 1* und *PcAFL 1-1* Expression in den Knospen, lediglich *PcTFL 1-1* konnte nachgewiesen werden. Damit kann ein Einfluss der Temperatur auf die Blüteninduktion juveniler ‘Williams Christ‘-Sprosse innerhalb weniger Stunden ausgeschlossen werden. SZANKOWSKI et al. (2009) haben jedoch gezeigt, dass es möglich ist über RNAi-Silencing von *MdTFL 1* juvenile In-vitro-Pflanzen von Apfel nach sechs Monaten zum Blühen zu bringen. Juvenile Pflanzen können dann zur Blüte induziert werden wenn entweder der Blührepressor ausgeschaltet wurde oder aber eine konstitutive Überexpression der blühfördernden Gene stattfindet (SZANKOWSKI et al., 2009).

Bei der Aktivität von Genen spielt die circadiane Uhr (Photoperiode) ebenso eine Rolle. Den Nachweis lieferten Untersuchungen über sogenannte *LHC*-Gene (light harvesting complex), die in der Photosynthese für Chlorophyll-bindende Proteine kodieren und die der Lichtabsorption in der Photosynthese dienen. Die Transkripte sind dann am stärksten vorhanden, wenn sie am meisten gebraucht werden. Dieser Zeitpunkt ist um die Mittagszeit erreicht, wenn die Sonne am höchsten steht. Nachts sind diese Transkripte kaum nachzuweisen (STAIGER, 2000). Von den Genen, die an der Blüteninduktion in Obstknospen beteiligt sind, ist nicht bekannt wie genau sie von der circadianen Uhr beeinflusst werden. Da es sich aber bei Obstbäumen um Langtagpflanzen handelt und die Blütenbildung auch über *CO* induziert wird (HANKE et al., 2007), ist davon auszugehen, dass die circadiane Uhr Einfluss nimmt.

Neben vielen beeinflussenden Aspekten wie Klima, Standort, Entwicklungszustand etc. (WILKIE et al., 2008) scheint die Blüteninduktion äußerst sortenabhängig zu sein. In den Knospen von ‘Williams Christ‘ und ‘Conference‘ konnten von Beginn an die blühfördernden Gene *MdSOC 1*, *PcAFL 1-1* und *MdAP 1* nachgewiesen werden. Das lässt darauf schließen, dass es sich bei den Stecklingen um adultes Pflanzenmaterial handelte. Die Expression von *PcTFL 1-1* war in den Knospen von ‘Conference‘ stärker als die Expression von *MdAP 1*, während dies bei ‘Williams Christ‘ umgekehrt war. Dieses Ergebnis wird durch die stärkere Blüte an den Stecklingen von ‘Williams Christ‘ (im Vergleich zu ‘Conference‘) bestätigt.

In den Knospen senkrechter Triebe am Baum konnte sowohl bei ‘Williams Christ‘ als auch bei ‘Conference‘ eine stärkere *MdAP 1*-Expression (vergleichend zu *PcTFL 1-1*) nachgewiesen werden. Während die Blüte an den senkrechten Trieben am Baum bei ‘Williams Christ‘ auch stark war, war sie bei ‘Conference‘ aber eher schwach.

Bei ‘Williams Christ‘ handelt es sich offenbar (anders als in der Literatur angegeben) um eine sehr blühwillige Sorte, was sich auch auf die Konkurrenztriebe oder Sommerschosse überträgt - ganz im Gegensatz zu ‘Conference‘.

### 4.3 Abschlussbetrachtung

In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Mutterpflanzenalter einen großen Einfluss auf den Bewurzelungserfolg hatte. Im Vergleich der Bewurzelung kurzer und langer Stecklinge von 'Williams Christ' bewurzelten die langen Stecklinge älterer Mutterpflanzen besser und bei jüngeren Mutterpflanzen bewurzelten die Kurzstecklinge besser. Im Vergleich der Bewurzelung langer Stecklinge bewurzelten die von jüngeren Mutterpflanzen besser als die von älteren. Das Mutterpflanzenalter hat auf die Bewurzelungsqualität keinen Einfluss. Der Bewurzelungserfolg war in den einzelnen Jahren sehr unterschiedlich.

Die Blütenbildung an den Stecklingen jüngerer Mutterpflanzen war höher als an den Stecklingen älterer Mutterbäume. Es konnte gezeigt werden, dass hohe Temperaturen (um 28 °C) auf die Blüteninduktion vermutlich einen eher hemmenden Einfluss ausüben, während sich Temperaturen zwischen 25 und 35 °C in den ersten Tagen nach dem Stecken positiv auf die Bewurzelung auswirkten. Ein Einfluss der Temperatur auf die an der Blüteninduktion beteiligten Gene konnte nicht gefunden werden.

Im Hinblick auf die gezeigten Ergebnisse und im Zusammenhang des Alters und der Reproduktivität der Mutterpflanzen ist zu vermuten, dass auch in den frischen Neutrieben adulter Pflanzen der Blühimpuls bereits vorliegt.

Die histologischen Untersuchungen der Knospen an den Langstecklingen von 'Williams Christ' zeigten eine eindeutige morphologische Veränderung zum reproduktiven Meristem vier Wochen nach dem Stecken. Vergleichend zu Literaturangaben hatten die Meristeme aber bereits zu Versuchsbeginn eine Breite von > 130 µm, was bei Apfeleristememen bereits als Verbreiterung zum Blütenmeristem und erste morphologische Änderung gewertet wurde.

Im Gegensatz zu juvenilen *A. thaliana* mussten die Transkripte der blühfördernden Gene wie *SOC 1* und *AFL 1* nicht erst akkumuliert und aktiviert werden und sowohl *MdSOC 1* als auch *PcAFL 1-1* konnten in den Knospen von 'Williams Christ' (zum Teil auch stärker exprimiert als *PcTFL 1-1*) und 'Conference' bereits zu Versuchsbeginn nachgewiesen werden. Ein schwieriger Aspekt dieser Arbeit liegt in der Tatsache begründet, dass die Ergebnisse der Genexpression später nicht am Steckling zu überprüfen waren. Da mit den Probenahmen der jeweilige Steckling aus

der Vermehrung genommen wurde und das tatsächliche Blühverhalten damit nicht mehr zu beurteilen war.

Betrachtet man aber diesbezüglich die Blütenbildung der senkrechten Triebe an den Mutterpflanzen ist davon auszugehen, dass die 'Williams Christ'-Stecklinge als Triebe am Baum vermutlich geblüht hätten, während die 'Conference'-Stecklinge generell eher nicht so starke Blüte an den senkrechten Trieben am Baum zeigten.

Eine solche Blütenbildung, wie bei 'Williams Christ' dargestellt, konnte weder an den Langstecklingen von 'Conference' und 'Vereins Dechant' noch an einjährigen Apfelsämlingen beobachtet werden. Das zeigt insgesamt, dass die Blüteninduktion stark sortenabhängig ist und dass juvenile Pflanzen nicht durch den Stress im Fog zur Blüte induziert werden können.

Vergleichspflanzungen vergangener Jahre haben allerdings auch gezeigt, dass verschulte Langstecklinge von 'Conference' bereits im Frühjahr nach dem Verschulen ebenfalls Blüten bildeten.

Insgesamt lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass es sich bei den Stecklingen um senkrechte Triebe handelte, die sich bereits in der reproduktiven Phase befanden, was sich auch an den Ergebnissen des schwankenden Bewurzelungserfolges widerspiegelte, da sich juveniles Material besser bewurzelt als adultes (SPETHMANN, 2000).

Im Hinblick auf die rückläufigen Anbauzahlen bei Birne (COSTES, 2004) könnte die Vermehrung von Birnen auf eigener Wurzel über die Vermehrung als Langstecklinge dennoch ein guter Ansatz sein. Bäume auf eigener Wurzel können die Ressourcen des Substrates besser nutzen, sind einheitlicher im Wuchs und es besteht keine Gefahr der Unverträglichkeit mit der Unterlage (FRIEDRICH et al., 1978; TWORKOSKI und TAKEDA, 2007). Ein Nachteil der Vermehrung der Birnenlangstecklinge ist jedoch der wenig planbare Bewurzelungserfolg. Zwar bewurzelten die Langstecklinge von 'Williams Christ' und 'Conference' in jedem Jahr, aber der Bewurzelungserfolg schwankte erheblich - trotz der immer gleichen Versuchsdurchführung und Behandlung der Stecklinge.

Durch die Blütenbildung bei 'Williams Christ' im Frühjahr nach dem Bewurzeln entfällt die sonst übliche juvenile Phase in der Vermehrung von Obstbäumen. Grundsätzlich bedeutet diese Art der Vermehrung, bei erfolgreicher Bewurzelung eine Verkürzung der unproduktiven Standzeit. Nach dem Verschulen der Stecklinge

von 'Williams Christ' konnte in den vergangenen Jahren wiederholt Blüten- und auch Fruchtbildung beobachtet werden (SPETHMANN, 2007). In einer Vergleichspflanzung von In-vitro vermehrten Birnen, Sämlingen, wurzelechten Stecklingen und Quitte A als Unterlage konnten gute Ergebnisse für die wurzelechten Stecklinge von 'Williams Christ' beobachtet werden. Bereits nach drei Jahren Standzeit zeigten die Langstecklinge einen Stammdurchmesser und einen Fruchtansatz der vergleichbar zu den Birnen auf Quitte A war. Die In-vitro-Pflanzen zeigten nach drei Jahren ein ähnliches Verhalten wie die Sämlinge (SPETHMANN, Vorlesung). Das gehemmte Wachstum, das nach dem Verschulen und in der weiteren Kultur beschrieben wird (SPETHMANN, 2002; MEIER, 2004) würde es ermöglichen, schwachwüchsige Birnenplantagen anzulegen – wie es auch im ‚high density planting‘ durch Auswahl der Unterlagen bereits durchgeführt wird (WERTHEIM, 1981; WERTHEIM et al., 2001). Im Vergleich von Langstecklingen, die an jungen Allee- und alten Obstbäumen geerntet wurden zeigte sich, dass die Stecklinge der Alleebäume (z.B. *Acer platanoides* und *Ulmus* 'Regal') nach dem Verschulen ein starkes Wachstum aufwiesen, während die Stecklinge der Obstbäume (*Pyrus*, *Prunus*, *Malus*) ein gehemmtes Wachstum zeigten (OSTERC und SPETHMANN, 1998; SPETHMANN, 2007 und Vorlesung). Das gehemmte Wachstum ist vermutlich auf das Alter der Mutterpflanzen zurückzuführen, da mit zunehmendem Alter der Pflanzen der Höhenzuwachs abnimmt (HILKENBÄUMER, 1964; SPETHMANN, 2000). Auch hemmen Blütenknospen während der Bewurzelungsphase das Weiterwachstum von Stecklingen nach erfolgreicher Bewurzelung (SPETHMANN, 2000). Ein Aspekt, der für die Vermehrung von Birnen auf eigener Wurzel spricht, ist, dass die herkömmliche Vermehrung von Birnensorten auf Quittenunterlagen (die verwendet werden, weil sie eine Frühreife induzieren) bei *Pyrus* die Vitalität der Reiser mindert, allerdings in einem noch vertretbaren Rahmen. Es wird meist die Quitten-Unterlage C gewählt, die letztlich am vitalsten wirkt, am stärksten Frühreife hervorruft und kleineren Wuchs verursacht (WERTHEIM et al., 2001; BÜNEMANN, 2002). Aufgrund von Unverträglichkeiten zwischen Unterlage und Sorte sind immer noch Zwischenveredelungen notwendig, die zeitaufwendig sind. Nachteilig wirkt sich ebenfalls eine Kalk- und Frostempfindlichkeit der Quittenunterlagen aus. Die Standfestigkeit ist geringer im Vergleich zu Sämlingsunterlagen von *Pyrus* (AID, 2004). Die Bodenansprüche für Sämlingsunterlagen sind zwar gering, sie sind langlebig, frosthart und

standfest, allerdings wachsen sie sehr stark und der Ertragsbeginn ist spät (AID, 2004). Auch im Vergleich zu Birnensämlingen ist die Vermehrung von Birnen über Langstecklinge (bei erfolgreicher Bewurzelung) vorteilhaft, da sie nicht so stark wachsen und schon über die Fähigkeit zur Blüte verfügen.

In folgenden Untersuchungen muss geklärt werden, wie sich die Morphologie und die Expression blühhemmender und blühhemmender Gene in Knospen am Baum über das Jahr verhält um detailliert beurteilen zu können, ob die Blütenbildung im Fog genauso verläuft wie am Baum. Hierbei müssen auch die verschiedenen Positionen der Knospen am Baum berücksichtigt werden.

Über zusätzliche Untersuchungen muss die Bewurzelung von Stecklingen adulter Mutterpflanzen verbessert werden. Hierbei könnten Analysen zum endogenen Hormonhaushalt in den Stecklingen vor und nach dem Schnitt viel zur Klärung beitragen. So könnte geklärt werden, ob die Blüten verschiedener Sorten über Hormonwechselwirkungen gesteuert werden und wie sich der Auxingehalt auf den Bewurzelungserfolg auswirken kann.

Im Hinblick auf den optimalen Zeitpunkt der Stecklingsernte, um das bestmögliche Bewurzelungsergebnis in Verbindung mit der Blüteninduktion zu erhalten, ist es ratsam, nochmals Terminversuche durchzuführen.

Um das weitere Ertrags- und Wuchsverhalten der wurzelechten Stecklinge im Vergleich zur herkömmlichen Vermehrung über Quittenunterlagen beurteilen zu können ist es notwendig, eine Vergleichspflanzung über viele Jahre zu betrachten und ebenfalls in jedem Jahr zu bonitieren.

## 5. Literaturverzeichnis

AID Verbraucherschutz, Ernährung, Landwirtschaft e.V. (2004): Welches Obst für meinen Garten? Eigenverlag, Bonn

ALEXANDRE, C.M. und HENNIG, L. (2008): FLC or not FLC: the other side of vernalisation. *Journal of Experimental Botany*, 59: 1127 - 1135

BANGERTH, K.F. (2008): Nature and significance of correlative hormonal signals in growth and development of annual and perennial plants. *Acta Horticulturae* 774: 379 - 390

BANGERTH, K.F. (2009): Floral induction in mature, perennial angiosperm fruit trees: similarities and discrepancies with annual/ biennial plants and the involvement of plant hormones. *Scientia Horticulturae*, 122: 153 - 163

BLÁZQUEZ, M.A.; FERRÁNDIZ, C.; MADUENO, F. und PARCY, F. (2006): How floral meristems are built. *Plant Molecular Biology*, 60: 855 - 870

BROWN, D.S. (1952): The effects of irrigation on flower bud development and fruiting in the apricot. *Journal of American Society for Horticultural Science* 119-124

BÜNEMANN, G. (2002): Pear production in Northern Europe. *Acta Horticulturae* 596: 71- 74

BUNDESSORTENAMT (Hrsg. 2003): Beschreibende Sortenliste Kernobst - Apfel, Birne

CARREA, M. (1982): Floral initiation in pear varieties. *Acta Horticulturae* 124:157-163

CONTI, L. und BRADLEY, D. (2007): *TERMINAL FLOWER 1* is a mobile signal controlling *Arabidopsis* architecture. *The Plant Cell*, 19: 767 - 778

CORBESIER, L.; VINCENT, C.; JANG, S.; FORNARA, F.; FAN, Q.; SEARLE, I.; GIAKOUNTIS, A.; FARRONA, S.; GISSOT, L.; TURNBULL, C. und COUPLAND, G. (2007): FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science*, 316: 1030 - 1033

- COSTES, E.; BELOUIN, A.; BROUARD, L. und LELEZEC, M. (2004): Development of young pear trees and occurrence of first flowering: a varietal comparison. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 79: 67 - 74
- DOYLE, J. und DOYLE, J. (1990): Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13 - 15
- EREZ, A. und YABLOWITZ, Z. (2003): Rooting of peach hardwood cuttings for the meadow orchard. *Scientia Horticulturae*, 15: 137 - 144
- ESUMI, T.; TAO, R. und YONEMORI, K. (2005): Isolation of *LEAFY* and *TERMINAL FLOWER 1* homologues from six fruit tree species in the subfamily *Maloideae* of the *Rosaceae*. *Sex Plant Reproductions*, 17: 277 - 287
- FADL, M.S. und HARTMANN, H.T. (1967): Relationship between seasonal changes in endogenous promoters and inhibitors in pear buds and cutting bases and the rooting of pear hardwood cuttings. *The American Society for Horticultural Science*, 91: 96 - 112
- FERGUSON, I.B.; LURIE, S. und BOWEN, J.H. (1994): Protein Synthesis and breakdown during heat shock of cultured pear (*Pyrus communis* L.) cells. *Plant Physiology*, 104: 1429 - 1437
- FEUCHT, W. (1982): *Das Obstgehölz*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- FITSCHEN, J. (2007): *Gehölzflora*. Quelle & Meyer Verlag Heidelberg, Wiesbaden. 12. Auflage
- FLACHOWSKY, H.; HANKE, M.V.; PEIL, A.; STRAUSS, S.H. und FLADUNG, M. (2009): A review on transgenic approaches to accelerate breeding of woody plants. *Plant Breeding*, 128: 217 - 226
- FOSTER, T.; JOHNSTON, R. und SELEZNYOVA, A. (2003): A morphological and quantitative characterization of early floral development in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Annals of Botany*, 92: 199 - 206



FOUCHER, F.; MORIN, J.; COURTIADÉ, J.; CADIOUX, S.; ELLIS, N.; BANFIELD, M.J. und RARNEAU, C. (2003): *DETERMINATE* and *LATE FLOWERING* are two *TERMINAL FLOWER1/CENTRORADIALIS* homologs that control two distinct phases of flowering initiation and development in Pea. *The Plant Cell*, 15: 2742 - 2754

FRIEDRICH, G.; NEUMANN, D. und VOGL, M. (Hrsg. 1978): *Die Physiologie der Obstgehölze*, Akademie-Verlag, Berlin

GIAKOUNTIS, A. und COUPLAND, G. (2008): Phloem transport of flowering signals. *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 1-8

GILLIAM, C.H.; DOZIER, W.A. und KNOWLES, J.W. (1987): ‘Bradford‘ pear propagation by softwood cuttings. *Journal of Environmental Horticulture*, 6 (3): 81 - 83

GOLDSCHMIDT, E.E. und SAMACH, A. (2004): Aspects of flowering in fruit trees. *Acta Horticulturae*, 653: 23 - 27

HÄTTASCH, C.; FLACHOWSKY, H.; KAPTURSKA, D. und HANKE, M.-V. (2008): Isolation of flowering genes and seasonal changes in their transcript levels related to flower induction and initiation in apple (*Malus x domestica*). *Tree Physiology*, 28: 1459 - 1466

HANKE, M.-V. (1981): *Histologische Untersuchungen zur Blütenknospendifferenzierung bei Malus domestica Borkh. (‘Golden Delicious‘)*. Promotionsarbeit, Institut für Obstforschung Dresden-Pillnitz

HANKE, M.-V.; FLACHOWSKY, H.; PEIL, A. und HÄTTASCH, C. (2007): No flower no fruit – genetic potentials to trigger flowering in fruit trees. *Genes, Genomes and Genomics* 1: 1 - 20

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, F.T und GENEVE, R.L. (2001): *Plant Propagation – Principles and Practices*. Prentice Hall, Englewood Cliff

HEDRICK, U.P (1921). *The Pears of New York*. New York Agricultural Experiment Station.

- HEILMEYER, M. (Hrsg. 2004): Beste Birnen bei Hofe – Potsdamer pomologische Geschichten. Vacat Verlag, Potsdam
- HEMPEL, F.D.; WEIGEL, D.; MANDEL, M.A.; DITTA, G.; ZAMBRYSKI, P.C.; FELDMAN, L.J. und YANOFSKI, M.F. (1997): Floral determination and expression of floral regulatory genes in *Arabidopsis*. *Development* 124: 3845-3853
- HEMPEL, F. D.; WELCH, D.R. und FELDMAN, L.J. (2000): Floral induction and determination: where is flowering controlled? *Trends in Plant Science*, 5: 17 - 21
- HEß, D. (1999): Pflanzenphysiologie. 10. Auflage UTB
- HILKENBÄUMER, F. (1964): Obstbau. 4. Auflage, Verlag Paul Parey.
- HIGDON, R.J. und WESTWOOD, M.N. (1963): Some factors affecting the rooting of hardwood pear cuttings. *American Society for Horticultural Science*, 83: 193 - 198
- HOAD, G.V. (1984): Hormonal regulation of fruit-bud formation in fruit trees. *Acta Horticulturae* 149: 13 - 23
- HOWARD, B.H. (1986): Factors affecting the rooting response of fruit tree cuttings to IBA treatment. *Acta Horticulturae*, 179: 829 - 840
- ITO, A.; YOSHIOKA, H.; HAYAMA, H. und KASHIMURA, Y. (2004): Reorientation of shoots to the horizontal position influences the sugar metabolism of lateral buds and shoot internodes of Japanese pear. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79(3): 416-422
- JACKSON, J.E. (2003): *Biology of horticultural crops, biology of apples and pears*. Cambridge University Press. Kapitel 6: The shoot system und Kapitel 9: Flowers and fruits
- JACOB, H.B. (2002): New pear rootstocks from Geisenheim, Germany. *Acta Horticulturae* 596: 337 - 344
- JANICK, J. (2002): The pear in history, literature, popular culture and art. *Acta Horticulturae* 596: 41- 52

- JUNG, C. und MULLER, A.E. (2010): Flowering time control and applications in breeding. *Trends in Plant Science* 14 (10): 563 - 573
- KLEINSCHMITT, J.; SCHMIDT, J. und HOSENFELD, B. (1980): Blüteninduktion bei Fichte und Douglasie. *Der Forst- und Holzwirt*, 12: 240 - 242
- KOBAYASHI, Y.; KAYA, H.; GOTO, K.; IWABUCHI, M. und ARAKI, T. (1999): A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science*, 286: 1960 - 1962
- KOTODA, N.; WADA, M.; MASUDA, T. und SOEJIMA, J. (2003): The break-through in the reduction of juvenile phase in apple using transgenic approaches. *Acta Horticulturae*, 625: 337 - 343
- KOTODA, N. und WADA, M. (2005): *MdTFL1*, a *TFL*-like gene of apple, retards the transition from the vegetative to reproductive phase in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Science* 168: 95-104
- LEVY, Y.Y. und DEAN, C. (1998): The transition to flowering. *The Plant Cell*, 10: 1973 - 1989
- LIEGEL, G. (1826): Die pomologische Kunstsprache schematisch bearbeitet oder Lehre der Charakteristik der Obstfrüchte und der obsttragenden Gewächse. Verlag Friedrich Pustet, Passau
- LIU, C.; ZHOU, J.; BRACHA-DRORI, K.; YALOVSKY, S.; ITO, T. und YU, H. (2007): Specification of *Arabidopsis* floral meristem identity by repression of flowering time genes. *Development*, 134: 1901 - 1910
- MAC CÁRTHAIGH, D. und HORNIG, R. (2000): Vermehrung und Anzucht von Obstgehölzen. In Krüssmanns Gehölzvermehrung. Verlag Paul Parey
- MAC CÁRTHAIGH, D., PREIL, W. und SPETHMANN, W. (2000): Methoden der Gehölzvermehrung. In Krüssmanns Gehölzvermehrung. Verlag Paul Parey
- MARCELIS-VAN ACKER, C.A.M. (1994): Development and growth potential of axillary buds in roses as affected by bud age. *Annals of Botany* 74: 437-443

- MBABU, P. und SPETHMANN, W. (2005): Effect of Length of Cuttings, Substrate pH, and Mineral Nutrition on Rooting of *Pyrus communis* Cultivars. *European Journal of Horticultural Science* 70(4): 16-21
- MEIER, F. (2004): Bewurzelung von *Malus*-, *Pyrus*- und *Prunus*-Unterlagen und -Sorten als Lang- und Kurzstecklinge. Diplomarbeit, Universität Hannover, Abteilung Baumschule
- MOON, J.; SUH, S.S.; LEE, H.; CHOI, K.R.; HONG, C.B.; PAEK, N.C.; KIM, S.G. und LEE, I. (2003): The *SOCI* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 35: 613 - 623
- NGUYEN, T.H.H. (2006): Effect of juvenility stage on rooting and flowering of *Pyrus* cuttings and *in vitro* propagation. Master Thesis, Leibniz Universität Hannover, Abteilung Baumschule
- OSTERC, G. und SPETHMANN, W. (1998): Kirschen- und Apfelunterlagen durch Stecklinge vermehren? *Deutsche Baumschule*, 10: 18-21
- PARCY, F. (2005): Flowering: a time for integration. *International Journal of Developmental Biology*, 49: 585 - 593
- PFAFFL, M.W. (2004): Real-Time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum*, 1: 92-95
- POWER, A.B.; DODD, R.S. und LIBBY, W.J. (1988): Cyclophysis and Topophysis in Coast Redwood Stecklings. *Silvae Genetica*, 37 (1): 8 - 14
- REMY, A.; LALANNE, D.; THOUROUDE, T.; LE COUVIOUR, F.; OYANT, L. und FOUCHER, F. (2009): A survey of flowering genes reveals the role of gibberellins in floral control in rose. *Theoretical and Applied Genetics*, 119: 767 - 781
- ROCHA CORREA, L. und FETT-NERO, A.G. (2004): Effects of temperature on adventitious root development in microcuttings of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. *Journal of Thermal Biology*, 29(6): 315 - 324

SANYAL, D. und BANGERTH, F. (1998): Stress induced ethylene evolution and its possible relationship to auxin-transport, cytokinin levels, and flower bud induction in shoots of apple seedlings and bearing apple trees. *Plant Growth Regulation* 24: 127-134

SCHÖFFL, F. und PANIKULANGARA, T.J. (2006): Temperature-regulated gene expression. Aus: *Regulation of transcription in plants. Annual Plant Reviews*, 29. Klaus Grasser, Blackwell

SCHUMACHER, R. (1989): *Die Fruchtbarkeit der Obstgehölze*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

SIMPSON G.G. und DEAN C. (2002): *Arabidopsis*, the rosetta stone of flowering time? *Science* 296: 285 - 289

SMITH, N.G. und WAREING, P.F. (1972): Rooting of hardwood cuttings in relation to bud dormancy and the auxin content of the excised stems. *New Phytology*, 71: 63 - 80

SPETHMANN, W. und HAMZAH, A. (1988): Growth hormone induced root system types in cuttings of some broad leaved tree species. *Acta Horticulturae*, 226: 601 - 605

SPETHMANN, W. (2000): Generative Gehölzvermehrung. In *Krüssmanns Gehölzvermehrung*. Verlag Paul Parey.

SPETHMANN, W. und HUHNS, W. (2001): Produktionszeit für Stammrosen verkürzt. *Deutsche Baumschule* 53 (6): 38 - 40

SPETHMANN, W. (2002): Bald Erdbirnen neben Erdbeeren? *Deutsche Baumschule* 54 (4): 12

SPETHMANN, W. (2003): Langstecklinge von Laubgehölzen. *AFZ – Der Wald* 58 (16): 790 - 791

SPETHMANN, W. (2007): Increase of rooting success and further shoot growth by long cuttings of woody plants. *Propagation of Ornamental Plants*, 7: 160 - 166

STAIGER, D. (2000): Biologische Zeitmessung bei Pflanzen. *Biologie in unserer Zeit*, 2: 76 - 81

SZANKOWSKI, I.; WAIDMANN, S.; SAAD OMAR, A.; FLACHOWSKY, H.; HÄTTASCH, C. und HANKE, M.V. (2009): RNAi-Silencing of *MdTFL 1* induces early flowering in apple. *Acta Horticulturae*, 839: 633 - 636

TAIZ, L. und ZEIGER, E. (2006): Kapitel 25: The control of flowering. Aus: *Plant Physiology*. Spektrum Akademischer Verlag

THEIBEN, G. und BECKER, A. (2004): Gymnosperm orthologues of class B floral homeotic genes and their impact on understanding flower origin. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23 (2): 129 - 148

TURCK, F., FORNARA, F. und COUPLAND, G. (2008): Regulation and identity of Florigen: *FLOWERING LOCUS T* moves center stage. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 573 - 594

TWORKOSKI, T. und TAKEDA, F. (2007): Rooting response of shoot cuttings from three peach growth habits. *Scientia Horticulturae*, 115: 98 - 100

TYMOSZUK, T.; MIKA, A. und ANTOSZEWSKI, R. (1980): The role of watershoots in modifying light climate within the apple tree canopy and in nutrition of fruits. *Acta Horticulturae*, 114: 90

VELASCO, R.; ZHARKIKH, A.; AFFOURTIT, J.; DHINGRA, A.; CESTARO, A.; KALYANARAMAN, A.; FONTANA, P.; BHATNAGAR, S.K.; TROGGIO, M.; PRUSS, D.; SALVI, S.; PINDO, M.; BALDI, P.; CASTELLETTI, S.; CAVAIUOLO, M.; COPPOLA, G.; COSTA, F.; COVA, V.; DAL RI, A.; GOREMYKIN, V.; KOMJANC, M.; LONGHI, S.; MAGNAGO, P.; MALACARNE, G.; MALNOY, M.; MICHELETTI, D.; MORETTO, M.; PERAZZOLLI, M.; SI-AMMOUR, A.; VEZZULLI, S.; ZINI, E.; ELDREDGE, G.; FITZGERALD, L.M.; GUTIN, N.; LANCHBURY, J.; MACALMA, T.; MITCHELL, J.T.; REID, J.; WARDELL, B.; KODIRA, C.; CHEN, Z.; DESANY, B.; NIAZI, F.; PALMER, M.; KOEPKE, T.; JIWAN, D.; SCHAEFFER, S.; KRISHNAN, V.; WU, C.; CHU, V.T.; KING, S.T.; VICK, J.; TAO, Q.; MRAZ, A.; STORMO, A.; STORMO, K.; BOGDEN, R.; EDERLE, D.; STELLA, A.; VECCHIETTI, A.; KATER, M.M.; MASIERO, S.; LASSERRE, P.; LESPINASSE, Y.; ALLAN, A.C.; BUS, V.; CHAGNÉ, D.; CROWHURST, R.N.; GLEAVE,

A.P.; LAVEZZO, E.; FAWCETT, J.A.; PROOST, S.; ROUZÉ, P.; STERCK, L.; TOPPO, S.; LAZZARI, B.; HELLENS, R.P.; DUREL, C.E.; GUTIN, A.; BUMGARNER, R.E.; GARDINER, S.E.; SKOLNICK, M.; EGHOLM, M.; VAN DE PEER, Y.; SALAMINI, F. und VIOLA, R. (2010): The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nature Genetics*, 42 (10): 833-841

VISSER, T. (1964): Juvenile Phase and growth of apple and pear seedlings. *Euphytica*, 13: 119 - 129

WADA, M.; URESHINO, A.; CAO, Q. und BESSHO, H. (2007): Genomic varieties of apple *AFL* genes. *Plant Science*, 173: 559 - 566

WEBSTER, A.D. (2002): Factors influencing the flowering, fruit set and fruit growth of european pears. *Acta Horticulturae* 596: 699 – 709

WERTHEIM, S.J. (1981): High-density planting: Development and current achievements in the Netherlands, Belgiums and West Germany. *Acta Horticulturae*, 114: 318-330

WERTHEIM, S.J., WAGENMAKERS, P.S., BOOTSMA, J.H. und GROOT, M.J. (2001): Orchard systems for apple and pear: conditions for success. *Acta Horticulturae* 557: 209- 227

WILKIE, J.D.; SEDGLEY, M. und OLESEN, T. (2008): Regulation of floral initiation in horticultural trees. *Journal of Experimental Botany*, 59: 3215 – 3228

YOO, S.K.; CHUNG, K.S.; KIM, J.; LEE, J.H.; HONG, S.M.; YOO, S.J.; YOO, S.Y.; LEE, J.S. und AHN, J.H. (2005): *CONSTANS* activates *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* through *FLOWERING LOCUS T* to promote flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 139: 770 - 778

ZALESNY, R.S.; HALL, R.B.; BAUER, E.O. und RIEMENSCHNEIDER, D.E. (2005): Soil temperature and precipitation affect the rooting ability of dormant hardwood cuttings of *Populus*. *Silvae Genetica*, 54: 47 - 58

ZEEVAART, J.AD (2006): Florigen coming of age after 70 years. *The Plant Cell*, 18: 1783 – 1789

ZEEVAART, J.AD (2008): Leaf-produced floral signals. *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 541 - 547



## 6. Anhang

Tabelle A 1: Verwendete Geräte und Materialien im Labor

Gerät	Typ	Hersteller
Waage		
Tischzentrifuge		
Reaktionsgefäße	0,1 ml	Corbett
	0,2 ml 0,5 ml ; 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt
Pipetten	0,1 µl, 20 µl; 200 µl; 1000 µl	Eppendorf
Pipettierspitzen	10 µl; 500 µl, 1000 µl	Sarstedt
Photo-Kamera		Canon
BioDocAnalyze Video (RNA) verwendetes Programm zur anschließenden Bearbeitung	Biometra Ti 5  BioDocAnalyze 2.0	Biometra  Biometra
Thermocycler	T3	Biometra
Autoklav		
Vapoklav		
Mikrowelle		
Gefrierschrank		
-80 °C Schrank		
Vortex		
Schüttler		
PH-Meter		
Elektrophoresekammern		
Photometer		
Präzisionsküvette		
Materialien	Typ	Hersteller
Kit für RT-PCR	OneStep RT-PCR	Qiagen®
Kit zur Isolation von RNA	Invisorb® Spin Plant RNA Mini Kit	Invitek
Agarose	SeaKem LE Agarose	Biozym
Ethidiumbromid	10 mg/ml Stammlösung	Roth
Längenmarker	Forever 100bp Ladder	Seegene
Ethanol	99,8%	Roth
λ-DNA-Größenmarker	100ng	MBI Fermentas

**A I: Steckpläne****2005:**

Versuch wurde aus Platzgründen geteilt.

WC I L		WC III L	Anderer Versuch	
	WC II L			
		WC IV L		
WC I K			WC IV L	
	WC II K			
	WC III K			

WC: Williams Christ Karlsruhe

L = Langsteckling

K = Kurzsteckling

---

**2006:**

					WC I L
	WC IV L	WC III L			
		WC I K		WC II L	WC III K
	WC II K			WC IV K	

WC: Williams Christ Wurzen

L = Langsteckling

K = Kurzsteckling

2007:

links

	Con III L	Con IV K	VD IV L	VD II K
	VD IV K ✦		WC IV L	
VD III L		Con I L		
WC VIII L	WC V K	WC VII L	WC II K	
VD I K				✦



Standort Solarimeter



Standort Temperaturfühler

WC W: Williams Christ Wurzen

Con: Conference

VD: Vereins Dechant

L = Langsteckling

K = Kurzsteckling



rechts

WC VIII K		WC VII L	VD III K	Con IV L	WC VI K	
WC I L	Con III K		WC III K	Con I K		VD II L
	WC IV K	VD I L		Con II L	WC IV L	
	WC III L	WC VII K	Con II K		WC I K	WC II L



2008:

## Folienhaus

Con I	WC W I	WC W II	Con II
WC W III	WC K I	Con III	WC K II
WC W IV	Con IV	WC W V	Con V
WC K III	Con VI	WC K IV	WC K V
Con VII	WC W VI	Con VIII	WC K VI
WC W VII	Con IX	Con X	WC K VII
			

WC W:Williams Christ Wurzen  
 WC K:Williams Christ Karlsruhe  
 Con: Conference

17 Wiederholungen à 25 Stecklinge

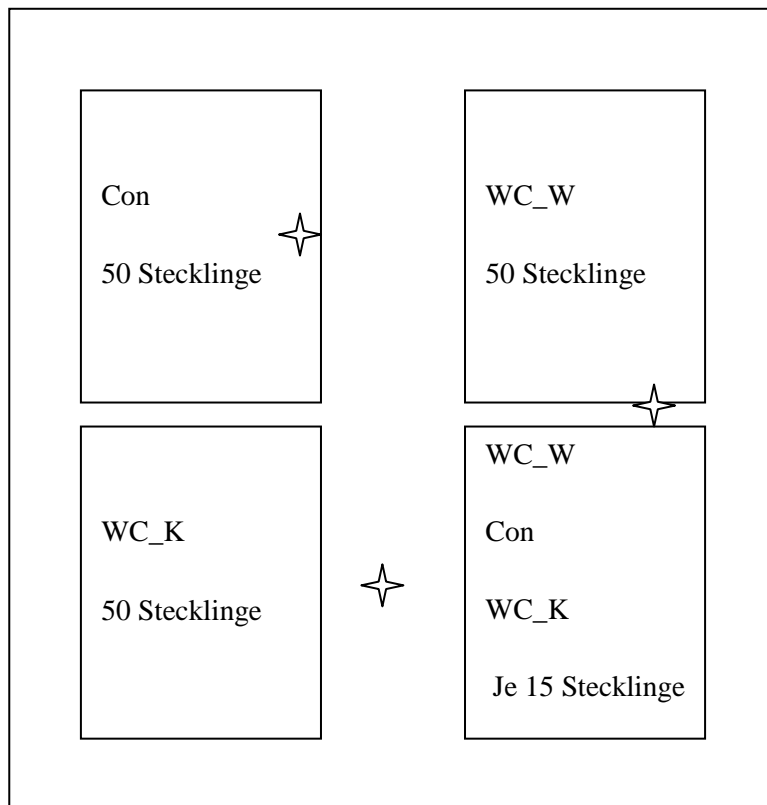
I-XVII : Wdh, nur Langstecklinge

 Standort Solarimeter

 Standort Temperaturfühler

WC W VIII	WC K VIII	WC W IX	Con XI
WC K IX	WC W X	WC K X	Con XII
WC W XI	Con XIII	WC W XII	WC W XIII
WC K XI	WC K XII	WC W XIV	WC K XIII
WC K XIV	WC W XV	WC K XV	Con XIV
WC W XVI	WC K XVI	Con XV	Con XVI
WC K XVII			WC W XVII

**Klimakammer**



WC W:Williams Christ Wurzen  
 WC K:Williams Christ Karlsruhe  
 Con: Conference

Je 75 Langstecklinge

✧ Standort Temperaturfühler



Abbildung A 1: Darstellung der mittleren Tagestemperatur (Temp FH) und der mittleren Substrattemperatur (Temp Sub) sowie der Tageshöchstwerte (FH Max) im Folienhaus (FH) vom 23. Juli bis 22. August 2007. Aufgrund technischer Probleme konnte die Temperatur im FH erst ab dem 08. August gemessen werden.

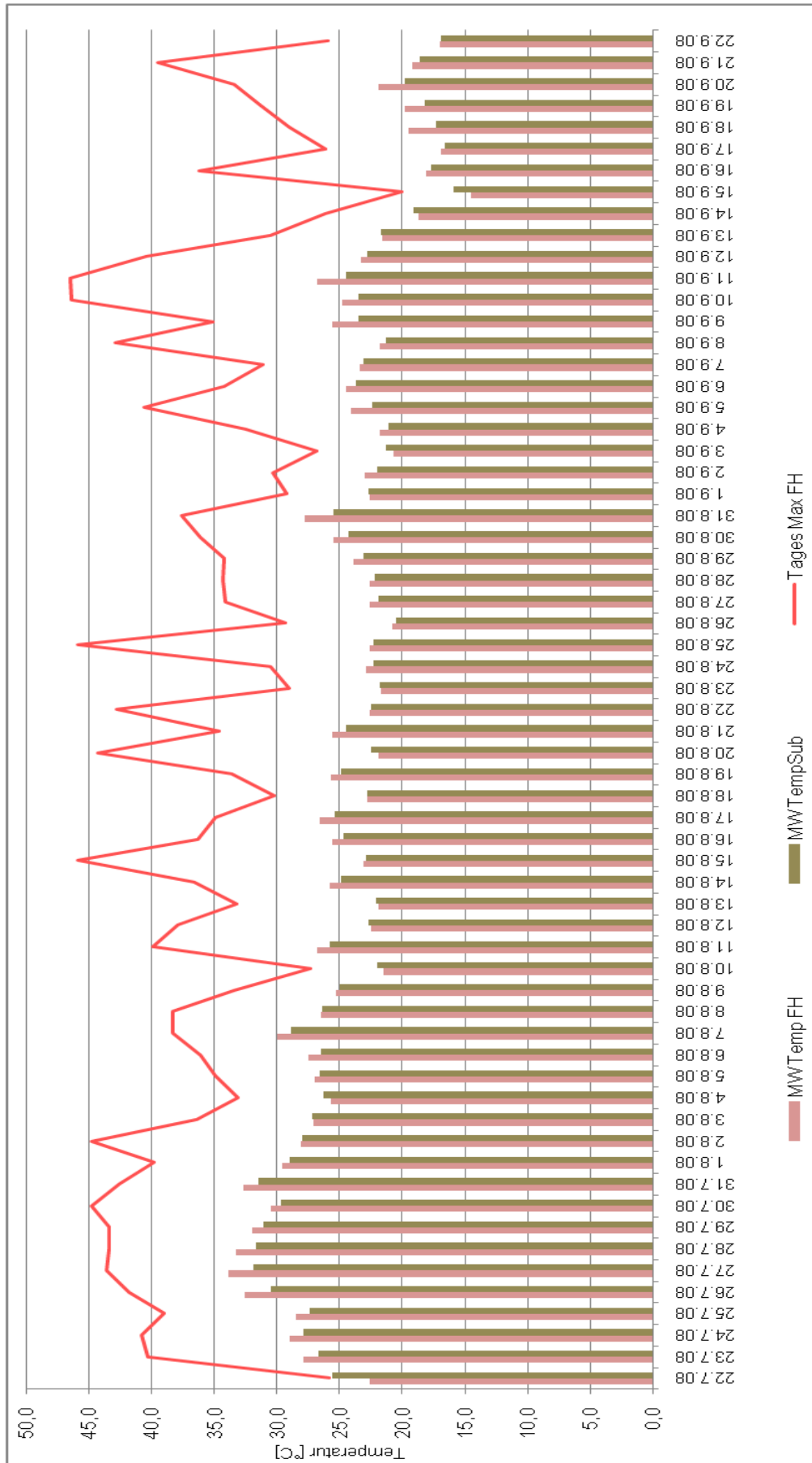


Abbildung A 2: Darstellung der mittleren Tagestemperatur (MW Temp FH) und der mittleren Substrattemperatur (MW Temp Sub) sowie der Tageshöchstwerte (Tages Max FH) im Folienhaus (FH) vom 22. Juli bis 22. September 2008



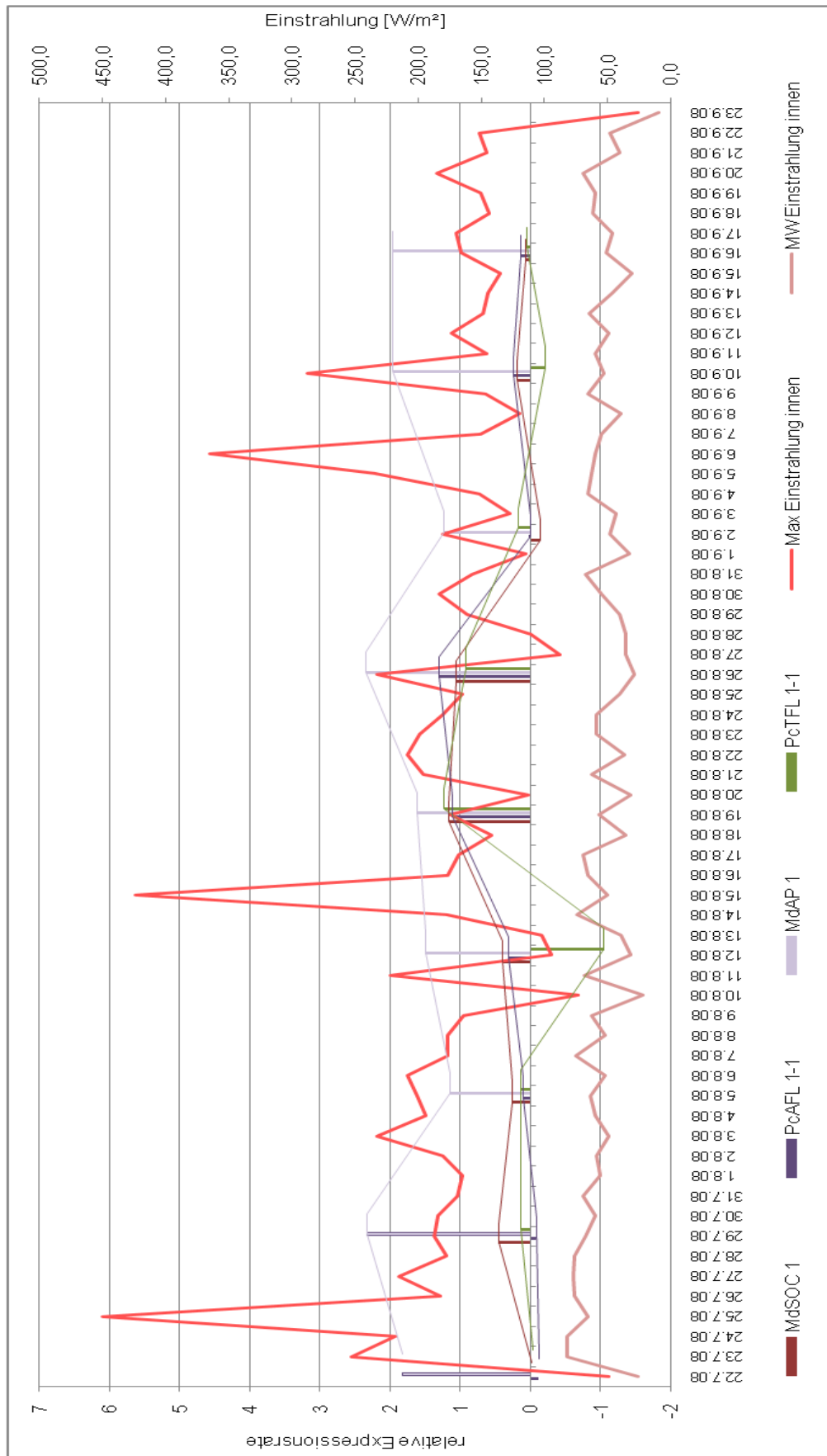


Abbildung A 3: Darstellung der mittleren und maximalen Sonneneinstrahlung pro Tag im Folienhaus (FH), 2008 sowie die relativen Genexpressionsraten von *PcTFL 1-1*, *MdAP 1*, *PcAFL 1-1* und *MdSOC 1* an den Probeterminen

**A III: Gensequenzen zum Ableiten der Primer*****APPLE FLORICAULA 1: Pyrus communis PcLFY 1 mRNA for LEAFY protein, complete cds***

(AB162030.1)

1 atggatccag atgccttctc tgcgaacttg ttcaagtggg acttacgtgg gatggttg  
61 ccgacgaacc gggttcagct cgaagcggcc gtaacccag cagcggcagc tgctgcgggg  
121 gcggttggtt atactttaag gccccaaga gagcttgac ttggagggt tgaagacttg  
181 ttccaggctt atggggtcag atactaccg gcggcgaaga tagcggagct tggatttact  
241 gtgaacacc tcttgacat gaaggatgat gagcttgatg acatgatgag cagcctctc  
301 cagatattcc gctgggagt gcttgttggg gagaggtatg gtatcaaagc tgccgtcaga  
361 gccgagcgcc gccgcctga ggaggaggac tctcggcggc gcaacctgt ctctggtgat  
421 accaccacca atgccctaga tgctctctcc caagaaggac tgcggagga gccagtgcaa  
481 caagagaagg agatggtggg gagcgggtga gggatggcgt gggaggttg gacggcggga  
541 gagagcgga agaagcagc gaggatgaag aaggggcaat ataggaactg tagtgctgta  
601 gggggtcata ataatgatca taacgagggt gtagacgaca aggacgacga catggacgac  
661 atgaatgggc aggggaacgg tggaggagg gggttgctag gcgagagaca gagggagcac  
721 ccgttcacg tgacggagcc tggggagggt gcacgtggca aaaagaacgg tcttgattac  
781 ctctccatc tctacagca gtccctgat ttctgatcc aggtccagaa cattgccaag  
841 gagcgcggtg aaaaatgtcc aaccaagggtg acaaaccagg tgtttagta tgccaaaaag  
901 tcaggcga gctacatcaa caagccgaag atcgggcaact atgtgcaactg ctacgccctg  
961 cattgcctgg acgtggaggc atcgaatgtg ttgaggagag cgttcaagga gacggcgcaa  
1021 aatgtcgggt catggcggca ggcatgtac aagcctcttg tggtcattgc agcgggcaaa  
1081 ggctgggaca tcgatccat ttcaattct catccccgtc ttccatctg gtacgtccc  
1141 acgaagctcc gtcagcttg tcacgccgag cgccacaaca ccgctctag ctctgctcc  
1201 ggtggcgggg gcgagcacct gccctattga

---

***APETALA 1* aus *Malus x domestica***

(AY071921)

1 tctggggggttcgggtggttggtttttggagaagaaaatcaaagaacaagcagttgaa  
61 agagtgagtggttaactcagatccataaatatattaatc[at]gggagaggtagagttcagc  
121 tgaagcgcatagagaacaagatcaacaggcaggtgacttttccaaaagaagcactgggc  
181 tgctgaagaaggctcatgagatctctgtcttgtgtgatgctcaggttgcttgattgtct  
241 tctccaacaaggggaagctccttgagtacgccacagattcatgtatggagcaaatccttg  
301 aacgctatgaaagatactttacgcagaaagacagctagtgaaccagattttgagtcac  
361 agggtaactggacctttgaatattccagactaaaggctaaagttgaggtttgcaaagaa  
421 accataggcactatttgggagaagacctggattccttgactctcaaggaaatccaaagtt  
481 tggagcaacagcttgacaccgctcataaacaattcgattaagaaaaaatcaactcatgc  
541 atgaatccatcactgagcttcagagaaaggaaaaggcgatacaggagcaaaataacttgc  
601 tagcaaagaagataaaggagaaggagaaggctgcagctcagccccaggtcaaaactggg  
661 agcagcagaacctgaccttgacctgcttccacagccccttccatgtttaacattgggg  
721 ggacgcagcaagatgaattcctcaagtgaggaggaaccagctggaccttacactggaac  
781 cattttattcatgccatctcggatgctttgctgcttgatcatcaatgggta

---

**TERMINAL FLOWER 1: *Pyrus communis* PcTFL 1-1 mRNA for TFL1-like protein, complete cds**

(AB162042.1)

1 ggagtgcgat tagctcctcc tgaattgact tagccattaa tctttcttt ttacacttc  
61 tcttctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct cttaa<sup>a</sup>atga  
121 aaagagcatc ggagcctctg gttgttgga gagtgatagg agatgttctt gattcctca  
181 ctgcaacaac aaaaatgtct gtcacttaca acaccaagct agtctgcaat ggacttgagc  
241 tcttctctc tgttgtcaca gccaaaccta gagttgagat tcaaggagg gatatgagat  
301 ccttctttac tttggtgatg acagaccag atttctctgg cctagtgat cctatctaa  
361 gggagcacct gcactggatt gtgacagaca tccaggcac cacagatgcc acattggaa  
421 gagagtggt gagttatgag atgccgaage ccaatattgg catccacagg tttgtgttg  
481 ttcttctcaa gcagaatcga agacaatcaa tcaacacacc ttctcgagg gatcactca  
541 gcactcgaag ctctcggcc gaaaatgacc tgggtcttcc tgctgctgcc gtctactca  
601 acgcgcagag agaaactgca gctagaagac gctagctagt agctgtacc agaactctc  
661 catccatt

***β-ACTIN: Pyrus communis PcACT mRNA, partial cds***

(AB190176.1)

1 ggaactggaa tggatgaagc tggatttgc tggatgatg ctcccagggc tgtgttct  
61 agtattgtg gtcgtccacg acacacaggt gtc[atg]gttg gtatgggtca gaaggatgcc  
121 tatgtaggtg atgaagcaca gtcgaaaaga ggtatcctta ccttgaagta tcccattgag  
181 catggtatag tgagcaactg ggatgacatg gagaagatct ggcatcatac ttctacaat  
241 gaacttcgtg ttgctcctga agagcaccca gttctgctca cagaggctcc tctcaatct  
301 aaggccaaca gagaaaagat gacccaaatt atgtttgaga ctt[caatg] gcctgccatg  
361 [atg]ttgcca tccaggctgt tctctcactt tatgccagt gtcgtacaac aggtattgtg  
421 ctggactcag gtgatgggtg gattcacact gtccaatct acgaaggfta tgcctcct  
481 catgcatcc ttcgtctgga ccttctggt cgtgacctca cagatgcttt gatgaagatt  
541 ctactgaaa gagggtagat gttaccact actgctgaac gggaaattgt ccgtgatag  
601 aaggagaagc ttgcatatgt tgccttgat tatgagcaag aactgagac tgccaagagc  
661 agctcgtcag ttgagaagaa ctatgagctt cctgagggcc aagtcacac aattggagct  
721 gagagattcc ggtgcccaga agtctcttc caacctccc tcattggaat ggaagctgt  
781 ggcattcatg agactaccta caactctatc atgaagtgtg atgtggatat cagaaaagac  
841 ctatatgaa acatcgtgct cagtggggg tcaactatgt tcctggtat tgcagaccgt  
901 atgagcaggg agatcaccgc tcttgctcca agcagcatga agatcaaggt tgtggctcca  
961 ccggagagaa agtacagtgt ctggattgga ggtccacc ttgcatccgc tcagtacatt  
1021 ccaacagatg tgtatttcac cacgg

---

***SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1: SOC 1 aus Malus x domestica***

(GU983664.1)

1 atggtgagaaagaaggttgagatgaaaagaattgagaataacacaagccgacaagtgacc  
61 ttctcgaaacgtcgaaggggttgtaaagaagcttatgagcttcggttctttgcat  
121 gctgaagttgcagtcacgtcttctcgcaaaaaggcaggatctatgagtctccaggct  
181 gacatgcaacggactataaatcgataccataaacatgaaatggatcagggccgaccaac  
241 aaggttgaagtgaacaatatgtgcagcactgaagcatgaatcagctattatagccaag  
301 aagatagagatcctagaagcttcccagcggaagctttgggaaatgatctggattcttgc  
361 cctgttgaagaactccaagagatcagtagccagctggagcgaagcttacgcagcataagt  
421 gagagaaaggctcaattatacacggagcagatggaacaacataaggcaaggagaggttc  
481 ctgttacaagaggatgcacagttacgtgaagagtgttgcggaagccgtggatggagttt  
541 tcacctcaagaaaaagagcttctgcgtctgtaagcaatgaaaaagcaggagcttctgct  
601 tetgctccgataaactaccggagccaaagtagcatgagttctgaggtggacaccgattg  
661 ctattggacagccaaatggtgcgcgctgttga

## A IV: Übereinstimmung der Produkte aus der Sequenzierung

Die Nummern 120 bis 123 bezeichnen die eingeschickten Sequenzen

### *MdAP* 1

CAGAGACTGGGCTGCTGAAGAAGGCTCATGAGATCTCTGTCTTGTGTGATGCTCAGGTTG  
CTTTGATTGTCTTCTCCAACAAGGGCAAGCTCTTTGAGTACGCCACAGATTCATGTATGG  
AGCAAATCCTTGA

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

AP          GAACAAGATCAACAGGCAGGTGACTTTTCCAAAAGAAGCACTGGGCTGCTGAAGAAGGC 60
120        -----CAGAGACTGGGCTGCTGAAGAAGGC 25
                        *  *****

AP          TCATGAGATCTCTGTCTTGTGTGATGCTCAGGTTGCTTTGATTGTCTTCTCCAACAAGGG 120
120        TCATGAGATCTCTGTCTTGTGTGATGCTCAGGTTGCTTTGATTGTCTTCTCCAACAAGGG 85
*****

AP          GAAGCTCCTTGAGTACGCCACAGATT----- 146
120        CAAGCTCTTTGAGTACGCCACAGATTCATGTATGGAGCAAATCCTTGA 133
*****

```

### *PcTFL* 1-1

CTTCTTCTGTTGTCCAGCCAACCTAGAGTTGAGATTCAAGGAGGGGAGTTGAGATCTTTC  
TTTACTTTGGTGATGACGGACCCAGATTGTCCTGGCCCTAGTGACCCTTATCTAAGGGAG  
CACCTGCACCTGGATTGTGACAGACATTCCAGGCACCCACAGATCAGACATTCCAGGCACC  
ACAGA

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

tf1        ACACCAAGCTAGTCTGCAATGGACTTGAGCTCTTTCCTTCTGTGTGTCACAGCCAAACCTA 60
121        -----CTTCTTCTGTGTGTC-CAGCCAA-CCTA 25
                        *  *****

tf1        GAGTTGAGATTCAAGGAGGGGATATGAGATCCTTCTTTACTTTGGTGATGACAGACCAG 120
121        GAGTTGAGATTCAAGGAGGGGAGTTGAGATCTTCTTTACTTTGGTGATGACGGACCCAG 85
*****

tf1        ATTTTCCTGGCCCTAGTGATCCTTATCTAAGGGAGCACCTGCACTGGATTGTGA----- 174
121        ATTGTCCTGGCCCTAGTGACCCTTATCTAAGGGAGCACCTGCACTGGATTGTGACAGACA 145
***

```

### *PcAFL* 1-1

GNNCAAAAGGCAGGGGCAAGCTACATCAACAAGCCAAAGATGCGGCACTATGTGCACTG  
CTACGCCCA

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

af1        AAAAATGTCCAACCAAGGTGACAAACAGGTGTTTAGGTATGCCAAAAGTACGGCGCAA 60
122        -----GNNCAAAAGGCAGGGGCAA 19
                        *  *****

af1        GCTACATCAACAAGCCGAAGATGCGGCA----- 88
122        GCTACATCAACAAGCCAAAGATGCGGCACTATGTGCACTGCTACGCCCA 68
*****

```

*MdSOC 1*

CTGGGNATCNCNAGAAAAGACTTCTGCTTCTTTAGCTATGAAAANGCAG  
 GAGCTTCTGCTTCTGCTCCNNTCANCTACTGGAGCCNAATGAGCTNNGTA  
 GATNCTNGACGTGGACAA

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

Soc          TGAAGAGTGTGTGCGAAGCCGTTGGATGGAGTTTTCACCTCAAGAAAAAGAGCTTCTGC 60
123          -----CTGGGNATCNCNAGAAAAGA-CTTCTGC 27
                   *      ** * ***** *****

Soc          GTCGTAAAGCAATGAAAAGCAGGAGCTTCTGCTTCTGCTCCGATAAACTACGGAGCCA 120
123          TTCTTTA-GCTATGAAAANGCAGGAGCTTCTGCTTCTGCTCCNNTCANCTACTGGAGCCN 86
                   *** ** * ***** *****

Soc          AAGTAG----- 126
123          AATGAGCTNNGTAGATNCTNGACGTGGACAA 117
                   ** **
  
```



## **Lebenslauf**

Seit 01.05.2011	Study Director/ Principal Investigator für GEP/GLP-Versuche in der Firma Field Research Support (FRS), Wunstorf
5/2010 – 12/2010	wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Firma Field Research Support (FRS), Wunstorf
7/2005 – 3/2010	wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover/ Institut für Zierpflanzen- und Gehölzwissenschaften/ Abteilung Baumschule

## Studium

10/1999 – 4/2005	Diplomstudiengang Gartenbau an der Universität Hannover
Schwerpunkte	Zierpflanzenbau, Phytomedizin, Baumschule, Ökologie und Umweltschutz
Diplomarbeit	Untersuchungen zur Kälte- und Frosttoleranz von nicht-transgenen und C-repeat/dehydration-responsive element binding factor (CBF)-transgenen <i>Petunia hybrida</i>
Abschluss	Diplom mit dem Hochschulgrad Diplom-Agraringenieurin
10/1998 – 8/1999	Diplomstudiengang Architektur an der technischen Universität Braunschweig

## Ausbildung

8/1994 – 1/1998	Ausbildung zur Zahntechnikerin
1/1998	Abschluss mit Gesellenbrief

## Berufserfahrung

1/1998 – 6/1998	Zahntechnikerin
-----------------	-----------------

## Schulausbildung

1981 – 1985	Grundschule Adensen
1985 – 1987	Orientierungsstufe Nordstemmen
1987 – 1991	Realschule Nordstemmen
1991 – 1994	Gymnasium Sarstedt
Schulabschluss	Allgemeine Hochschulreife

## **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und angefertigt, ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen kenntlich gemacht habe.

Die Arbeit wurde bislang weder einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt, noch veröffentlicht.

Kathrin Rump

Hannover, Februar 2012

## **Danksagung**

Herrn Professor Dr. Wolfgang Spethmann möchte ich für die Überlassung des Themas, der Betreuung sowie der steten Bereitschaft mir beratend und unterstützend hilfreich zur Seite zu stehen herzlich danken.

Ebenso danke ich Professor Dr. Traud Winkelmann herzlich für die Betreuung der molekulargenetischen Arbeiten und für die vielen hilfreichen Gespräche.

Bei beiden habe ich stets ein offenes Ohr und richtungsweisende Vorschläge gefunden.

Für die Bereitstellung des Pflanzenmaterials von 'Williams Christ' bedanke ich mich bei der Prüfstelle Wurzen (Bundesortenamt Hannover) und Dr. Friedhelm Berger, Karlsruhe.

Für die Einarbeitung in die Histologie danke ich Dr. Michael Neumüller und seinem Team an der TUM in Dürnst.

Professor Dr. Thomas Debener, Dr. Helgard Kaufmann, Dr. Henryk Flachowsky und Dr. Heiko Mibus-Schoppe danke ich herzlich für die Hilfe bei den molekulargenetischen Arbeiten und der Beantwortung etlicher Fragen.

Bei Dr. Frank Schaarschmidt bedanke ich mich für die Hilfe und die Beratung in der Statistik.

Dem Fachgebiet Biosystem- und Gartenbautechnik danke ich für die Bereitstellung der Datalogger und bei Dr. Burkhard von Elsner und Udo Düppers für die hilfreiche Unterstützung im Umgang mit dem Gerät und der Software.

Ein großer Dank geht an Herbert Geyer und Detlef Hommel für die Unterstützung im Gewächshaus, dem Bau eines Folienhauses in der Klimakammer sowie die Hilfsbereitschaft bei der Planung zur Durchführung der Versuche.

Ein riesiger Dank gilt natürlich dem gesamten Baumschulteam, in dessen Mitte ich mich immer wohl gefühlt habe und deren helfende Hände mir stets zur Seite standen – sei es im Sekretariat, Labor oder Gewächshaus.

Für die Hilfe im Labor und auf dem Feld danke ich besonders Friederike Schröder, Karin-Ingrid Lein, Simon Richartz und natürlich Wolfgang Huhn.

Für hilfreiche, augenöffnende und nicht selten erheiternde Gespräche und Diskussionen sowie dem Lesen der vorliegenden Dissertation danke ich Dr. Melanie Bartsch, Dr. Antje Doil, Barbara Kreikenberg und Dr. Julia Meiners.

Tatsächlich hätte ich die Jahre ohne Kaffee nicht überstanden und so möchte ich den äthiopischen Ziegen aus Kaffa für die Entdeckung desselbigen ganz herzlich danken, ebenso den Azteken für die Schokolade sowie den Firmen Eduscho, Ferrero und Nestlé für die pfiffige Umsetzung dieser Substanzen in Rausch- und Aufputzmittel.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung und das Verständnis während der vergangenen Jahre. Insbesondere Dorothee Rump und Holger Bergmann danke ich für den Trost und die Sicherheit in einer traurigen Zeit.